

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Sledování farmakokinetiky oximového reaktivátoru acetylcholinesterázy K869

Diplomová práce

Anna Hojná



PharmDr. Nela Váňová, PhD.

Hradec Králové, 2021

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce PharmDr. Nele Váňové, PhD. za trpělivost při vedení mé diplomové práce, za odborné znalosti a rady, které mi předala, a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia. Naposled bych chtěla poděkovat celé katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, že mi poskytla zázemí pro můj výzkum.

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Seznam použité literatury.....	9
Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	12
1.1.1. Princip a přístrojové uspořádání HPLC.....	12
1.1.2. Stacionární fáze a chromatografické systémy.....	14
1.1.3. Detektory.....	17
1.1.4. Základní chromatografické charakteristiky.....	20
1.1.5. Základní metody kvantitativní analýzy.....	21
1.2. Metody úpravy vzorku před analýzou.....	24
1.2.1. Extrakce mezi dvě nemísitelné kapaliny (LLE – liquid liquid extraction).....	24
1.2.2. Precipitace.....	24
1.2.3. Extrakce na pevnou fázi (SPE – Solid Phase Extraction).....	25
1.3. Validace.....	27
1.4. Preklinické hodnocení léčiv a farmakokinetika.....	29
1.5. Antidota otrav organofosfáty.....	30
1.5.1. Otrava organofosfáty.....	30
1.5.2. Antidotní terapie otrav organofosfáty.....	31
1.5.3. Oximy.....	33
2. Cíl práce.....	36
3. Materiál a metodika.....	37
3.1. Chemikálie a spotřební materiál.....	37
3.2. Přístrojové vybavení a chromatografické příslušenství.....	37
3.3. Příprava vzorků a plán projektu.....	38
3.4. Příprava mobilní fáze a standardních roztoků pro analýzu.....	39

3.4.1.	Mobilní fáze	39
3.4.2.	Zásobní roztoky	39
3.4.3.	Pracovní roztoky	40
3.5.	Optimalizace extrakce oximu K869 pomocí SPE z plazmy	40
3.6.	Optimalizace extrakce oximu K869 z tkání	41
3.6.1.	Mozková tkáň	41
3.6.2.	Jaterní a ledvinová tkáň	42
3.7.	Výsledný postup pro zpracování vzorků	43
3.7.1.	Plazma	43
3.7.2.	Ledviny	43
3.8.	Kvantifikace oximu K869 v biologickém materiálu	43
3.9.	HPLC metoda	44
3.10.	Validace	44
3.11.	Stabilita	45
4.	Výsledky	46
4.1.	Stabilita	46
4.2.	Optimalizace extrakce K869 z biologického materiálu	47
4.2.1.	Optimalizace SPE	47
4.2.2.	Optimalizace extrakčního procesu z plazmy	48
4.2.3.	Optimalizace SPE z tělních tkání	50
4.3.	Základní parametry chromatografické separace	52
4.3.1.	Plazma	52
4.3.2.	Ledvinová tkáň	53
4.4.	Validace	54
4.4.1.	Plazma	54
4.4.2.	Ledvinová tkáň	55
4.5.	Farmakokinetika oximu K869	57

4.5.1. Plazma.....	57
4.5.2. Ledviny	60
5. Diskuze	62
5.1. HPLC-UV metoda.....	62
5.2. Úprava vzorku.....	62
5.3. Farmakokinetika K869.....	63
5.3.1. Farmakokinetika v plazmě.....	63
5.3.2. Eliminace	63
5.3.3. Distribuce do mozku.....	64
5.3.4. Budoucí výzkum	65
6. Závěr	66
7. Seznam citované literatury.....	67

Abstrakt

Podání oximových reaktivátorů acetylcholinesterázy tvoří spolu s atropinem a diazepamem základní strategii farmakologické terapie otrav organofosfáty (OP). Snahou je vyvinout takové oximy, které by byly účinné proti široké škále OP a zároveň které by dobře prostupovaly do centrálního nervového systému.

Bispyridiniové oximy patří mezi nejúčinnější reaktivátory acetylcholinesterázy. Jsou to ale nabitě molekuly, které velmi málo prostupují hematoencefalickou bariéru. Snahou vědců je modifikovat tyto molekuly tak, aby byly více lipofilní a došlo tím k zesílení jejich centrálního účinku. Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je substituce základní struktury reaktivátoru vhodnými funkčními skupinami. Látka K869 je asymetrický bispyridiniový oxim, jehož pyridiniové jádro je substituováno dvěma atomy chloru.

Pro stanovení oximu K869 z plazmy a ledvin byla vyvinuta a optimalizována HPLC-UV metoda. Protože je oxim K869 permanentně nabitá molekula, byla použita iontově-párová chromatografie, kdy se molekula s přídavkem iontově-párového činidla (1 mM oktansulfonová kyselina) do vodné složky mobilní fáze (citrát-fosfátový pufr) stává nenabitou. Poté byla separována v reverzním chromatografickém módu v režimu isokratické eluce, kde organickou složku tvořil acetonitril (14 %). Pro úpravu vzorku byla vyvinuta SPE metoda za použití Weak-Cation Exchange kolonek. Jako eluční činidlo byli použita směs acetonitrilu, kyseliny mravenčí a vody v poměru 9:0,5:0,5 (v/v/v). Koncentrace v plazmě dosahovala maximálních hodnot ~ 40 µg/ml mezi 15 a 20 minutami po intramuskulárním podání oximu. Nejvyšší koncentrace v ledvinách ~ 20 µg/g byla naměřena ve vzorcích odebíraných 30 minut a 60 minut po podání oximu.

Abstract

Co-administration of oxime reactivators of AChE together with atropine and diazepam is the basic strategy for the pharmacological treatment of organophosphate (OP) poisoning. The aim is to develop such oxime, that would be effective against a wide range of OPs and simultaneously, that would penetrate the central nervous system.

Bispyridinium oximes are among the structures with the most efficient acetylcholinesterase reactivation. However, they are charged molecules that poorly cross the blood-brain barrier. Researchers try to modify these molecules to be more lipophilic thus, enhancing their central effect. One of the possible approaches is to substitute the basic structure of the reactivator with suitable functional groups. K869 is an asymmetric bispyridinium oxime whose pyridinium ring is substituted by two chlorine atoms.

An HPLC-UV method was developed and optimized for the determination of oxime K869 in plasma and kidneys. Since oxime K869 is a permanently charged molecule, ion-pair chromatography was applied, in which the molecule becomes uncharged with the addition of an ion-pairing agent (1 mM octane sulfonic acid) to the aqueous components of the mobile phase (citrate-phosphate buffer). It was then separated in a reverse chromatographic mode in isocratic elution mode where acetonitrile was an organic phase (14 %). An SPE method using Weak-Cation Exchange columns was developed for sample adjustment. A mixture of acetonitrile, formic acid, and water in a ratio of 9: 0.5: 0.5 (v/v/v) were used as eluent. Plasma concentrations peaked ~ 40 µg/mL between 15 and 20 minutes after administration. The highest renal concentration was measured ~ 20 µg/mL in samples collected 30 and 60 minutes after administration.

Seznam použitých zkratk

A	absorbance
ACN	acetonitril
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
A_s	faktor symetrie
BSA	hovězí sérový albumin
CNS	centrální nervový systém
EDTA	edetan disodný
FA	kyselina mravenčí (Formic Acid)
HEB	hematoencefalická bariéra
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV/VIS	HPLC s UV/VIS detekcí (spektrofotometrický detektor)
IS	vnitřní standard (Internal Standard)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí v tandemovém uspořádání
LC-WCX	extrakční kolonka se slabým katexem (Weak Cation Exchange)
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MTD	maximální tolerovaná dávka (Maximal Tolerated Dose)

M_w	molekulová hmotnost (Molecular Weight)
N	počet teoretických pater
NP-HPLC	chromatografie na normální fázi
NPL	nervově paralytické látky
OP	organofosfáty
PAMPA	Paralelní test propustnosti umělé membrány (Parallel artificial membrane permeability assay)
pKa	disociační konstanta
R^2	koefficient regresní křivky
RP-HPLC	chromatografie na reverzní fázi
R_s	rozlišení
SPE	extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction)
TCA	kyselina trichloroctová (Trichloroacetic Acid)
UV	ultrafialové záření

Úvod

Jako organofosfáty (OP) obecně označujeme estery kyseliny fosforečné. Tyto látky mají stále velký význam v zemědělství některých států jako pesticidy. V minulosti byly tyto látky rovněž použity jako bojové otravné látky ve válečných konfliktech. [1] Jejich mechanismem účinku je inhibice acetylcholinesterázy (AChE), což je enzym, který štěpí acetylcholin (ACh) v nervových synapsích. [2] [3] ACh je významný neurotransmitter v neuromuskulárních spojeních, v synapsích viscerálního motorického systému a v centrálním nervovém systému (CNS). [4] Díky inhibici AChE se hromadí v nervových synapsích a jeho nadměrné množství je pro organismus toxické. [2] [3] Ačkoliv je použití OP ze skupiny bojových nervově paralytických látek (NPL) zakázáno mezinárodní Úmluvou o zákazu chemických zbraní, nedávná otrava opozičního ruského politika Alexeje Navalného NPL ze skupiny novičoků [5] a použití sarinu ve válce v Sýrii [6] naznačují, že jejich zneužití stále představuje hrozbu pro jednotlivce i skupiny obyvatel. Proto je důležité věnovat pozornost vývoji dostatečně efektivní profylaktické a antidotní terapie otrav těmito látkami.

Oximy reaktivují fosforylovanou nebo fosfonylovanou AChE a částečně zlepšují účinky atropinu. [7] Podání oximových reaktivátorů AChE tvoří spolu s atropinem a diazepamem základní strategii farmakologické terapie otrav OP. [8] V dnešní době je snahou vyvinout takové oximy, které by byly jednak účinné proti široké škále OP a zároveň dobře prostupovaly do CNS. Bispyridiniové oximy patří mezi struktury s nejučinnější reaktivací inhibované AChE. Jsou to ale nabitě molekuly, které jen velmi málo prostupují HEB. Snahou vědců je modifikovat tyto molekuly tak, aby byly více lipofilní a tím došlo k zesílení jejich centrálního účinku. Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je substituce základní struktury reaktivátoru vhodnými funkčními skupinami. Jedním z bysypiridiniových reaktivátorů je oxim K869, u kterého byla v této diplomové práci sledována farmakokinetika. Oxim K869 je asymetrická molekula, jejíž pyridiniové jádro je substituováno dvěma atomy chloru. [9]

1. Teoretická část

Pro analýzu oximu K869 byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Je to metoda volby v bioanalýze léčiv. Bioanalýza je termín obecně používaný k popisu kvalitativního i kvantitativního stanovení léčiva nebo jeho metabolitu v biologických matricích, primárně v tělních tekutinách (plazma, sérum, moč) nebo v tkáních. [10]

1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je důležitá analytická technika, která umožňuje separaci, identifikaci a purifikaci složek směsi pro kvantitativní a kvalitativní analýzu. [11] V současné době patří k nejvíce využívaným analytickým technikám a uplatňuje se v mnoha odvětvích, jako je například potravinářství, zemědělství, kosmetický průmysl, kontrola kvality životního prostředí a samozřejmě farmacie. [12]

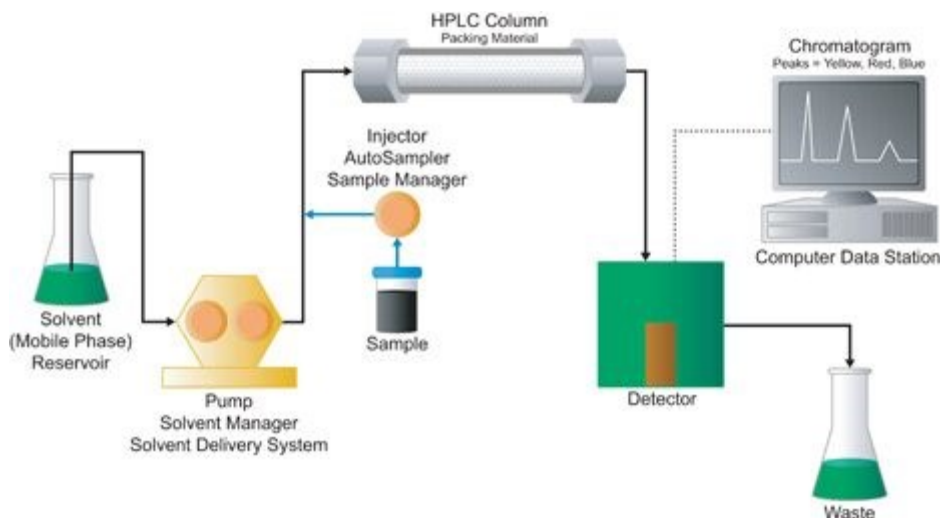
Ve farmacii se s HPLC setkáváme prakticky ve všech stádiích vývoje nových potenciálních léčiv. Je to metoda volby také pro kontrolu čistoty ve všech fázích vývoje léčiv, pro hodnocení nových formulací léčivých přípravků a jištění kvality finálního léčiva. [13]

1.1.1. Princip a přístrojové uspořádání HPLC

Chromatografie je založena na různé rychlosti rozdělování látek směsi mezi dvě navzájem nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Stacionární fázi může být tuhá látka nebo kapalina adsorbovaná na tuhém nosiči. Stacionární fáze bývá nejčastěji uložena v chromatografické koloně, což je krátká tenká ocelová trubice, ve formě sorbentu. Sorbent je obvykle tvořen porézními nebo povrchově porézními částicemi. [14] [15] Mobilní fázi v kapalinové chromatografii je směs rozpouštědel zpravidla tvořená vodnou a organickou složkou. [14] Rozpustnost analytů v mobilní a stacionární fázi a velikost molekuly každé složky vzorku přispívají k rozdílné distribuci na koloně. Látky, které jsou více distribuovány v mobilní fázi, migrují kolonou rychleji, kdežto ty, které jsou více distribuovány ve stacionární fázi, migrují pomaleji. [15]

Schéma přístrojového uspořádání kapalinového chromatografu je zobrazeno na obrázku č. 1. a jeho jednotlivé části jsou podrobně popsány v tabulce č. 1. Analyt je nastříknut do systému manuálně nebo pomocí autosampleru a je unášen mobilní fází

na kolonu. Dále plynou oddělené složky do cely detektoru, kde dochází k jejich identifikaci. [14]



Obrázek č. 1 Popis HPLC chromatografu [16]

Tabulka č. 1 Funkční uspořádání kapalinového chromatografu

1.	Zásobník mobilní fáze (Mobil Phase Reservoir)	V jednom nebo více zásobnících je mobilní fáze určitého složení, která je čerpána do kapalinového chromatografu. Při izokratické eluci má mobilní fáze po celou dobu analýzy stejné složení. V průběhu analýzy za použití gradientové eluce se poměr složek mobilní fáze mění [17] [18]
2.	Čerpadlo mobilní fáze (Pump Solvent Manager, Solvent Delivery System)	Nasává hadičkami mobilní fázi ze zásobníku a pomocí tlaku reguluje rychlost průtoku, která je udávána nejčastěji v mililitrech za minutu. Nejčastěji se využívá vysokotlaké čerpadlo zajišťující přesný, správný a stabilní průtok bez pulzací. Jsou 2 typy tvorby gradientu mobilní fáze. Pokud mísíme složky mobilní fáze za atmosférického tlaku před vstupem do vysokotlakého čerpadla ve směšovací komůrce, mluvíme o nízkotlakém gradientu, ale pokud má každá složka mobilní fáze své vysokotlaké čerpadlo a k mísení dochází před kolonou, jedná se o vysokotlaký gradient [19]
3.	Degasser	Slouží k odplynění mobilní fáze. Skládá se nejčastěji ze systému hadiček z polopropustné membrány, která pod podtlakem odsává plyn. [14]

4.	Směšovač mobilní fáze	Směšovač se používá pro smísení mobilní fáze, která se skládá z více složek. [14]
5.	Dávkořavač vzorku (Injector, Autosampler, Sample Manager)	Zařídění, které zajiřřuje nastřřiknutí alikvótního množství vzorku na chromatografickou kolonu. V dneřřní době jsou více využívány automatické dávkovače neboli autosamplery. Typický HPLC autosampler se skládá z oddílu, který skládá vialky se vzorky a injektor, který obsahuje vícecestný ventil, dávkovač vzorku a dávkovací jehlu. [20] Existují 3 různé typy autosampleru: <ul style="list-style-type: none"> a) Pohybující se zásobník vzorku s fixní dávkovací jehlou b) Pohybující se raménko dávkovací jehly s fixním zásobníkem vzorků c) Dávkovací jehla i zásobník jsou fixní, vialka je roboticky dopravena k dávkovací jehle [14]
6.	HPLC kolona (HPLC Column)	Na chromatografické koloně probíhá vlastní separace látek pomocí interakcí mezi sorbentem kolony (viz kap. 1.1.2) a mobilní fází, která jí protéká. [14]
7.	Detektor (Detector)	Je propojen s počítačem pro zpracování dat. Zaznamenává změny ve složení mobilní fáze a jednotlivé složky směsi. Existuje více druhů detektorů (viz kap. 1.1.3), každý pracuje na jiném principu. [14]
8.	Počítač pro zpracování dat (Computer Data Station)	Převádí data z detektoru pomocí počítačového programu na chromatogram. Z chromatogramu můžeme zjistit informace o identitě látek a zároveň nám poskytuje informace dostatečné pro kvantitativní vyhodnocení. [14]
9.	Odpad (Waste)	Po průchodu detektorem plyne směs látek s mobilní fází do odpadu. [14]

1.1.2. Stacionární fáze a chromatografické systémy

Stacionární fáze jsou ukotveny uvnitř kolony a vyplňují její prostor. Stacionární fáze mají různé chemické složení. Mohou to být např. anorganické oxidy, kam patří silikagel, oxid zirkoničitý, oxid titaničitý a oxid hlinitý. Další možností jsou chemicky

vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní stacionární fáze nebo fáze na bázi grafitového uhlíku. [14]

Na základě charakteru stacionární fáze můžeme chromatografii rozdělit do několika základních módů:

- a) **Chromatografie na normální fázi (NP-HPLC – Normal Phase Chromatography)**, při níž je použita polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze. Typickým sorbentem pro chromatografii na normální fázi je silikagel. Silikagel je polární anorganický sorbent. Vlastní interakce s mobilní nepolární fází se účastní volné silanolové (hydroxylové) skupiny. [14] Hlavní aplikační oblast chromatografie na normální fázi je separace polyaromatických uhlovodíků, sterolů, vitaminů, chlorofylů, ceramidů a dalších lipidových extraktů. [21]
- b) **Chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC – Reversed Phase Chromatography)**, při níž je použita nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. [14] Ve farmacii a bioanalýze se jedná o nejčastěji používané fáze. Stacionární fáze v reverzní chromatografii jsou charakterizované funkční skupinou navázanou na silanolové skupiny silikagelu (např.: různě dlouhé alkyly, kyano a aminová skupina, fenylové a fluorofenylové skupiny [22]). Analyty jsou zachytávány pomocí nepolárních interakcí jako jsou aryl-aryl nebo alkyl-aryl interakce. [23] Chromatografie na reverzní fázi se může využít pro separaci širokého spektra nepolárních látek jako jsou lipidy, bílkoviny, sacharidy, léčiva a jejich sekundární metabolity. [24] [25]
- c) **Iontově-výměnná chromatografie (IEC – Ion Exchange Chromatography)**
Iontově-výměnná chromatografie se používá pro separaci a analýzu nabitých molekul, organických kyselin, aminokyselin, uhlovodíků a alkoholů, proteinů a nukleových kyselin. [26] Je to typ chromatografie, kde mohou být ionty nebo polární molekuly separovány na základě jejich interakcí (většinou reverzibilní adsorpcí) s opačně nabitými iontově-výměnnými skupinami imobilizovanými na nerozpustném nosiči. Mobilní fáze v iontově-výměnné chromatografii je vodná, protože v takových roztocích je podporována tvorba iontů. Pufry jsou obvykle upravovány na požadované pH. [27] Katex je stacionární fáze, která zadrží kation pomocí záporně nabitých funkčních skupin na svém povrchu. Anex je stacionární fáze obsahující kladně nabitě funkční skupiny, které zadržují anion. [28]

d) Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC – Hydrophilic-Interaction Chromatography)

Hydrofilní interakční chromatografie je alternativní mód HPLC pro separaci polárních sloučenin. HILIC je variantou NP-HPLC, ale separační mechanismus je složitější. Stejně jako NP-HPLC používá HILIC tradiční polární stacionární fáze jako silikagel nebo silikagel s navázanými amino a kyano funkčními skupinami, ale mobilní fáze je podobná těm, které se využívají v RP-HPLC. Používá se pro analýzu malých polárních molekul zahrnující, nukleosidy, nukleotidy a oligonukleotidy, aminokyseliny, peptidy a proteiny, sacharidy, glykosidy, hydrofilní léčiva a alkaloidy. [29]

e) Molekulová vylučovací chromatografie (SEC – Size Exclusion Chromatography)

Principem tohoto chromatografického módu je rozdělování na základě odlišné molekulové velikosti sloučenin. Směs molekul o rozdílné velikosti prochází kolonou naplněnou porózními částicemi. Molekuly o větší velikosti, než mají póry náplně, projdou kolonou první. Molekuly, které penetrují nebo difundují do pórů náplně, projdou kolonou pomaleji. [30] Je to referenční technika pro kvalitativní a kvantitativní hodnocení proteinů. Charakterizuje proteiny s minimálním vlivem na konformační strukturu a místní podmínky. [31]

f) Iontově-párová chromatografie (Ion-pair Chromatography)

Polární sloučeniny, jako jsou např. oximy s kvarterní amoniou skupinou (K869) vykazují zpravidla nízkou retenci na běžných kolonách s reverzní fází. Iontově-párová chromatografie může tento problém vyřešit přidávkem iontově-párového činidla (protiiontu) do mobilní fáze. [32] Principem iontově-párové chromatografie je tvorba neutrálních iontových asociátů mezi nabitými molekulami analytu a iontově-párovým činidlem, které má opačný náboj. Jejich separace pak probíhá na klasických reverzních fázích. Pokud je analyzovaná látka báze, jako protiionty se používají alkylsulfonové kyseliny (např.: pentansulfonová, hexansulfonová, heptansulfonová a oktansulfonová kyselina). Je-li analyzovanou látkou kyselina, využívají se jako protiionty kvarterní amoniové soli (tetrabutylamonium fosfát, cetyltrimethylamonium sulfát). [14] Separační princip iontově-párové chromatografie se ukazuje být docela komplexní a nemůže být popsán pouze rozdělováním neutrálního iontového páru mezi stacionární a mobilní fází. Jedním z navržených mechanismů v iontově-

párové chromatografii je iontově-výměnný model, kde nabité ionty iontově-párového činidla jsou adsorbovány na stacionární fázi a chovají se jako iontoměniče. Iontově-párová chromatografie může být cenná analytická technika, ale přináší také nové výzvy. Přídavek iontově-párového činidla může vyžadovat delší ekvilibraci kolony než standardní RP-HPLC, v opačném případě byly zaznamenány rozdvojené píky jejich deformace. [33]

1.1.3. Detektory

V HPLC systému je detektor zodpovědný za převedení fyzikálního nebo chemického znaku analytu do měřitelného signálu odpovídajícímu jeho identitě nebo koncentraci. [34] Detektory sledují rozdíl mezi signálem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Rozdělujeme je na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory zaznamenávají rozdíl v hmotnostní koncentraci, kdežto hmotnostní reagují na změnu hmotnostního toku složky. Dále je můžeme rozdělit na destruktivní a nedestruktivní. V destruktivním detektoru dochází k chemické změně analytu, kdežto v nedestruktivním se toto neděje. [14]

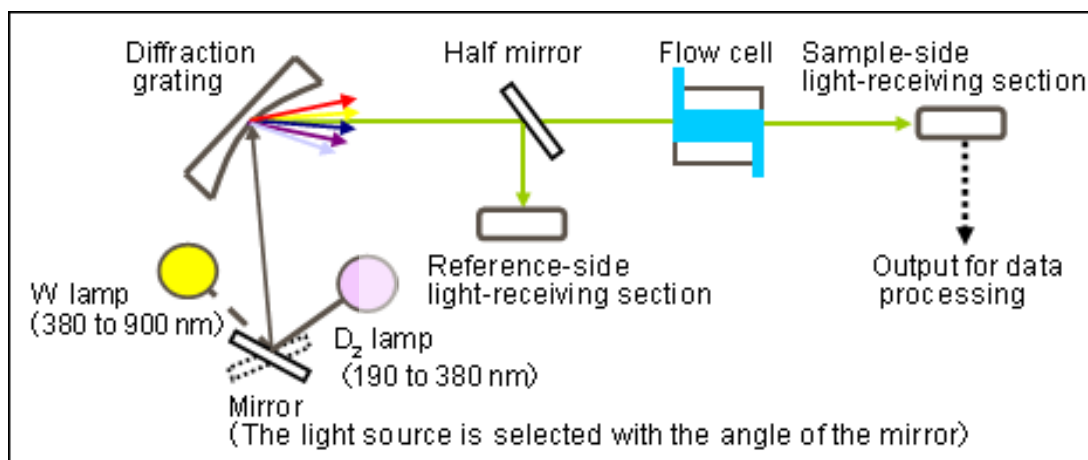
Typy detektorů podle principu:

a) Spektrofotometrické

Patří k nejběžněji využívaným detektorům, protože jsou poměrně citlivé, mají široké lineární rozpětí, jsou selektivní a kompatibilní s gradientovou elucí. Principem je absorpce záření analytem v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Absorbance se vypočítá pomocí Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce vyjádřenou jako absorbance (A):

$A = l * \epsilon * c$. Veličina ϵ je molární absorpční koeficient. Na obrázku č. 2 je zobrazena průtoková detekční cela spektroskopického detektoru. Poté co mobilní fáze opustí chromatografickou kolonu, naplní průtokovou celu. Světlo z UV (deuteriové) lampy používané pro detekci látek z ultrafialového oblasti nebo Tungstenovy (halogenové lampy), která se používá k detekci látek z viditelné oblasti světla, prochází skrz průtokovou celu a její obsah. [34] Spektrofotometrické detektory dále dělíme na detektory s fixní vlnovou délkou, detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou vlnovou

délkou a detektory s diolovým polem (PDA – photodiode-array, DAD – diode array detector), které snímají vlnovou délku v celém spektru v reálném čase. [14]



Obrázek č. 2 Princip fungování spektrofotometrického detektoru [35]

b) Fluorescenční

Fluorescenční detektory jsou založené na měření záření, které analyt emituje po absorpci excitačního elektromagnetického záření. Absorbí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního stavu do stavu excitovaného. Absorbovanou energii může molekula vyzářit jako fluorescenci. Fluorescenční záření, které molekula emituje, má stejnou vlnovou délku jako absorbované záření. Výhodou fluorescenčního detektoru je, že má vyšší citlivost a selektivitu. Nevýhodou je, že ne všechny látky vykazují přirozenou fluorescenci a je tedy potřeba je před samotným stanovením derivatizovat. [36] [37] [38]

c) Elektrochemické

Tyto detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda – roztok (mobilní fáze). Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (tou může být elektrodový potenciál, elektrický proud nebo kapacita) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem. Velikost měřené elektrické veličiny je přímo úměrná látkovému množství sledované složky. [39]

d) Univerzální detektory na bázi aerosolu

Detektory schopné detekovat látky bez ohledu na jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Patří sem ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), CAD (Charged Aerosol Detector) a NQAD (Nano Quantity Analyte Detector). [14]

e) Refraktometrické

Patří mezi nejstarší používané detektory. Odezva detektoru je úměrná rozdílu indexu lomu mobilní fáze s analytem v měrné cele a indexu lomu čisté mobilní fáze v referenční cele detektoru. [14]

f) Vodivostní

Patří do skupiny univerzálních detektorů. Měří elektrickou vodivost směsi mobilní fáze s analytem v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí. [14]

g) Hmotnostně spektrofotometrická detekce

Hmotnostní spektrometrie je výkonná detekční technika pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Při hmotnostní spektrometrii dochází k rozlišení iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výsledky jsou zobrazeny jako spektra relativní četnosti detekovaných iontů. [40] Jsou vysoce selektivní, citlivé a poskytují spektrální údaje o struktuře látky. Proces identifikace či kvalifikace se odehrává ve třech krocích: 1. ionizace vzorku, 2. rozdělení iontů podle poměru m/z a jejich urychlení v analyzátoru a 3. detekce v detektoru. [14]

h) Chemiluminiscenční detekce

Chemiluminiscenční metody jsou založené na měření elektromagnetického záření emitovaného exotermní chemickou reakcí, což je obvykle oxidace. Chemiluminiscenční detekce má několik výhod jako je vysoká senzitivita, kompaktní a jednoduchá instrumentace a široký dynamický rozsah. [41]

1.1.4. Základní chromatografické charakteristiky

a) Retenční čas – t_R :

Doba, která uplyne od nástřiku směsi vzorku po maximum eluční křivky (vrchol píku na chromatogramu). Při spektrofotometrické detekci se jedná o hlavní kvalitativní charakteristiku pro daný analyt. [42]

b) Plocha pod křivkou

Plocha pod křivkou (píkem) je základní veličinou pro kvantitativní vyhodnocení. [42]

c) Počet teoretických pater – N :

Charakterizuje účinnost chromatografické kolony, tzn. dosažení co nejlepší separace látek v nejkratším možném čase. Je to bezrozměrná veličina. Čím větší počet teoretických pater kolona má, tím je účinnější. Tato veličina závisí na délce kolony, retenčním čase, rychlosti průtoku mobilní fáze, velikosti částic náplně chromatografické kolony, teplotě a viskozitě mobilní fáze. Pro výpočet počtu teoretických pater se používá tato rovnice: $N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{50\%}} \right)^2$,

t_R – retenční čas

W – šířka píku při základně

$W_{50\%}$ – šířka píku v polovině jeho výšky. [14] [42] [43]

d) Faktor symetrie – A_S :

Faktor symetrie (A_S) popisuje tvar píku a tím charakterizuje kvalitu chromatografické separace. Vypočítá se podle vzorce: $A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}$

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

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku

Je-li hodnota A_S rovna jedné, tak je pík symetrický. Pokud je hodnota symetrie píku větší než jedna, pík chvostuje, a naopak pokud je menší než jedna, tak je pík čelně asymetrický, někdy se používá termín fronting. [42] [44]

e) Rozlišení – R_S :

Rozlišení je veličina popisující schopnost kolony separovat jednotlivé analyty. Je vyjádřeno jako poměr vzdáleností mezi dvěma vrcholy píků a hodnoty šířky píku na základní linii. [45] Rozlišení mezi píky dvou látek můžeme vypočítat podle vzorce:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2}-t_{R1})}{W_{h1}+W_{h2}},$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1}, t_{R2} – retenční časy

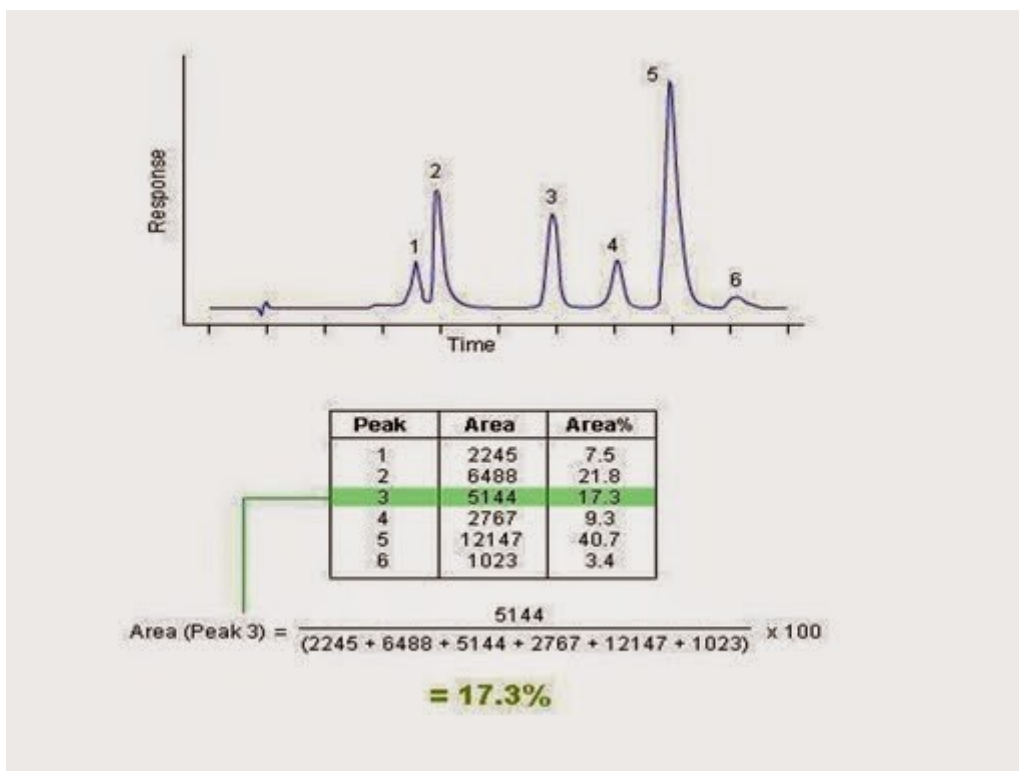
W_{h1}, W_{h2} – šířka píků v poloviční výšce [42]

Pokud je R_S stejné nebo větší než 1,5, tak jsou látky kompletně separovány až na základní linii, ale pokud je R_S nižší než 1,5, pak se látky překrývají, což velmi komplikuje jak jejich identifikaci, tak zejména kvantifikaci. [45]

1.1.5. Základní metody kvantitativní analýzy

a) Metoda normalizace

Metoda normalizace je široce využívána k určení relativního množství malých nečistot nebo degradačních produktů ve farmacii. Vyhodnocuje plochu každého píku chromatogramu jako procento z plochy všech píků dohromady. Na obrázku č. 3 můžeme vidět příklad takového výpočtu. Výhodou této metody je, že výpočet nezávisí na hmotnosti vzorku, objemu roztoku vzorku ani objemu nástřiku, takže eliminuje chyby při přípravě vzorku. Dalšími výhodami jsou jednoduchost pro rutinní používání a že nevyžaduje kalibrační krok (Douša, 2015). [46]



Obrázek č. 3 Příklad výpočtu pomocí metody normalizace [47]

b) Kalibrační křivka

Kalibrační křivka je grafické znázornění závislosti odezvy detektoru (plocha píku) na koncentraci analytu v kalibračním vzorku. Kalibrační křivka se sestojí změřením daného počtu standardů o různých koncentracích, které tvoří lineární křivku. Tyto vzorky zahrnují jak nižší, tak vyšší koncentraci než neznámý vzorek. Pomocí rovnice kalibrační křivky se vypočítá množství analytu v neznámém vzorku. [48] Často bývá kombinována s dalšími kvantifikačními přístupy, zejména s metodou vnitřního standardu.

c) Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu je nejjednodušší metoda kvantifikace. Její přesnost je závislá na reprodukovatelnosti injektovaného objemu. Pro provedení této metody jsou připraveny kalibrační standardy o známé koncentraci stanovované látky nebo jeden roztok standardu o podobné koncentraci jakou má mít stanovovaná látka. Injektováno je pokaždé stejné množství vzorku. Koncentrace stanovované látky je pak vypočtena podle této rovnice [45]:

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} * C_{St}$$

C_{Vz} – koncentrace vzorku

C_{St} – koncentrace standardu

A_{Vz} – plocha píku vzorku

A_{St} – plocha píku standardu

Z výšky nebo plochy píků a z koncentrací kalibračních standardů lze pak sestavit kalibrační křivku. Kalibrační křivka by měla být lineární a měla by procházet počátkem.

d) Metoda vnitřního standardu

Přestože je každá kvantifikační metoda účinná, metoda vnitřního standardu vede k nejvíce přesným a precizním výsledkům. Vnitřní standard (IS) je chemická látka podobné struktury jako analyt, se shodnými fyzikálně chemickými vlastnostmi a přibližně stejným retenčním časem. Také by se měl v případě potřeby derivatizovat podobně jako analyt. V této metodě je stejné množství IS, složky, která není přítomna ve vzorku, přidáno ke vzorku stanovované látky nebo k roztoku standardu o známé koncentraci. Dodatečně je důležité zajistit, aby byl IS stabilní a aby neinterferoval s žádnou složkou vzorku. IS by měl být přidán v rané fázi úpravy vzorku, aby mohl kompenzovat ztráty během přípravy nebo variabilitu během analytického stanovení. Kvantifikace je dosažena použitím poměru výšek nebo ploch píků analytu k IS podle následující rovnice [45]:

$$C_{Vz} = \left(\frac{A_{ISSt}}{A_{ISVz}} \right) * \left(\frac{A_{Vz}}{A_{St}} \right) * (C_{St})$$

C_{Vz} – koncentrace vzorku

C_{St} – koncentrace standardu

A_{Vz} – plocha píku vzorku

A_{St} – plocha píku standardu

A_{ISVz} – plocha píku vnitřního standardu vzorku

A_{ISSt} – plocha píku vnitřního standardu standardu

Stejně jako v případě metody vnějšího standardu lze i v tomto případě pomocí řady roztoků standardů o známe koncentraci s přidáním IS sestavit kalibrační křivku.

1.2. Metody úpravy vzorku před analýzou

Základní koncept úpravy vzorku je přeměnit reálnou matici na vzorek ve formě, která je kompatibilní s chromatografickou analýzou. Má dohromady tyto cíle:

- Odstranění potenciálních interferujících látek (např.: proteinů, iontů) ze vzorku kvůli separačnímu i detekčnímu stádiu, čímž dojde ke zvýšení selektivity a citlivosti metody.
- Zvýšení koncentrace analytu, tím i senzitivity stanovení.
- Pokud je to potřeba, tak převedení analytu na vhodnější formu pro separaci a detekci, například derivatizací.
- Poskytnutí robustní a reprodukovatelné metody, která je nezávislá na změnách ve vzorkové matici.

Toho můžeme dosáhnout různými metodami. Mezi základní metody úpravy vzorku patří extrakce mezi dvě nemísitelné kapaliny (LLE – Liquid Liquid Extraction), precipitace a extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction). [49]

1.2.1. Extrakce mezi dvě nemísitelné kapaliny (LLE – liquid liquid extraction)

Principem této metody je převedení analytu z jednoho rozpouštědla do druhého rozpouštědla, přičemž tato dvě rozpouštědla jsou navzájem nemísitelná nebo jenom částečně mísitelná. Často bývá jedním rozpouštědlem voda nebo polární kapalina (biologický materiál) a druhá je nepolární organické rozpouštědlo. Jako každý extrakční proces i LLE se sestává ze dvou kroků, a to z kroku mísení, kde dochází ke kontaktu obou fází, a rozdělování. [50] Jako nepolární rozpouštědlo se používá dichlormethan, chloroform, 1-chlorbutan, hexan nebo diethylether. [51]

1.2.2. Precipitace

Proteinová precipitace s mísitelnými organickými rozpouštědly (obvykle s acetonitrilem nebo methanolem) nebo s kyselinami (trifluoroctovou, trichloroctovou a chloristou [52]) je nejvíce využívaná metoda pro přípravu vzorků z plazmy, pro její instrumentální nenáročnost a ekonomičnost. Tato metoda vyžaduje přidání precipitačního činidla a centrifugaci, aby došlo k oddělení precipitátu od analytu. Precipitace poskytuje dostatečné přečištění matrice i pro většinu analýz pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí (LC-MS). [53]

1.2.3. Extrakce na pevnou fázi (SPE – Solid Phase Extraction)

a) Princip

Extrakce na pevnou fázi patří v současnosti mezi nejpoužívanější techniky pro přípravu vzorku. Výhodou SPE je vysoká selektivita, snížená spotřeba organických rozpouštědel [54], možnost automatizace a zakoncentrování analytu. [55] Principem této metody je retence molekul analytu na pevném sorbentu zakotveném v extrakční kolonce, na který je nanášen vzorek, a jeho následná eluce. [54]

b) Instrumentace

Kolonky pro SPE bývají zpravidla jednorázové. Sorbent volíme vždy v závislosti na povaze extrahované látky a objem kolonky a množství sorbentu na druhu a množství vzorku. Sorbenty jsou tvořeny částicemi o průměrné velikosti 50 μm , které kladou odpor protékající kapalině. Jsou uzavřeny fritami z polyethylenu, oceli nebo polytetrafluorethylenu. Průtok kapaliny přes kolonku lze urychlit třemi metodami: vakuem na výstupu kolonky, tlakem na vstupu kolonky a centrifugací. [54]

c) Sorbenty

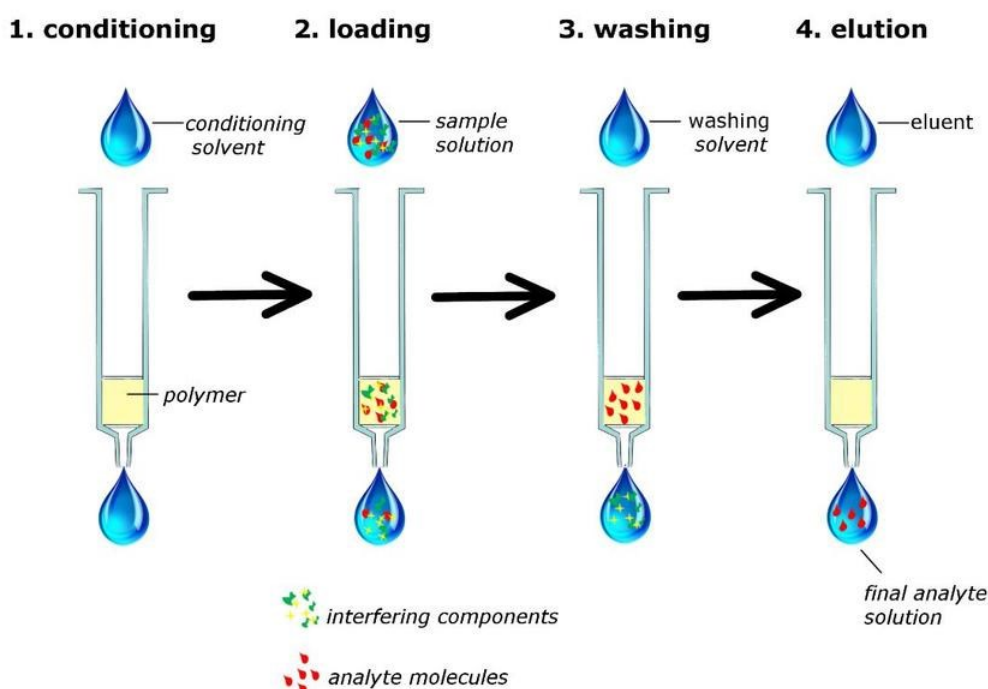
Sorbenty SPE kolonek se svým charakterem velmi podobají sorbentům používaným u HPLC kolon, rovněž jsou nejčastěji založené na bázi chemicky modifikovaných molekul silikagelu (nepolární a polární vázané fáze, iontoměniče, pryskyřice atd.). Při separaci se uplatňují různé molekulární interakce:

- Van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce)
- Vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce)
- Kation-aniontové interakce (iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty) [54]

Pro látky iontové povahy je vhodné použít SPE kolonku s iontoměničem. Jako **iontově-výměnný sorbent** můžeme použít aminopropylovou vázanou fázi, trimethylamoniumpropyl-chloridovou fázi (výměna aniontů – anexy), benzensulfonovou i propansulfonovou (výměna kationtů – katexy). Karboxypropylová skupina je slabým iontoměničem typu katex pro extrakci bazických sloučenin z roztoků o $\text{pH}=6,8$ a vyšším. [54]

Aby docházelo k elektrostatické retenci, musí být analyt i funkční skupiny sorbentu v ionizované formě. Toho je docíleno kontrolou pH vzorku. Pro bazické analyty by mělo být pH upraveno alespoň o dvě jednotky pH pod pK_A molekuly. Pro kyselé analyty by mělo být pH upraveno alespoň o dvě jednotky pH nad pK_A molekuly. Pro eluci by mělo být pH nastaveno opačně o dvě jednotky pH, aby došlo efektivně k neutralizaci jedné nebo obou funkčních skupin a rozrušení elektrostatických interakcí mezi analytem a sorbentem. [56] [57]

Typický postup při SPE je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Základní postup při extrakci na pevnou fázi [58]

d) Podrobný postup SPE

Příprava vzorku před extrakcí – Tento krok usnadní zadržení analytů v extrakční kolonce. V případě separace na iontovýměnných fázích jde o úpravu pH, aby byl analyt i funkční skupiny sorbentu ionizované.

Solvatace kolonky 1a (Conditioning) – Aby spolu funkční skupiny sorbentu a analyt správně interagovaly, musí být sorbent roztokem vzorku smáčen. Toho docílíme solvatací za použití vhodného zpravidla organického rozpouštědla.

Předrovnovážná úprava kolonky 1b (Conditioning)– Kolonku promyjeme stejným rozpouštědlem, ve kterém je rozpuštěn vzorek. Tím vytvoříme podmínky podporující retenci analytu.

Aplikace vzorku 2 (Application) – Při nanášení vzorku na SPE kolonku je důležité sledovat zejména rychlost průtoku, která ovlivňuje účinnost interakce mezi analytem a sorbentem.

Promývání kolonky 3 (Washing) – Účelem promývacího kroku je odstranění nežádoucích příměsí z roztoku vzorku. Používáme-li iontově výměnné fáze, je důležité správné nastavení pH promývací kapaliny.

Eluce analytu z kolony 4 (Elution) – Posledním krokem je vymytí analytu, který je zadržen v sorbentu elučním činidlem. Pokud by byla rychlost průtoku činidla příliš vysoká, nemusel by být analyt získán kompletně. [54] Vhodná je rychlost 1-2 kapky za sekundu. [56]

1.3. Validace

Validace je proces, kterým se potvrzuje, že analytické vybavení, metoda nebo systém pro konkrétní měření jsou vhodné pro zamýšlené použití. Úspěšná chromatografická analýza závisí na přesném výkonu HPLC vybavení. [59] [60] Dále jsou uvedeny základní validační parametry.

a) Přesnost (Accuracy)

Přesnost vyjadřuje shodu mezi naměřeným výsledkem a přesnou hodnotou. Přesnou hodnotu můžeme zjistit nezávislou metodou s ověřenou přesností nebo přípravou modelového vzorku se stejným množstvím analytu a přesně přidaným množstvím standardu. Přesnost se stanoví analýzou několika paralelních vzorků a vyjádří se jako rozdíl mezi přesnou (referenční) a získanou hodnotou. [61]

b) Preciznost (Precision)

Preciznost vyjadřuje míru shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek. Preciznost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k přesné hodnotě. Míra preciznosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek. [62]

c) **Linearita (Linearity)**

Linearita analytického postupu je schopnost získat výsledky měření, které jsou přímo úměrné koncentraci nebo množství analytu ve vzorku. Tato přímá úměrnost platí pouze pro ověřený rozsah. [63] Je stanovena změřením řady standardů zředěných pomocí rozpouštědla minimálně na pět koncentračních hladin v rozmezí 50–150 % očekávaného pracovního rozsahu. [64] Jinými slovy je stanovena při změřením kalibrační křivky.

d) **Výtěžnost (Recovery)**

Veličina, která popisuje poměr množství analytu přítomného nebo přidaného k analytickému dílu zkoušeného materiálu, který je extrahován a předložen k měření. Dále ji můžeme popsat jako podíl koncentrace analytu zjištěné ke koncentraci, která je uvedena jako přítomná. [65] Nejčastěji bývá stanovena metodou postextrakčního přídávku, kdy je nejprve k biologické matrici přidán analyt o známe koncentraci, extrahován danou metodou a naměřená koncentrace je pak porovnávána s koncentrací analytu ve vzorku, kam byl analyt přidán až po extrakci prázdné (blank) matrice. Procentní výtěžnost přidaného standardu se dá vypočítat podle následující rovnice: [66]

$$Recovery = 100 \times \left(\frac{\text{extrahovaný vzorek s analytem}}{\text{extrahovaná matrice s přidaným analytem po extrakci}} \right) [\%]$$

[67]

e) **Limit detekce (Limit of Detection)**

Mez detekce (LOD) je nejnižší koncentrace, která může být detekována se statistickou významností pomocí daného analytického postupu. [68]

f) **Limit kvantifikace (Limit of Quantification)**

Limit kvantifikace (LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, která může být kvantitativně detekována s uvedenou přesností a precizností. [69]

1.4. Preklinické hodnocení léčiv a farmakokinetika

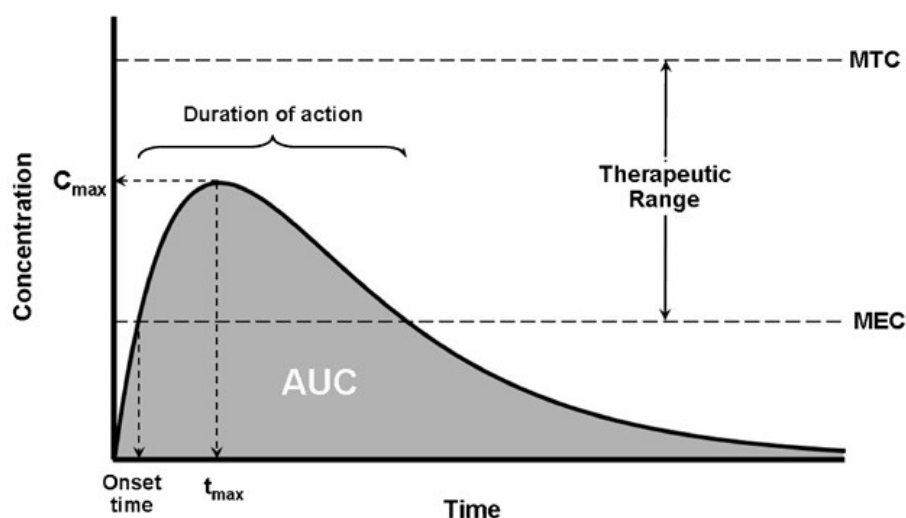
Preklinické hodnocení předchází testování léčiva na lidech (klinickou studii) a začíná s výběrem perspektivní molekuly. Preklinické hodnocení zahrnuje zhodnocení designu léčiva, který je navržen pomocí počítače (*in silico*), chemických vlastností, genotoxicity a obecné toxicity, které probíhají pomocí laboratorních pokusů (*in vitro*), a toxikokinetickou a farmakokinetickou studii na modelových organismech jako jsou potkani (*in vivo*). [70]

Farmakokinetika může být definována jako studium dynamických pohybů cizích chemikálií (xenobiotik) během jejich průchodu tělem. Zahrnuje absorpci, distribuci, biotransformaci/metabolismus a vylučování (ADME – Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion). Používá matematické rovnice (modely) k popisu časového průběhu ADME xenobiotik v těle. To umožňuje lépe porozumět, interpretovat, a dokonce předpovídat povahu a rozsah biologických (terapeutických nebo toxických) účinků xenobiotik. [71]

Mezi základní farmakokinetické parametry patří:

a) Plocha pod křivkou (AUC – Area under Curve)

Plocha pod křivkou závislosti plazmatické koncentrace léčiva v čase (AUC) odráží skutečnou expozici léčivu po podání dávky léčiva a je vyjádřena v $\text{mg}\cdot\text{h/l}$. Graf AUC můžeme vidět na obrázku č. 5. [72]



Obrázek č. 5 Graf plochy pod křivkou (AUC) [73]

b) Maximální koncentrace (C_{\max} – Maximal Concentration)

C_{\max} je pozorovaná maximální koncentrace léčivé látky v jakékoli biologické matrici, která je hodnocena. [74]

c) Čas do maximální koncentrace (T_{\max} – Time to the Maximal Concentration)

T_{\max} je čas do dosažení maximální koncentrace léčivé látky v jakékoli matrici, která je hodnocena. [75]

1.5. Antidota otrav organofosfáty

1.5.1. Otrava organofosfáty

Organofosfáty jsou používány jako herbicidy, pesticidy, insekticidy a také jsou zneužívány jako bojové chemické látky ze skupiny NPL. [1] Nervově paralytické látky se dělí na dvě velké skupiny, které jsou označovány jako G látky a V látky. Mezi G látky patří sarin, soman, tabun a cyklosin. Mezi V látky řadíme látku VX. [76]

Primární mechanismus toxicity OP je inhibice AChE. [2] Tento enzym je klasifikovaný jako B-esteráza, jejíž hlavní role je hydrolyza ACh, jednoho z hlavních neurotransmiterů v periferním a centrálním nervovém systému. [3] Organofosfáty interferují s katalytickým místem AChE fosforylací serinového zbytku za vzniku fosforylovaného aduktu. [2] Tato inhibice narušuje schopnost enzymu navázat svůj normální substrát ACh, což způsobuje jeho akumulaci v nervových zakončeních. Následkem toho se objevuje nadměrná stimulace centrálních i periferních muskarinových a nikotinových receptorů manifestující se závažnými klinickými příznaky viz tabulka č. 2. [3]

Tabulka č. 2 Klinické příznaky otravy organofosfáty [77]

Příznaky kvůli nadměrné stimulaci muskarinových acetylcholinových receptorů	Bronchospazmus
	Bronchorrhoea
	Mióza
	Lakrimace
	Průjem
	Hypotenze
	Bradykardie
	Zvracení
	Salivace
Příznaky kvůli nadměrné stimulaci nikotinových acetylcholinových receptorů v sympatickém nervovém systému	Tachykardie
	Mydriáza
	Hypertenze
	Pocení
Příznaky kvůli nadměrné stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů v centrálním nervovém systému	Zmatenost
	Agitace
	Koma
	Respirační selhání
Příznaky kvůli nadměrné stimulaci nikotinových acetylcholinových receptorů v nervosvalové ploténce	Svalová slabost
	Paralýza
	Fascikulace

1.5.2. Antidotní terapie otrav organofosfáty

Okamžitá lékařská intervence při akutní otravě organofosfáty zahrnuje život zachraňující podání atropinu spolu s oximovým reaktivátorem AChE a diazepamem. [8] V nejdůležitějších případech léčba zahrnuje resuscitaci pacientů, podávání kyslíku, léčiv a tekutin. Pacienti musí být pečlivě sledováni po stabilizaci kvůli zhoršování dýchacích funkcí a kvůli rekurentním cholinergním příznakům, které se objevují u organofosfátů rozpustných v tucích. [77]

Při antidotní terapii otrav organofosfáty se uplatňují tato léčiva:

a) Antagonisté muskarinových receptorů

Atropin je základem antidotní léčby od padesátých let. Je to kompetitivní nescifický antagonist muskarinových receptorů s dobrou penetrací do centrálního nervového systému. Atropin je podáván intravenózně, aby byly rychle obnoveny kardiopulsační funkce. Používá se ke zvrácení bradykardie, zlepšení systolického tlaku, snížení bronchorrhey, reverzního bronchospazmu a zlepšení oxygenace. [8]

Atropin, léčivo první volby při akutní OP otravě, je potřeba podat hned, jak je diagnostikována cholinergní krize, aby bylo zabráněno nadměrné stimulaci centrálních a periferních muskarinových receptorů a následně, aby byly obnoveny vitální funkce. [78]

b) Oximové reaktivátory acetylcholinesterázy

Oximové reaktivátory odstraňují zbytek organofosfátu z inhibované AChE. Schopnost oximu zvrátit inhibici ACh je mimo jiné závislá na použitém OP, jelikož jejich reaktivační účinnost se napříč spektrem OP značně liší. V současné době není k dispozici žádný širokospektrý reaktivátor. Absence širokospektré aktivity není jedinou limitací klinicky používaných reaktivátorů. Vzhledem k jejich struktuře jen velmi málo přestupují HEB a jsou tak méně přístupné pro reaktivaci centrální AChE. Terapie oximy tak může selhat kvůli otravě vysokými dávkami OP, neadekvátnímu dávkování oximy, nedostatečné délce podávání oximů a procesu označovanému jako „stárnutí enzymu“, který vede k permanentní inaktivitě AChE a rezistenci vůči reaktivátorům. [78] Světová zdravotnická organizace doporučuje, aby byly oximy podány všem symptomatickým pacientům, kterým je podáván atropin. [77]

c) Benzodiazepiny

Diazepam je také jeden z první linie léčiv doporučených při otravě OP. Diazepam je podáván jako prevence proti křečemi-indukovanému poškození mozku speciálně u pacientů intoxikovaných nervově paralytickými látkami, kde se křeče objevují mnohem častěji než u pacientů otrávených insekticidy. Dodatečně je podání diazepamu doporučeno jako úleva od úzkosti, agitace a ke zmírnění svalových záškubů. [78]

1.5.3. Oximy

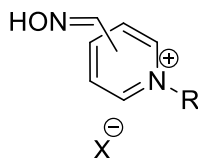
a) Mechanismus účinku oximů

Reaktivátory AChE působí tak, že přerušují vazbu mezi ACh a organofosfátem a tím uvolňují ACh. Jejich účinek se projevuje nejvíce na nikotinových receptorech (v neuromuskulárních spojeních). [79] K přerušení vazby dochází díky nukleofilní substituci, která probíhá mezi komplexem OP–AChE a oximem. Nukleofilní vlastnosti oximů vysvětluje ionizovaný stav, který je typický pro kvarterní amoniovou skupinu. [7]

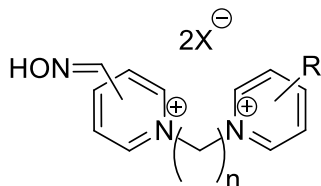
b) Struktura oximů

Reaktivátory AChE jsou poměrně rozmanitá skupina látek, kterou lze ale popsat společnými strukturními charakteristikami, které zásadně ovlivňují afinitu reaktivátoru k inhibované AChE a tím vlastní reaktivační účinnost oximu. Jedná se o:

- Nabitý nebo nenabitý systém s jedním nebo dvěma zpravidla aromatickými kruhy (pyridin, imidazol)
- Sloučeniny s kvarterním dusíkem, který je součástí aromatického kruhu a má zásadní vliv na afinitu vůči AChE; podle počtu nabitých dusíků v molekule reaktivátoru rozlišuje monokvarterní a biskvarterní struktury, které můžeme vidět na obrázcích č. 6 a 7
- Struktury s jednou nebo více funkčními aldoximovými skupinami na pyridiniovém jádře v pozici 2, 3 nebo 4, které jsou zodpovědné za vlastní reaktivační účinek sloučeniny; přítomnost, pozice a počet oximových skupin ovlivňují afinitu k inhibované AChE
- Sloučeniny, které mohou mít navázané alifatické nebo aromatické postranní ligandy (např.: karbamoyl, methyl, fenyl, amid nebo chlor [80] [81]) připojené ke kruhu/ kruhům
- V případě biskvarterních sloučenin jsou pyridiniová jádra propojena různými spojovací můstky (etherový, alkylenový, xylenový můstek); délka a rigidita spojovacího můstku mezi kruhy ovlivňuje afinitu k inhibované AChE. [82] [83]



Obrázek č. 6 Obecný vzorec monokvarterního oximu



Obrázek č. 7 Obecný vzorec biskvarterního oximu

Přesto, že bylo v minulosti připraveno velké množství strukturně odlišných molekul oximů, bispyridiniové oximy stále zůstávají základními strukturami, které vykazují nejvyšší reaktivační účinnost. Obecně špatná prostupnost oximů HEB vede ke snaze připravit takové oximy, které by díky své zvýšené lipofilitě lépe pronikaly do mozku. Toho lze dosáhnout například strukturními obměnami v molekulách oximů.

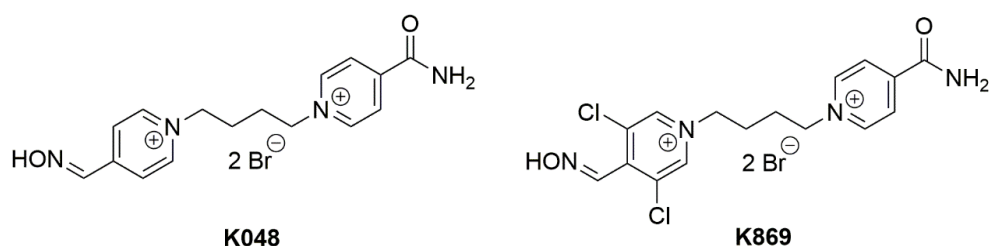
Jedna z možných cest, jak pozitivně ovlivnit lipofilní vlastnosti těchto sloučenin je substituce pyridinového kruhu nesoucího oximovou skupinu s elektronodtahující skupinou, například atomem chloru, který sníží hodnotu pK_A oximové skupiny. Tento přístup zvyšuje šanci na vznik oximátu, funkčního nukleofilu, který je nezbytný pro reaktivaci inhibované AChE. [9]

c) K869

Oxim K869, jehož farmakokinetika je předmětem této diplomové práce, je strukturní analog dříve syntetizovaného reaktivátoru K048. V dřívějších studiích vykazoval oxim K048 nadějnou reaktivační účinnost a relativně nízký výskyt toxických nežádoucích účinků, ale jeho koncentrace v CNS významně nepřevýšila hladiny klinicky používaných bispyridiniových oximů (pralidoxim, azoxim, obidoxim).

Strukturně je oxim K869, stejně jako oxim K048, biskvarterní asymetrický aldoxim se dvěma pyridinovými kruhy spojenými tetramethylenovým můstkem. Pyridiniový kruh nesoucí oximovou skupinu je však substituován dvěma atomy chloru

v pozicích 3 a 5. Druhý kruh nese karbamoylový zbytek v pozici 4. Oximy K869 a K048 můžeme vidět na obrázku č. 8.



Obrázek č. 8 Oxim K048 a K869 [9]

Na základě *in vitro* testování vykázal oxim K869 v porovnání s oximem K048 za fyziologického pH vyšší schopnost vytvářet oximát. Zároveň byla také testována jeho schopnost procházet přes biologickou membránu *in vitro* pomocí systému PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Systém PAMPA je používán jako *in vitro* model pasivní difuze. [84] I v tomto případě byla oproti oximu K048 zjištěna vyšší prostupnost přes biomembránu. Na základě *in vitro* dat byl tedy oxim K869 dále postoupen k dalšímu testování *in vivo* za účelem studia jeho farmakokinetických vlastností. [9]

2. Cíl práce

Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené se spektrofotometrickou detekcí (HPLC-UV/VIS) pro stanovení nového oximového reaktivátoru AChE K869, aplikovat tuto metodu na reálné biologické vzorky pocházející z *in vivo* experimentu, kdy byl oxim intramuskulárně aplikován potkanům a ze získaných dat stanovit základní farmakokinetický profil látky K869 v plazmě a distribuci do ledvinové tkáně.

3. Materiál a metodika

3.1. Chemikálie a spotřební materiál

- Oxim K869 (1-(4-(4-carbamoylpyridin-1-ium-1-yl)butyl)-3,5-dichloro-4-((hydroxyamino)methyl)pyridine-1-ium dibromid) a azoxim (HI-6; 1-(((4-carbamoylpyridin-1-ium-1-yl)methoxy)methyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium dimethylsulfonát) byly syntetizovány na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Čistota oximu K869 (98 %) a azoximu (97 %) byla potvrzena pomocí HPLC-UV (Zorbaz et al., 2018). [81]
- Kyselina citronová, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), edetan disodný (EDTA), sodná sůl kyseliny oktan-1-sulfonové, kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4), kyselina trichloroctová (TCA), hovězí sérový albumin (BSA) a acetonitril (ACN) pro HPLC (gradient grade, $\geq 99,9 \%$) byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Ultračistá voda (dále jen voda) byla získána pomocí Millipore purification system od Merck – Millipore (Darmstadt, Německo).
- Centrifugační mikrozukmavky a jednorázové pipetovací špičky byly zakoupeny u Eppendorf (Hamburk, Německo).
- SPE kolony Supelclean™ LC-WCX SPE Tubes (1ml 100ng/1ml) byly zakoupeny u SUPELCO (Bellefonte, PA, USA).

3.2. Přístrojové vybavení a chromatografické příslušenství

- Manifold pro SPE extrakci Visiprep 24DL od SUPELCO (Bellefonte, PA, USA)
- Centrifuga CL31R Multispeed centrifuge od Thermo-Fisher Scientific (San Jose, CA, USA)
- Termostatované zařízení pro odpařování vzorků proudem inertního plynu TERMOVAP TV 10 Sample concentrator (Termovap) od Ecom (Praha, ČR)
- Ultrazvuková lázeň U-3 STH od ECOSON (Nové Mesto nad Váhom, SR)
- Třepačka Wizard Advanced IR Vortex mixer od VELP Scientifica (Usmate, Itálie)
- Automatické pipety od Eppendorf (Hamburk, Německo)
- pH metr pH 8+ DHS Stirrer od XS Instruments (Carpi, Itálie)

- analytické váhy ABT 220-4M od KERN (Balingen, Německo)
- homogenizátor TURAX T25 od IKA Labirtechnik (Staufen, Německo)
- sonikátor UP50H Compact Lab Homogenizer od (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Německo)
- HPLC sestava Shimadzu Prominence HPLC modular system tvořená odplyňovací jednotkou DGU-20A Prominence Degasser, binárním vysokotlakým čerpadlem LC-20AT Liquid Chromatography Pump, automatickým dávkovačem vzorku SIL-20A Prominence Autosampler, termostatovaným kolonovým prostorem CTO-20A Column Oven, UV-VIS detektorem SPD-20A UV/VIS Detector a řídicí jednotkou CBM od Shimadzu (Kyoto, Japonsko)
- Chromatografická kolona Phenomenex KINETEX C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm , 100 Å) vybavená předkolonou Phenomenex SecurityGuard C18 (4 x 3 mm) od Phenomenex (Torrance, CA, USA)

3.3. Příprava vzorků a plán projektu

Samci potkana kmene Wistar staří 12 až 16 týdnů o váze 220 ± 20 g (Velaz s.r.o., Prague, Czech Republic) byli chováni ve standardních podmínkách (teplota 21 ± 1 °C, 12/12 h cyklus světlo/tma; vivárium Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany) s volným přístupem ke standardnímu krmivu (Cerea corp., Pardubice, Czech Republic) a k pitné vodě. Minimální aklimatizační doba byla 10 dní před experimenty. Potkanům byl podán oxim K869 v dávce 45 mg/kg (ve fyziologickém roztoku) i.m., která byla odvozena od dříve stanovené MTD (maximální tolerovaná dávka) a odpovídá 50 % MTD. [9] Byla sledována absorpce z místa podání (n=6 pro každou skupinu).

1. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 5 minut
2. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 10 minut
3. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 15 minut
4. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 20 minut
5. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 30 minut
6. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 60 minut
7. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 120 minut
8. Skupina – aplikace oximu K869 i.m. a usmrcení za 240 minut

Usmrcení proběhlo v hluboké narkóze, způsobené vysokou koncentrací CO₂, odběrem krve z dolní duté žíly (*vena cava inferior*). Následně byla injekční stříkačkou

odebrána moč z močového měchýře a žluč ze žlučníku. Poté byla provedena thorakotomie. Do levé komory srdeční byla zavedena i.v. kanyla, kterou bylo celé tělo perfundováno fyziologickým roztokem. Pro odtok přebytku fyziologického roztoku bylo ustříženo pravé srdeční ouško. Po osmi minutách perfuze byly vyjmuty mozek a periferní orgány zvířete (játra a ledviny). Odebrané vzorky byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby HPLC analýzy.

Všechny experimentální procedury a protokoly byly zkontrolovány a schváleny Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové Univerzity Obrany v Brně (protokol X/19).

3.4. Příprava mobilní fáze a standardních roztoků pro analýzu

3.4.1. Mobilní fáze

Vodná složka (A) mobilní fáze se skládala z:

- 1mM kyseliny oktan-1-sulfonové
- 0,06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- 0,03mM EDTA
- 0,05mM kyselina citronová

pH mobilní fáze na hodnotu 3,5 bylo upraveno pomocí H_3PO_4 .

Organická složka (B) byla tvořena acetonitrilem.

3.4.2. Zásobní roztoky

5 ml zásobního roztoku oximu K869 ($M_w = 369,25\text{ g/mol}$) nebo azoximu (IS; $M_w = 287,21\text{ g/mol}$) o koncentraci 1 mg/ml (vztaženo na hmotnost kationtu) bylo připraveno rozpuštěním příslušné soli v daném rozpouštědle. Zásobní roztok K869 byl připraven rozpuštěním 7,1638 mg dibromidu ($M_w = 529,05\text{ g/mol}$) ve vodě. Zásobní roztok azoximu byl připraven rozpuštěním 8,3125 mg dimethylsulonátu ($M_w = 477,49\text{ g/mol}$) v citrát-fosforečnanovém pufru. Takto připravené zásobní roztoky byly rozpipetovány po 1 ml a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Citrát-fosforečnanový pufr:

Tento pufr se skládá ze směsi 27,8 ml 0,1M kyseliny citronové a 22,2 ml 0,2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, zředěné na 100 ml vodou. pH pufru bylo upraveno na hodnotu 4,4 pomocí H_3PO_4 .

3.4.3. Pracovní roztoky

Pracovní roztoky oximu K869 nebo IS o koncentraci 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byly připraveny zředěním příslušného zásobního roztoku vodou. Pracovní roztoky byly připravovány týdně a uchovávány v lednici při 4°C.

Směsný pracovní roztok K869 a IS o koncentraci 250 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byl připraven zředěním příslušných zásobních roztoků vodou za účelem vývoje a optimalizace HPLC metody.

3.5. Optimalizace extrakce oximu K869 pomocí SPE z plazmy

- Pro optimalizaci SPE byly zkoušeny 2 směsi elučního činidla:
- směs ACN: HCOOH (98 %): H_2O (9:0,5:0,5)
- směs ACN: 20 % TCA (9:1)

SPE na kolonkách Supelclean LC-WCX bylo prováděno následujícím způsobem:

- 1 ml ACN + 1 ml H_2O (aktivace a kondicionace kolonky)
- nanesení vzorku (~ 1000 μl)
- 1 ml voda + 1 ml ACN (promytí kolonky a odstranění balastních látek)
- 1,6 ml elučního činidla

odpaření pomocí plynného dusíku (TERMOVAP TV 10 Sample concentrator)

rekonstituce ve 200 μl vody

Pro optimalizaci extrakce K869 z plazmy byly připraveny:

- vzorky plazmy s oximem K869 o koncentracích 1, 5, 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=2) připravené smísením 200 μl čisté plazmy, příslušného množství K869 (c= 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 μL IS (c= 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a doplněním vodou na výsledný objem 1000 μl . Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.
- vzorky plazmy s oximem K869 o koncentracích 1, 5, 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=2) připravené přidáním příslušného množství K869 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 10 μl IS

(200 µg/ml) ke 200 µl čisté plazmy předem zředěné na 1000 µl a zpracované pomocí SPE.

- vodné vzorky oximu K869 o koncentracích 1, 5, 25 a 100 µg/ml (n=2) připravené smísením příslušného množství K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) a doplněním vodou na výsledný objem 200 µl.
- vodné vzorky oximu K869 o koncentracích 1, 5, 25 a 100 µg/ml (n=2) připravené smísením příslušného množství K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) a doplněním vodou na výsledný objem 1000 µl. Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.

Optimalizace výtěžnosti SPE pro K869 z plazmy

- vzorky plazmy připravené smísením 20 µl K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) a 200 µl plazmy zředěné na výsledný objem 1000 µl (n=2). Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.
- vzorky plazmy připravené smísením 20 µl K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) a 200 µl plazmy zředěné na výsledný objem 1000 µl (n=2). Vzorky byly na 5 min ponořeny do ultrazvukové lázně. Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.
- směsný roztok připravený smísením 20 µl pracovního roztoku K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) pracovního roztoku IS a 200 µl roztoku BSA a koncentraci 40 mg/ml zředěný na výsledný objem 1000 µl (n=2). Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.
- směsný roztok připravený smísením 20 µl pracovního roztoku K869 (200 µg/ml), 10 µl IS (200 µg/ml) a 200 µl předem precipitované plazmy pomocí 1000 µl ACN, odpařené dosucha a rekonstituované ve 200 µl vody a dále zředěné na výsledný objem 1000 µl (n=2). Vzorky byly dále zpracovány pomocí SPE.

3.6. Optimalizace extrakce oximu K869 z tkání

3.6.1. Mozková tkáň

Mozková tkáň byla pre-homogenizována pomocí homogenizátoru 30 sekund ve vodě (v poměru 1:2 tkáň/voda) a následně sonikována 5 minut. Poté bylo odebráno příslušné množství homogenátu a zpracováno precipitací nebo pomocí SPE.

- Precipitace

K 200 (n=2) nebo 400 (n=2) μ l homogenátu mozkové tkáně bylo přidáno 25 μ l roztoku K869 a 5 μ l IS (200 μ g/ml). Poté bylo k 200 a 400 μ l homogenátu přidáno 800 a 1600 μ l ACN, centrifugováno při 1500 \times g při laboratorní teplotě 10 minut, supernatant byl odebrán a odpařen pod proudem dusíku pomocí TERMOVAPU při 50 °C do sucha a odparek byl rekonstituován ve 200 μ l H₂O.

K 200 (n=2) nebo 400 (n=2) μ l homogenátu mozkové tkáně bylo přidáno 25 a 5 μ l roztoku K869 a IS (200 μ g/ml). Poté bylo k 200 a 400 μ l homogenátu přidáno 800 a 1600 μ l ACN, centrifugováno při 1500 \times g při laboratorní teplotě 10 minut, supernatant byl odebrán a opařen pod proudem dusíku pomocí TERMOVAPU při 50 °C do sucha a odparek byl rekonstituován ve 1000 μ l H₂O a dále zpracováno pomocí SPE (viz kapitola 3.7.1.).

- SPE

K 200 (n=2) nebo 400 (n=2) μ l homogenátu mozkové tkáně bylo přidáno 25 a 5 μ l roztoku K869 a IS (200 μ g/ml). Poté bylo ke 200 a 400 μ l homogenátu přidána H₂O na výsledný objem 1000 μ l a dále zpracováno pomocí SPE (viz kapitola 3.7.1.).

3.6.2. Jaterní a ledvinová tkáň

Jaterní a ledvinová tkáň byly pre-homogenizovány pomocí homogenizátoru 30 sekund ve vodě (v poměru 1:2 tkáň/voda) a následně sonikovány 5 minut. Poté bylo odebráno 400 μ l homogenátu a vzorek byl dále upraven pomocí SPE (viz. kapitola 3.7.1.).

3.7. Výsledný postup pro zpracování vzorků

3.7.1. Plazma

Krevní vzorky byly odebrány od potkanů pod hlubokou terminální anestezií přímo srdeční punkcí do heparinizovaných 1,5 ml zkumavek. Vzorky byly okamžitě centrifugovány při 3000 x g 10 min při 10 °C, aby byla získána plazma. Takto upravená plazma byla uchována v mrazáku při -80 °C až do HPLC analýzy.

Po rozmrazení bylo k 200 µl plazmy přidáno 10 µl IS a celý vzorek byl naředěn 790 µl vody na 1000 µl. Dále proběhla extrakce na tuhou fázi (SPE – Solid Phase Extraction) s pomocí kolonky Supelclean LC-WCX. Kolonka byla aktivována 1 ml ACN (acetonitril), dále byla kondicionována 1 ml vody, následovalo nanesení vzorku bez použití podtlaku. Kolonka byla promyta 1 mililitrem vody a 1 ml ACN. Analyt byl extrahován promytím 1,6 ml elučního činidla (ACN/H₂O/FA; 9/0,5/0,5; v/v/v; 100 ml). Eluční činidlo bylo odpařeno pomocí TERMOVAPU pod proudem dusíku při 50 °C a odparek byl rekonstituován ve 200 µl vody. Takto byly vzorky připravené pro HPLC analýzu.

3.7.2. Ledviny

Ledviny byly prehomogenizovány pomocí homogenizátoru 30 sekund ve vodě (v poměru 1:2 ledvinová tkáň/voda) a následně sonikovány 5 minut. Potom bylo k 400 µl homogenátu přidáno 10 µl IS (200 µg/ml), centrifugováno při 1500 × g při laboratorní teplotě 10 minut a 200 µl výsledného supernatantu bylo dále zpracováno jako vzorky plazmy (SPE) postupem uvedením v kapitole 3.7.1.

3.8. Kvantifikace oximu K869 v biologickém materiálu

Kalibrační vzorky pro oxim K869 v plazmě:

- K 200 µl potkaní plazmy bylo přidáno 10 µl IS (200 µg/ml), 1, 5, 10, 20, 35, 50 a 75 µl roztoku látky K869 (200 µg/ml) a celý vzorek byl zředěn příslušným množstvím destilované vody na 1000 µl (n=5). Vzorek byl dále zpracován postupem uvedeným v kapitole 3.7.1.

Kalibrační vzorky oximu K869 v ledvinách:

- K 400 µl homogenátu získaného postupem uvedeným v kapitole 3.6.2. bylo přidáno 10 µl IS, 1, 5, 10, 20, 35 a 50 µl roztoku látky K869, centrifugováno

při 1500 × g při laboratorní teplotě 10 minut a 200 µl výsledného supernatantu bylo dále zpracováno jako vzorky plazmy (SPE) postupem uvedením v kapitole 3.7.1.

3.9.HPLC metoda

Chromatografická separace byla prováděna na koloně KINETEX C18 v iontově-párovém módu při 40 °C v režimu izokratické eluce při průtoku 0,340 ml/min. Mobilní fáze se skládala z vodné složky A (fosfátový pufr s obsahem kyseliny oktan-1-sulfonové) a organické složky B (ACN) v poměru 86:14 (v/v). Detekce byla prováděna v UV oblasti při 305 nm (absorpční maximum K869). Objem nástřiku byl 20 µl.

3.10. Validace

Příprava vzorků

Vzorky pro zjištění limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ) pro roztok standardu K869 byly připraveny o koncentracích 1; 0,7; 0,5; 0,3; 0,2 a 0,1 µg/ml. Podrobný postup přípravy je rozepsán v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Postup přípravy vzorků pro zjištění limitu detekce a kvantifikace pro roztok standardu K869

c K869 (µg/ml)	K869 20 µg/ml (µl)	IS 20 µl/ml (µl)	H ₂ O (µl)
1,00	10	10	180
0,7	7	10	183
0,5	5	10	185
0,3	3	10	187
0,2	2	10	188
0,1	1	10	189

Přesnost, preciznost a výtěžnost extrakce byly stanoveny opakovaným měřením vzorků plazmy s přidavkem K869 na 4 koncentračních hladinách 1, 5, 20 a 50 µg/ml (n= 5) a ledvinového homogenátu s přidavkem K869 na 3 koncentračních hladinách 3,1; 15,3 a 107,4 (n= 5) postupy uvedenými v kapitole 3.7.1. a 3.7.2.. Podrobně rozepsaný postup přípravy je uveden v tabulce č. 4 a č. 5. Pro stanovení výtěžnosti byly paralelně připraveny vzorky metodou postextrakčního přidavku; 200 µl plazmy nebo 400 µl

ledvinového homogenátu bylo upraveno postupy uvedenými v kapitolách 3.7.1. a 3.7.2. tak, že příslušné množství standardu K869 a IS (tabulka 4 a 5) bylo přidáno k extraktu po provedení SPE prázdne matrice.

Tabulka č. 4 Postup přípravy vzorků pro změřeni přesnosti, preciznosti a výtěžnosti v potkaní plazmě

c (K869) v plazmě (µg/ml)	K869 200 µg/ml (µl)	IS 200 µl/ml (µl)	Potkaní plazma (µl)	H ₂ O (µl)
1	1	10	200	789
5	5	10	200	785
20	20	10	200	770
50	50	10	200	740

Tabulka č. 5 Postup přípravy vzorků pro změřeni přesnosti, preciznosti a výtěžnosti v ledvinovém homogenátu

c (K869) v ledvinové tkáni (µg/g)	K869 200 µg/ml (µl)	IS 200 µl/ml (µl)	homogenát (µl)	H ₂ O (µl)
3,1	1	10	400	589
15,3	5	10	400	585
107,4	35	10	400	555

3.11. Stabilita

Stabilita zásobních roztoků byla měřena pro nízkou (1 µg/ml), střední (20 µg/ml) a vysokou (75 µg/ml) koncentraci K869. Každý vzorek byl změřen třikrát pro stabilitu při 4 °C, při opakovaném rozmrazení při -20 °C a stabilitu dlouhodobou při -20 °C. Podrobný postup přípravy vzorků je popsán v tabulce č. 6.

Tabulka č 6 Postup přípravy vzorků pro měření stability

Koncentrace K869	K869 (µl)	IS (µl)	H ₂ O (µl)
K869 1 µg/ml (n = 3)	3	30	567
K869 20 µg/ml (n = 3)	60	30	510
K869 75 µg/ml (n = 3)	225	30	345

4. Výsledky

4.1. Stabilita

V tabulce č. 7 jsou uvedeny výsledky měření stability oximu K869 v roztocích při koncentracích 1, 20 a 75 µg/ml a IS při koncentraci 10 µg/ml (n=3). Stabilita roztoků byla sledována při uchování ve 4 °C (lednice) a -20 °C (mrazák) při opakovaném rozmrazení a dlouhodobém skladování. Výsledky jsou vyjádřeny v % vzhledem k původní koncentraci oximu.

Tabulka č. 7 Výsledky měření stability

4 °C	1. týden		2. týden		3. týden		4. týden	
	K869	IS	K869	IS	K869	IS	K869	IS
1 µg/ml	96,0 %	100,7 %	92,8 %	97,8 %	91,7 %	96,9 %	78,5 %	87,6 %
20 µg/ml	96,3 %	100,0 %	82,7 %	94,7 %	81,8 %	94,3 %	78,0 %	80,7 %
75 µg/ml	98,3 %	100,6 %	91,7 %	94,5 %	82,3 %	90,5 %	75,6 %	83,5 %
-20 °C (opakované rozmražení)	1. týden		2. týden		3. týden		4. týden	
	K869	IS	K869	IS	K869	IS	K869	IS
1 µg/ml	98,5%	101,0%	96,8%	99,7%	98,3%	100,1%	98,3%	100,1%
20 µg/ml	98,7%	100,7%	96,2%	98,4%	95,8%	99,1%	95,8%	99,1%
75 µg/ml	96,9%	100,7%	92,5%	96,7%	90,0%	95,7%	90,0%	95,7%
-20 °C (dlouhodobé skladování)							3 měsíce	
							K869	IS
1 µg/ml							100,9%	100,0%
20 µg/ml							89,6%	97,7%
75 µg/ml							89,5%	92,1%

Zásobní roztoky K869 a IS připravované jednou za měsíc byly uchovávány při -20 °C a pracovní roztoky připravované každý týden při 4 °C. Během skladování zásobních a pracovních roztoků K869 a IS nedošlo ve vybraných časových intervalech odpovídajících skladování zásobních roztoků pro potřeby analýzy k významnému poklesu jejich koncentrací (<15 %). Látky lze za daných podmínek považovat za stabilní.

4.2. Optimalizace extrakce K869 z biologického materiálu

Na základě studie dle [85] byla za účelem extrakce oximu K869 z biologického materiálu použita metoda SPE pomocí kolonek se slabým katexem.

4.2.1. Optimalizace SPE

Při optimalizaci elučních podmínek při SPE byly pro roztoky K869 při koncentracích 1, 5, 25 a 100 µg/ml a IS při koncentraci 10 µg/ml (n= 2) testovány dvě různé eluční směsi viz. tabulka č. 8, kde jsou uvedené výtěžnosti (v %) pro jednotlivá eluční činidla.

Tabulka č. 8 Optimalizace elučního procesu pro oxim K869 a vnitřní standard

(n=2)	Eluční činidlo 1 ACN: TCA (20 %) (9: 1 v/v) výtěžnost extrakce [%] *		Eluční činidlo 2 ACN: HCOOH (98 %): H ₂ O (9: 0,5: 0,5 v/v/v) výtěžnost extrakce [%] *	
	K869	IS	K869	IS
1 µg/ml	70,0	60,9	91,3	80,9
5 µg/ml	78,7	67,5	95,4	84,9
25 µg/ml	77,8	67,2	87,4	80,7
100 µg/ml	73,9	62,8	91,1	86,0

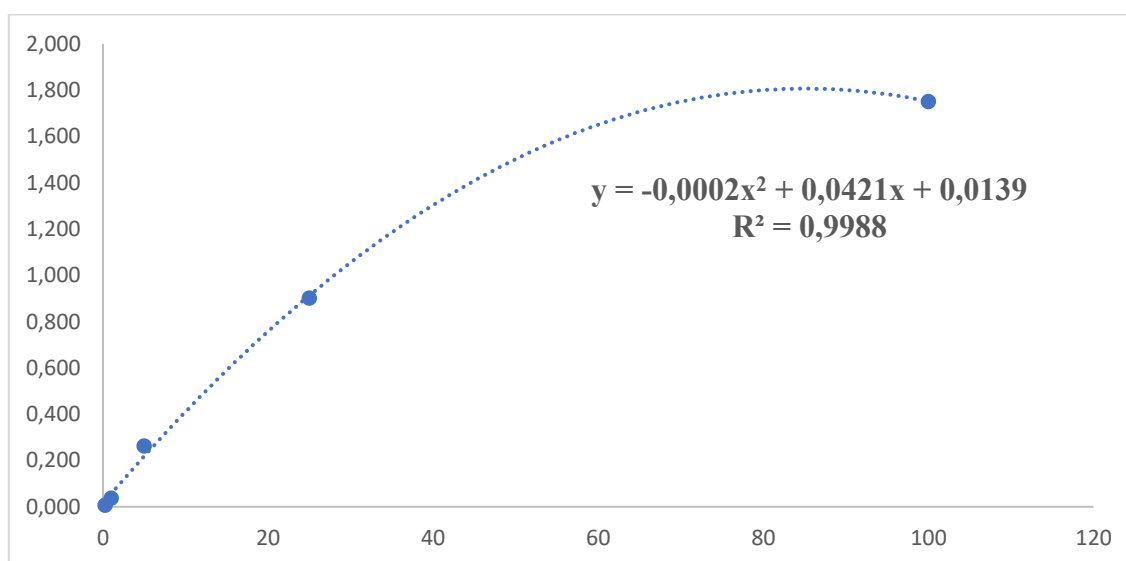
* Hodnoty uvedené v tabulce představují průměr ze dvou stanovení.

Eluční činidlo 2 (ACN: HCOOH: H₂O (9: 0,5: 0,5 v/v/v)) bylo poté aplikováno na vzorky plazmy s přidaným oximem K869 o koncentraci 1, 5, 25 a 100 µg/ml a IS při koncentraci 10 µg/ml plazmy (n=2). V tabulce č. 9 jsou uvedeny výsledné výtěžnosti a na obrázku č. 9 je uvedena výsledná kalibrační křivka.

Tabulka č. 9 Optimalizace extrakce na tuhou fázi pro oxim K869 a vnitřní standard z plazmy

(n=2)	Eluční činidlo ACN: HCOOH (98 %): H ₂ O (9: 0,5: 0,5 v/v/v)	
	výtěžnost extrakce z plazmy [%] *	
Oxim	K869	IS
1 µg/ml	78,1	89,0
5 µg/ml	73,9	88,1
25 µg/ml	52,4	83,4
100 µg/ml	26,0	87,2

* Hodnoty uvedené v tabulce představují průměr ze dvou stanovení.



Obrázek č. 9 Kalibrační křivka pro oxim K869 ve vzorcích plazmy

4.2.2. Optimalizace extrakčního procesu z plazmy

Vzhledem k tomu, že při vyšších koncentracích oximu K869 přidaného k plazmě docházelo ke snižování výtěžnosti extrakce tohoto oximu (viz. tabulka č. 9 a obrázek č. 9), bylo provedeno několik dalších experimentů za účelem optimalizace extrakčního postupu. Jednotlivé vzorky byly připraveny dle kapitoly 3.5. Koncentrace oximu K869 a IS v jednotlivých vzorcích byla 50 a 10 µg/ml. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10 Výsledky experimentů – optimalizace extrakčního postupu

	Eluční činidlo ACN:HCOOH (98%):H ₂ O (9:0,5:0,5 v/v/v) výtěžnost extrakce z plazmy [%]*	
	K869	IS
vzorek (matrice)	K869	IS
SPE roztok	75,10	76,3
SPE plazma	23,8	62,5
ultrazvuk + SPE	24,4	65,6
precipitace + SPE	23,1	59,7
roztok albuminu	49,1	63,0

* Hodnoty uvedené v tabulce představují průměr ze dvou stanovení.

Na základě těchto experimentů bylo zjištěno, že pro danou koncentraci oximu K869 nevede ultrazvukování vzorku (ultrazvuk + SPE) nebo precipitace proteinů předcházející vlastnímu SPE (precipitace + SPE) ke zvýšení výtěžnosti extrakce (vztaženo ke vzorku plazmy upravené pomocí SPE – SPE Plazma). Vzhledem k tomu, že při porovnání se vzorkem plazmy (SPE plazma) byla vyšší výtěžnost extrakce nalezena ve vzorku, kde byl oxim K869 přidán k roztoku BSA o koncentraci 40 mg/ml (roztok albuminu) a zároveň byla nalezena srovnatelná výtěžnost u vzorku, kde byla plazma předem precipitována (precipitace + SPE), vazba na albumin se nejspíš významně nepodílí na snížení extrakční účinnosti.

4.2.3. Optimalizace SPE z tělních tkání

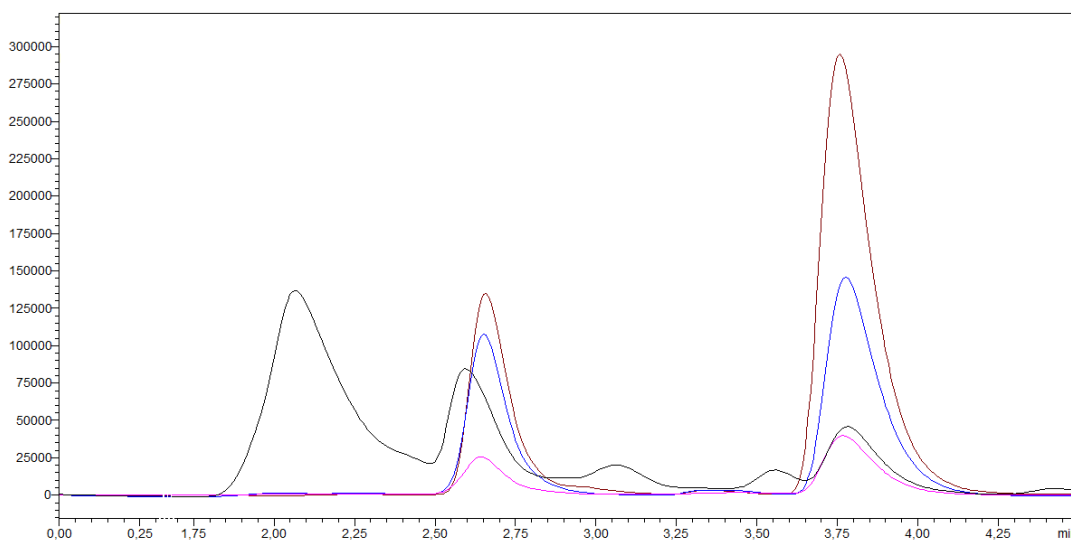
Za účelem optimalizace extrakčního postupu z tělních tkání byly připraveny vzorky dle postupu uvedeném v kapitole 3.6.1. Extrakční postup byl nejprve testován pro mozkovou tkáň, která je primárním cílem působení oximových reaktivátorů AChE. Byl sledován vliv množství tkáňového homogenátu (200 μ l a 400 μ l), precipitace ACN, SPE a kombinace precipitace a SPE na výslednou výtěžnost oximu K869 z mozkové tkáně. Výtěžnosti pro jednotlivé postupy jsou uvedené v tabulce č. 11. Chromatogramy pro jednotlivé způsoby extrakce oximu K869 z mozkové tkáně jsou zobrazené na obrázku č. 10. Koncentrace oximu K869 a IS ve všech analyzovaných vzorcích (n=2) byla 50 a 10 μ g/vzorek.

Tabulka č 11 Výtěžnost extrakce oximu K869 z mozkové tkáně

(n=2)	výtěžnost extrakce z mozkové tkáně [%]*	
Postup	K869	IS
Precipitace ACN 200 μ l	19,5	44,6
Precipitace ACN 400 μ l	19,3	44,2
SPE 200 μ l	69,8	82,2
SPE 400 μ l	66,0	81,8
Precipitace ACN + SPE 200 μ l	15,3	19,5
Precipitace ACN + SPE 400 μ l	15,1	23,1

* Hodnoty uvedené v tabulce představují průměr ze dvou stanovení.

Vzorky mozkové tkáně byly nejprve zpracovány prostou precipitací pomocí ACN (1:4 v/v) nebo pomocí SPE a posléze byla testována kombinace obou postupů viz. obrázek č. 10. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo pomocí SPE. Množství použitého homogenátu (200 nebo 400 μ l) nemělo vliv na výsledek extrakce.



Obrázek č. 10 Optimalizace extrakce oximu K869 z mozkové tkáně (pro 400 μ l homogenátu; výsledný objem vzorků je identický – 200 μ l)

Chromatogram standardního roztoku K869 ($t_r \sim 3,8$ min) a azoximu (IS, $t_r \sim 2,6$ min) je zobrazen **hnědě**, chromatogram vzorku zpracovaného precipitací ACN **černě**, SPE **modře** a kombinace precipitace ACN a SPE **růžově**.

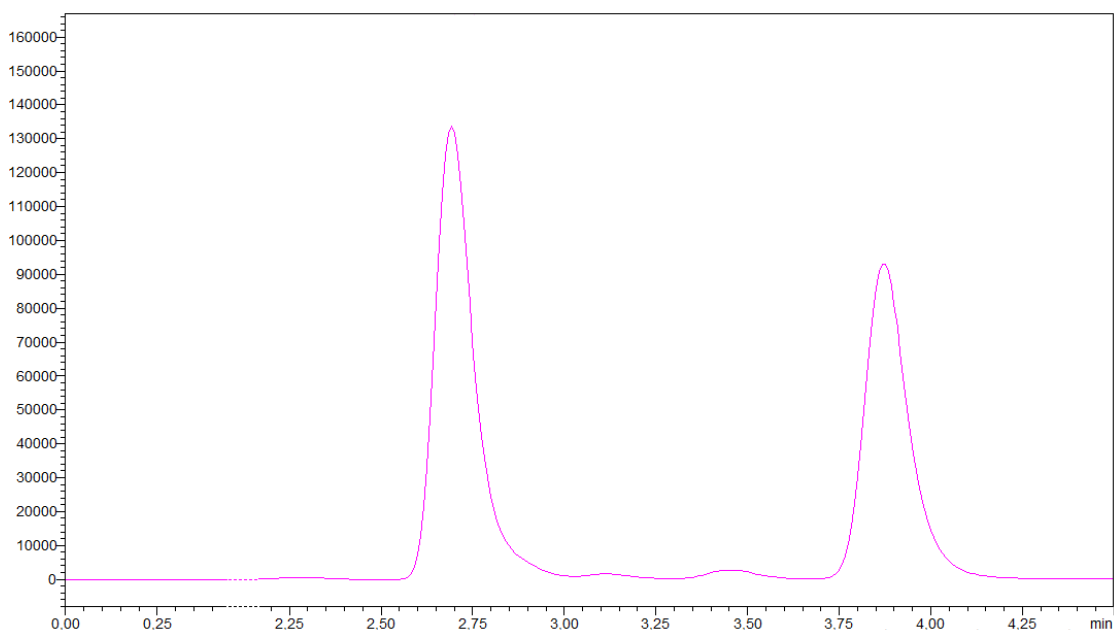
Na základě těchto výsledků byl výsledný postup aplikován na reálné pilotní vzorky mozkové tkáně, ale žádný oxim K869 nebyl v těchto vzorcích detekován. Výsledný postup byl rovněž aplikován na pilotní vzorky jaterní a ledvinové tkáně, kde byl oxim K869 detekován pouze ve vzorcích ledvinové tkáně. Na rozdíl od plazmy, nebylo u ledvinové tkáně pozorováno snížení extrakční účinnosti u vyšších koncentrací oximu K869 přidaného k ledvinovému homogenátu.

Za účelem stanovení oximu K869 v mozkové a jaterní tkáně byla později vyvinuta metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v tandemovém uspořádání (LC- MS/MS), kde bylo dosaženo podstatně nižších limitů detekce (výsledky nejsou součástí předložené diplomové práce).

4.3. Základní parametry chromatografické separace

4.3.1. Plazma

Na obrázku č. 11 je ukázkový chromatogram po nástřiku vzorku plazmy s látkou K869 (20 µg/ml) a IS, kde je vidět, že oba píky jsou od sebe dobře separované. V tabulce č. 12 jsou uvedena data, která jsou potřeba pro výpočet účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení podle vzorců, které jsou uvedeny v kapitole 1.1.4.. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.



Obrázek č. 11 Ukázkový chromatogram po nástřiku vzorku plazmy (c K869 20 µg/ml)

Tabulka č. 12 Data získaná z chromatogramu potřebná k výpočtu účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení

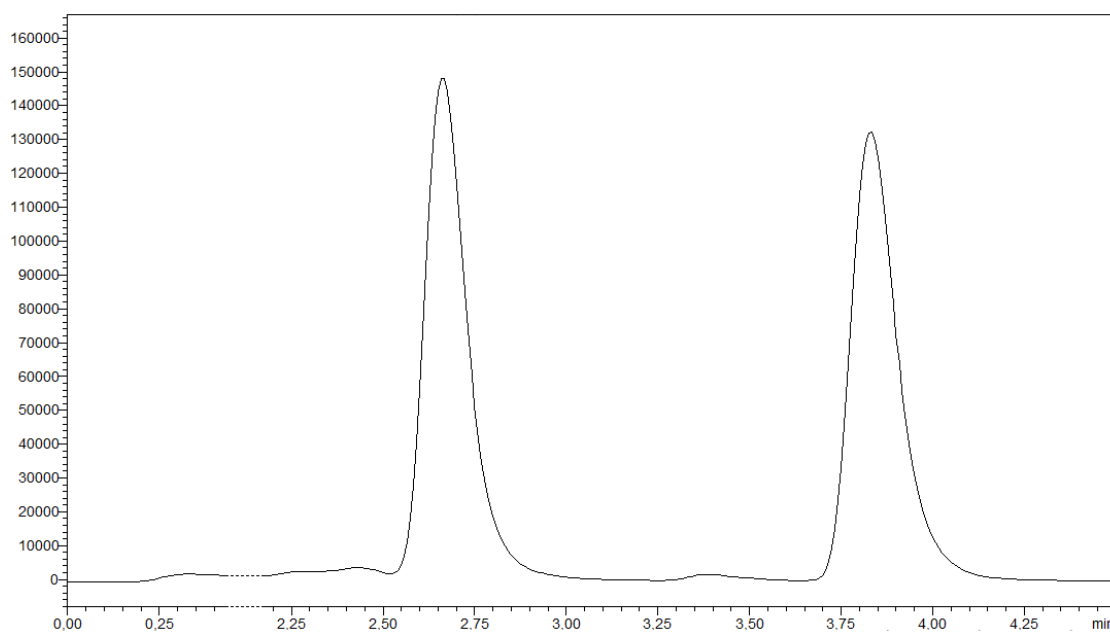
	Plazma	Plocha píku	Šířka píku (5 %)	Šířka píku (50 %)	Šířka 1. poloviny píku (5 %)	Retenční čas
1	HI-6	1042477	0,353	0,129	0,104	2,658
2	K869	688192	0,401	0,163	0,122	3,785

Tabulka č. 13 Výsledky výpočtů účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení

Plazma	N	As	Rs
HI-6	2354	1,69	4,55
K869	2990	1,64	

4.3.2. Ledvinová tkáň

Na obrázku č. 12 je ukázkový chromatogram po nástřiku vzorku ledvinové tkáně s látkou K869 (61,35 $\mu\text{g/g}$) a IS, kde je vidět, že oba píky jsou od sebe dobře separované. V tabulce č. 14 jsou uvedena data, která jsou potřeba pro výpočet účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení podle vzorců, které jsou uvedeny v kapitole 1.1.4. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.



Obrázek č. 12 Ukázkový chromatogram po nástřiku vzorku ledvinové tkáně (c K869 61,35 $\mu\text{g/g}$ tkáně)

Tabulka č. 14 Data získaná z chromatogramu potřebná k výpočtu účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení

	Ledviny	Plocha píku	Šířka píku (5 %)	Šířka píku (50 %)	Šířka 1. poloviny píku (5 %)	Retenční čas
1	HI-6	1298392	0,298	0,123	0,105	2,663
2	K869	1242463	0,320	0,136	0,111	3,829

Tabulka č. 15 Výsledky výpočtů účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišení

Ledvinová tkáň	N	As	Rs
K869	2599	1,44	5,31
HI-6	4395	1,42	

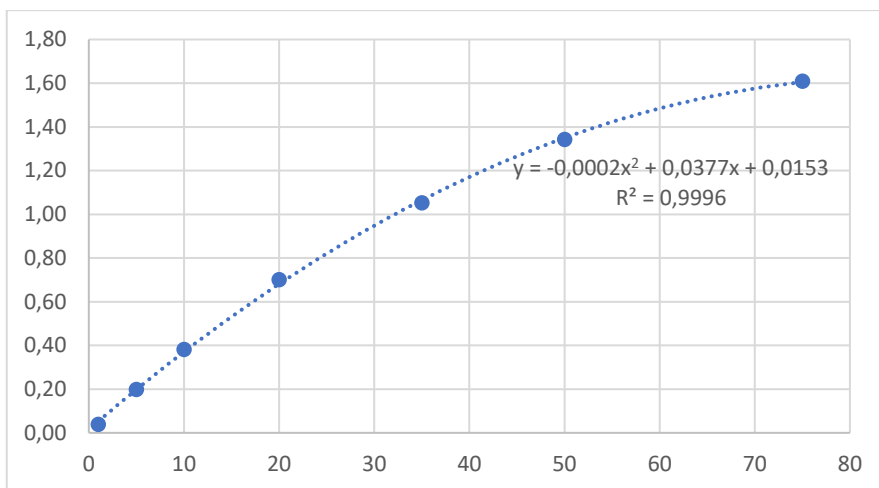
4.4. Validace

4.4.1. Plazma

V tabulce č. 16 jsou uvedena data, pomocí kterých byla sestrojena kalibrační křivka (obrázek č. 13) ze vzorků potkaní plazmy. Jsou uvedena jako průměr z pěti stanovení. Výsledky validace jsou uvedeny v tabulce č. 17. Přesnost a výtěžnost jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (n= 5). Preciznost (interdenní a intradenní) je vyjádřena jako variační koeficient (n= 5). Zkratka R^2 je koeficient regresní křivky. Koncentrace K869 v plazmě byla vypočítána podle rovnice pro výpočet kvadratické rovnice: $x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$.

Tabulka č. 16 Data pro kalibrační křivku (n= 5)

c K869 (µg/mL)	1	5	10	20	35	50	75
	0,04	0,20	0,38	0,70	1,05	1,34	1,61



Obrázek č. 13 Kalibrační křivka pro vzorky z potkaní plazmy (n= 5)

Tabulka č. 17 Validační parametry pro kalibrační křivku vzorků plazmy

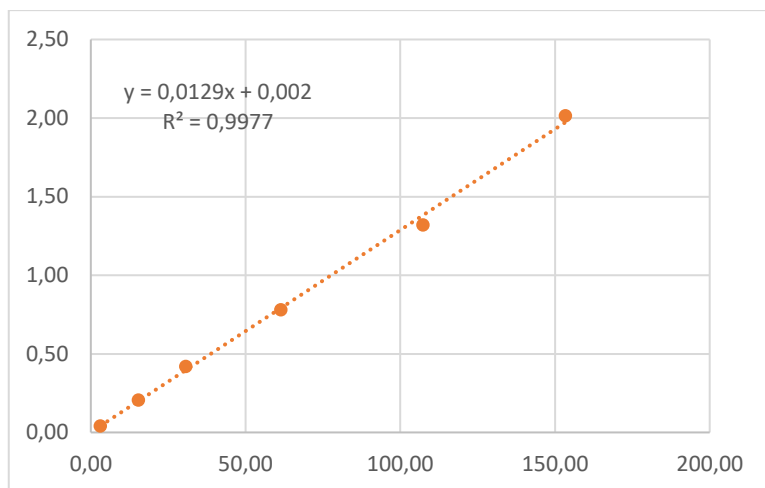
$R^2 = 0.9996$	Plazma			
koncentrace ($\mu\text{g/mL}$)	1	5	20	50
přesnost (%)	$81,3 \pm 2,8$	$98,1 \pm 1,7$	$101,6 \pm 5,2$	$94,5 \pm 8,5$
intradenní preciznost (%)	5,5	1,0	2,0	4,2
interdenní preciznost (%)	6,5	1,1	3,4	1,8
výtěžnost (%)	$69,0 \pm 0,4$	$72,7 \pm 1,5$	$72,8 \pm 4,1$	$62,1 \pm 1,0$

4.4.2. Ledvinová tkáň

Kalibrační křivka (obrázek č. 14) pro vzorky z ledvinové tkáně byla sestrojena pomocí dat z tabulky č. 18. Validační parametry jsou uvedeny v tabulce č. 19. Přesnost a výtěžnost jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (n= 5). Preciznost (interdenní a intradenní) je vyjádřena jako variační koeficient (n= 5) Zkratka R^2 je koeficient regresní křivky.

Tabulka č. 18 Data pro kalibrační křivku pro vzorky z ledvinové tkáně (n= 3)

c K869 ($\mu\text{g/g}$)	3,07	15,34	30,67	61,35	107,36	153,37
	0,04	0,21	0,42	0,78	1,32	2,02



Obrázek č. 14 Kalibrační křivka pro ledvinovou tkáň

Tabulka č. 19 Validační parametry pro kalibrační křivku vzorků z ledvinové tkáně

$R^2 = 0.9977$	Ledvinová tkáň		
koncentrace ($\mu\text{g/g}$)	3,07	15,34	107,36
přesnost (%)	$93,9 \pm 5,5$	$101,3 \pm 7,6$	$96,9 \pm 1,8$
intradenní preciznost (%)	2,6	5,0	1,6
intradenní preciznost (%)	4,1	7,1	0,9
výtěžnost (%)	$76,2 \pm 7,2$	$74,1 \pm 13,0$	$88,0 \pm 7,7$

4.5. Farmakokinetika oximu K869

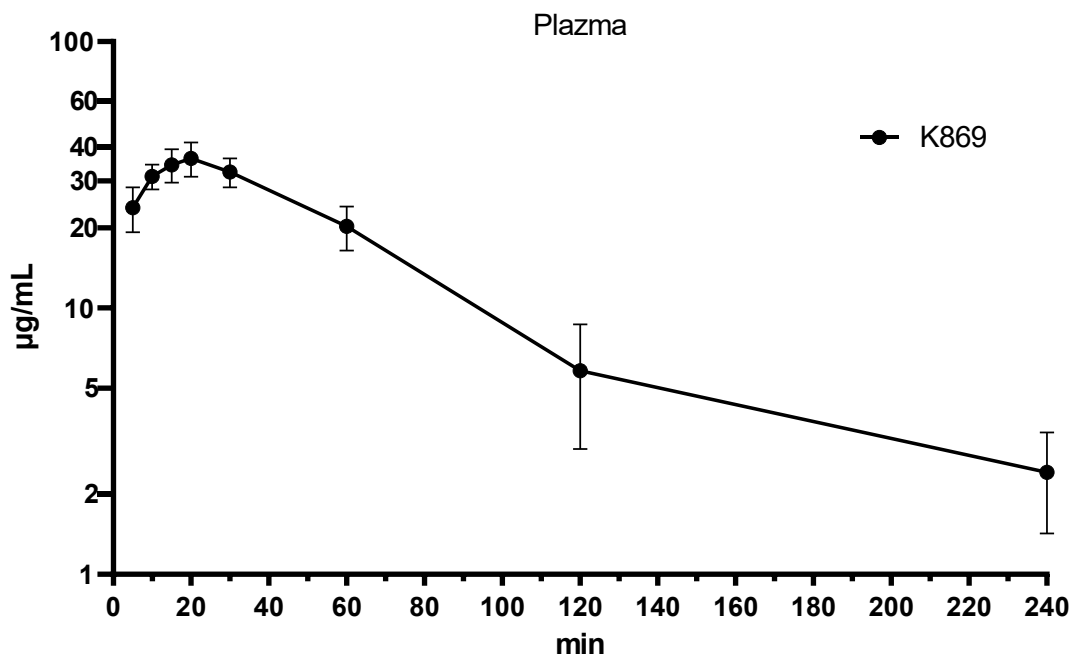
4.5.1. Plazma

V tabulce č. 20 jsou uvedené koncentrace v jednotlivých časových intervalech, průměrné hodnoty a směrodatná odchylka.

Tabulka č. 20 Souhrn koncentrací K869 v plazmě v jednotlivých časových intervalech

Koncentrace K869 (µg/mL) v plazmě v jednotlivých časových intervalech (n=6)								
t (min)	5	10	15	20	30	60	120	240
Průměr	23,80	31,18	34,47	36,43	32,40	20,25	6,19	0,97
sm. odchylka	4,56	3,32	4,94	5,35	4,01	3,81	3,03	1,41
t (min)	<i>potkan</i>	1	2	3	4	5	6	
5		18,45	24,02	18,48	26,43	29,89	25,52	(µg/ml)
		7	8	9	10	11	12	
10		30,67	32,00	25,99	33,30	29,48	35,62	(µg/ml)
		13	14	15	16	17	18	
15		28,65	32,00	37,68	40,95	29,98	37,53	(µg/ml)
		19	20	21	22	23	24	
20		33,93	37,77	31,08	31,97	45,55	38,26	(µg/ml)
		25	26	27	28	29	30	
30		29,11	29,01	31,79	38,44	29,83	36,23	(µg/ml)
		31	32	33	34	35	36	
60		21,79	17,78	14,41	21,30	25,62	20,62	(µg/ml)
		37	38	39	40	41	42	
120		5,03	10,22	6,54	1,96	7,21	3,94	(µg/ml)
		43	44	45	46	47	48	
240		< 1	< 1	3,12	< 1	1,71	< 1	(µg/ml)

Po intramuskulární aplikaci byl zjištěn rychlý nárůst koncentrace K869 v krevní plazmě. Koncentrace dosahovala maximálních hodnot (~ 40 µg/ml) mezi 15 a 20 minutami po podání (Obrázek č. 15). Také byly vypočítány základní farmakokinetické parametry, které jsou uvedené v tabulce č. 21.



Obrázek č. 15 Koncentrace K869 v čase pro krevní plazmu (v semilogaritmičtém měřítku). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (n= 6)

Tabulka č. 21 Farmakokinetické parametry získané po jednom i.m. podání oximu K869 (45 mg/kg). Všechny hodnoty jsou průměr ± směrodatná odchylka (n= 6)

Farmakokinetické parametry	K869
C_{max} (µg/ml)	39.02 ± 3.56
T_{max} (min)	15.00 ± 4.08
AUC_{total} (min.µg/ml)	2556.94 ± 933.76
λ_z (l/min)	0.03 ± 0.02
Half-life (min)	44.21 ± 33.92
MRT (min)	71.48 ± 50.87
CL (l/min/kg)	0.01 ± 0.01
V_z (l/kg)	0.66 ± 0.27
V_{ss} (l/kg)	0.75 ± 0.25

C_{max} – maximální koncentrace léčiva v plazmě

T_{max} – doba do dosažení maximální koncentrace

AUC_{total} – plocha pod koncentrační křivkou léčiva, vyjadřuje „expozici léčivem“ v čase

λ_z – konstantní rychlost eliminace

Half-life – biologický poločas

MRT – mean residence time – střední rezidenční čas

CL – clearance – vyjadřuje eliminační schopnost, kolik ml plazmy se za určitou časovou jednotku očistí od léčiva

V_z – zdánlivý distribuční objem, tj. celkové množství léčiva v těle děleno plazmatickou koncentrací léčiva

V_{ss} – rovnovážný distribuční objem, odráží skutečný objem krve a tkáně, do kterého je léčivo distribuováno, a relativní vazbu léčiva na protein v těchto prostorech [86] [87] [88]

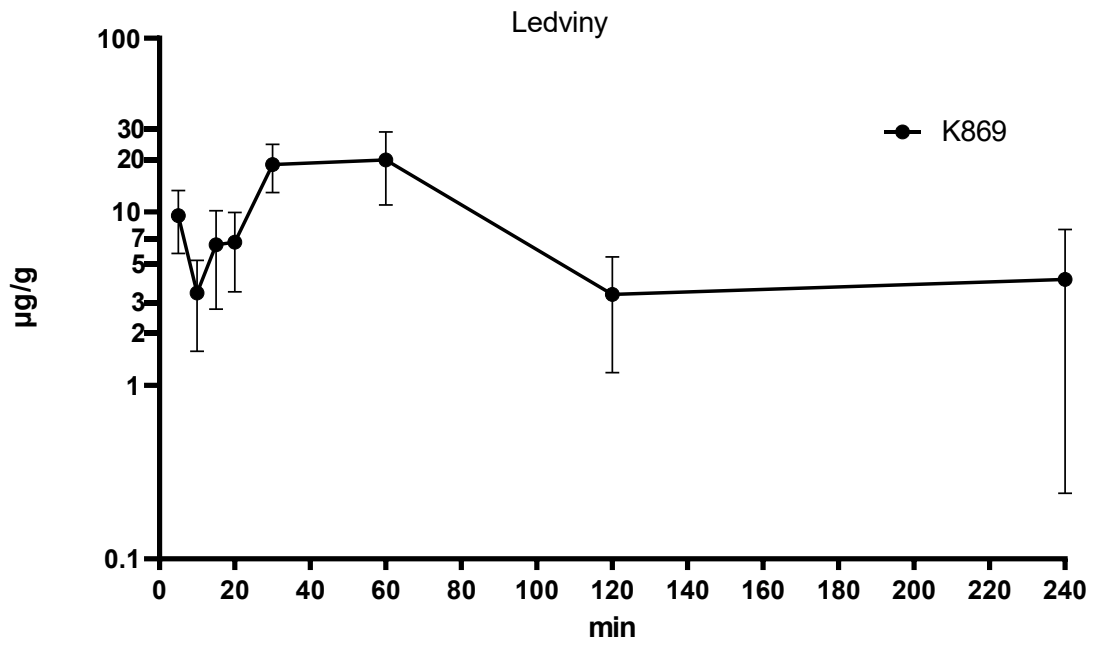
4.5.2. Ledviny

V tabulce č. 22 jsou uvedené koncentrace v jednotlivých časových intervalech, průměrné hodnoty a směrodatná odchylka.

Tabulka č. 22 Souhrn koncentrací K869 v ledvinové tkáni v jednotlivých časových intervalech

Koncentrace K869 (µg/g) v ledvinové tkáni v jednotlivých časových intervalech (n=6)								
t (min)	5	10	15	20	30	60	120	240
Průměr	9,51	3,41	6,45	6,69	18,72	19,91	3,34	2,21
sm. odchylka	3,75	1,84	3,70	3,23	5,81	8,96	2,16	3,17
t (min)	<i>Potkan</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	
5		11,91	12,79	6,64	7,33	4,67	13,69	(µg/g)
		<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
10		4,23	3,70	2,60	1,70	1,71	6,53	(µg/g)
		<i>13</i>	<i>14</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>18</i>	
15		3,78	13,38	3,79	4,19	6,11	7,45	(µg/g)
		<i>19</i>	<i>20</i>	<i>21</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>24</i>	
20		4,60	6,68	4,78	5,84	5,15	13,10	(µg/g)
		<i>25</i>	<i>26</i>	<i>27</i>	<i>28</i>	<i>29</i>	<i>30</i>	
30		12,83	25,63	13,44	16,30	18,20	25,94	(µg/g)
		<i>31</i>	<i>32</i>	<i>33</i>	<i>34</i>	<i>35</i>	<i>36</i>	
60		28,43	22,16	16,24	24,98	3,58	24,09	(µg/g)
		<i>37</i>	<i>38</i>	<i>39</i>	<i>40</i>	<i>41</i>	<i>42</i>	
120		2,73	7,36	2,36	3,95	2,52	1,15	(µg/g)
		<i>43</i>	<i>44</i>	<i>45</i>	<i>46</i>	<i>47</i>	<i>48</i>	
240		0,36	4,61	7,61	0,06	0,62	0,00	(µg/g)

Nejvyšší koncentrace v ledvinové tkáni (~ 20 µg/g) byla naměřena ve vzorcích odebíraných 30 minut a 60 minut po podání (viz. obr, č. 16).



Obrázek č. 16 Koncentrace K869 v čase pro ledviny (v semilogaritmickém měřítku).
 Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. (n=6)

5. Diskuze

5.1. HPLC-UV metoda

V oblasti stanovování koncentrace oximových reaktivátorů acetylcholinesterázy z biologického materiálu je chromatografie metoda volby. Koncentrace oximů v plazmě obvykle dosahuje mikrogramů na mililitry, což umožňuje jednoduchou UV spektrofotometrickou detekci. Kvůli přítomnosti pyridinového kruhu v molekule reaktivátoru nelze použít chromatografii na reverzní fázi, protože nabitě molekuly mají malou retenci. Retenční chování nabitých molekul na reverzní fázi lze upravit přidáním iontově-párového činidla (např.: alkylsulfonové kyseliny) do mobilní fáze. Výsledný nenabitý komplex je snadno zadržen na chromatografické koloně a stanoven UV detektorem [85; 89-94]. Alternativně může být také využita kation-výměnná chromatografie. [95] Na základě zkušeností se stanovením oximů pomocí HPCL-UV byl použit citrát-fosfátový pufr obsahující oktansulfonovou kyselinu (pH= 3,5) jako mobilní fázi a bylo dosaženo velmi dobré selektivity, přijatelných tvarů píků a separace K869 a jeho vnitřního standardu (viz. obrázky 11 a 12).

5.2. Úprava vzorku

Dominantní postup používaný pro úpravu vzorků oximů v biologickém materiálu (např.: plazmě) je proteinová precipitace nejčastěji s TCA [96] [89] [91-93] [97] nebo ACN. [90] [85] Případně se může použít ultrafiltrace. [98] [95] Pouze v jedné předchozí studii byla využita pro úpravu vzorku metoda SPE. [99]

Proteinová precipitace s TCA a ACN byla testována jako první, ale s velmi nízkou výtěžností (<30 %). [9] Současně byly pozorovány interference mezi maticí a oximy, což vedlo k výraznému poklesu selektivity metody. Lepší výsledky byly dosaženy s použitím iontově-výměnných SPE kolonek na bázi slabého katexu (> 60 %). Ale když byl SPE postup a HPLC-UV metoda použity na vzorky tkání, K869 byla detekována jen v ledvinách, ačkoliv detekční limit K869 v tkáních dosahoval okolo 80 ng/g tkáně. Když byla HPLC-UV metoda aplikována na vzorky moči, byl oxim K869 detekován, avšak i po použití SPE byla detekována řada interferencí, které silně ovlivnily selektivitu a citlivost metody. Oxim K869 v ostatních tkáních (mozek, játra), moči a žluči bylo nutné stanovit citlivější a selektivnější metodou LC-MS/MS. [9]

5.3. Farmakokinetika K869

Samcům potkana kmene Wistar byla podána intramuskulárně látka K869 v dávce 45 mg/kg na váhu jedince. Tato dávka oximu K869 odpovídající 50 % maximální tolerovatelné dávky (MTD: 90 mg/kg) byla určena jako bezpečná, protože nebyly po její aplikaci pozorovány žádné toxické účinky.

5.3.1. Farmakokinetika v plazmě

Po intramuskulární injekci byla látka K869 rychle uvolněna ze svalového depotu do systémové cirkulace a dosahovala své maximální koncentrace (~40 µg/ml) okolo 15. minuty po podání. Rychlost absorpce ze svalového depotu je v souladu s výsledky dříve testovaných oximů včetně parentní molekuly K048. Koncentrace oximu K048 naměřená v plazmě byla však vyšší v porovnání s oximem K869 (normalizováno k jejich podané dávce). [96] [93] [100] Terapeutická účinnost oximů ale není závislá jenom na jejich biologické dostupnosti. Následný transport oximů z plazmy do jejich hlavního místa účinku (centrálního a periferního nervového systému a neuromuskulárních spojení) je silně ovlivněn faktem, kterým je obecně permanentní nabití molekuly reaktivátorů.

Ve studiích Kalasze et al. (2006) a Lorkeho et al. (2007) byla látka K048 podána potkanům intramuskulárně v dávce 50 µmol oximu na váhu jedince. Maximální naměřené koncentrace oximu K048 v plazmě byly 621 a 654 µmol/l. [96] [100] Přestože byla dávka K869 podaná potkanům v této práci ~ 18 µmol na váhu jedince, maximální koncentrace naměřená v plazmě byla jen 76 µmol/l. Vztaženo k podané dávce, plazmatická koncentrace K869 je relativně nízká v porovnání s plazmatickou koncentrací K048.

5.3.2. Eliminace

Oxim K869 je, stejně jako ostatní oximy, eliminován hlavně ledvinami, což odpovídá jejich nízké schopnosti přecházet biologické membrány a nízké vazebné schopnosti na proteiny v plazmě. [85] Podle výsledku je více než 99 % K869 (poměr moč/žluč) vyloučeno močí. I když bylo naměřeno ve žluči okolo 30. minuty po podání malé množství K869 (~0.3 µg/ml), pouze nevýznamné množství K869 bylo detekováno v jaterní tkáni. [9]

5.3.3. Distribuce do mozku

Poté, co byla pro oxim K869 optimalizována HILIC-LC-MS/MS metoda [9], bylo možné stanovit tento reaktivátor i ve zbývajících tělních tekutinách a tkáních (moč, žluč, mozek, játra). Hlavní zájem byl upřen na stanovení oximu v mozkové tkáni.

Permanentně nabité molekuly obvykle velmi málo přestupují do centrálního nervového systému pasivním transportem. Za účelem predikce schopnosti oximu K869 penetrovat skrz biologické membrány (jako je HEB), byl proveden *in vitro* test PAMPA. U oximu K869 byla naměřena v porovnání s K048 čtyřikrát vyšší hodnota efektivní permeability (P_e), což indikovalo, že chlorovaný analog by mohl mnohem více penetrovat přes biologické membrány. [82] Navzdory získaným *in vitro* datům, bylo v mozku naměřeno okolo 30. minuty po podání reaktivátoru pouze malé množství oximu K869 (~ 60 ng/g tkáně). Poměr mozková tkáň/plazma pro oxim K869 vypočítaný z AUC v mozkové tkáni (min. $\mu\text{g/g}$) a z AUC v plazmě (min. $\mu\text{g/ml}$) byl menší než 1 % (uvažujeme-li, že 1 g mozkové tkáně je roven 1 ml plazmy), zatímco poměr mozková tkáň/plazma parentního oximu K048 byl ~ 5 %. (27) [9] [101]

Kalasz et al. [94] publikovali v nedávné době podobnou studii, ve které stanovovali koncentraci jiného chlorovaného bispyridiniového monoaloximu (oxim K867) v potkaním séru a tkáních. Podobně jako v této studii, maximální koncentrace oximu K867 bylo dosaženo okolo 15. minuty po podání. Většina oximu byla vyloučena ledvinami a zanedbatelné množství bylo nalezeno v jaterní tkáni, Koncentrace oximu K867 v plazmě a mozkové tkáni také nepřesáhla hodnoty naměřené u parentního oximu K203. Když byl porovnán mono-chlorovaný oxim K867 a bis-chlorovaný oxim K869, hodnota P_e a maximální koncentrace K867 v mozkové tkáni byly vyšší než u K869. [82] [94]

Na základě těchto získaných *in vivo* dat, oba analogy oximových reaktivátorů acetylcholinesterázy, K867 a K869, nedosahují vyšší biologické dostupnosti v plazmě ani významnější penetrace do mozku než jejich parentní molekuly, Zajímavé je, že tyto poznatky nejsou v souladu s *in vitro* výsledky PAMPA testu. To by mohlo být vysvětleno tím, že PAMPA test měří pouze permeabilitu zprostředkovanou pasivní difuzí a nereflkuje možný aktivní eflux z buněk, který může být zodpovědný za nízkou koncentraci chlorovaných oximů v mozku. Také se zdá, že počet chloridových substituentů ovlivňuje negativně permeaci do mozku.

5.3.4. Budoucí výzkum

V poslední době bylo navrženo a zkoumáno několik dalších přístupů za účelem dosažení zvýšené penetrace do mozku. Kromě zvyšování lipofility oximů strukturálními modifikacemi i použití proléčiv a oximů se sacharidovou složkou ve struktuře molekuly bylo spíše neúspěšné. Syntéza nenabitých oximů, použití nanočástic nebo současné podání s inhibitory efluxního transportéru (např. s inhibitory P-glykoproteinu) se tedy zdají být více perspektivní přístupy, ale stále je potřeba intenzivní výzkum. [101]

6. Závěr

V prezentovaném výzkumu byla vyvinuta a upravena jednoduchá iontově-párová HPLC-UV metoda pro stanovení koncentrace chlorem substituovaného bis-pyridiniového oximu K869 v plazmě a ledvinové tkáni.

Pro úpravu vzorků byla optimalizována SPE metoda za použití LC-WCX kolonek.

Při měření kalibrační křivky docházelo ke snižování výtěžnosti u vyšších koncentračních bodů. Kalibrační křivka nebyla lineární. Byly zkoušeny různé přístupy, aby se zjistilo, proč se tak děje. Příčinu se zatím nepodařilo objasnit. Koncentrace oximu K869 byla spočítána podle rovnice pro výpočet kvadratické funkce.

Metoda byla aplikována na vzorky pocházející z *in vivo* farmakokinetické studie, a byly zjištěny základní farmakokinetické parametry oximu K869 v plazmě a jeho distribuce do ledvinové tkáně u potkanů (intramuskulární podání oximu).

Koncentrace oximu K869 v plazmě a ledvinové tkáni významně nepřevýšila hodnoty naměřené při studii farmakokinetiky parentního oximu K048. Z tohoto důvodu není oxim K869 vhodným kandidátem pro další testování.

7. Seznam citované literatury

- [1] Adeyinka A, Muco E, Pierre L. Organophosphates. [Aktualizováno 16. 8. 2020]. Ve: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; leden 2021. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499860/> [cit. 23. 4. 2020]
- [2] RATHNAYAKE, Lasantha K. a Scott H. NORTHRUP, 2016. Structure and mode of action of organophosphate pesticides: A computational study. *Computational and Theoretical Chemistry*. **1088**, 9-23. ISSN 2210271X. Dostupné z: doi:10.1016/j.comptc.2016.04.024
- [3] Martin-Reina J, Duarte JA, Cerrillos L, Bautista JD, Moreno I. Insecticide Reproductive Toxicity Profile: Organophosphate, Carbamate and Pyrethroids. *J Toxins*. 2017;4(1): 7
- [4] Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Neuroscience. 2. vydání. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Acetylcholine. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11143/> [cit. 9. 3. 2021]
- [5] Russia's Navalny out of coma after poisoning, 2020. *BBC News* [online]. 7. 9. 2020, 1 [cit. 9. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.bbc.com/news/world-europe-54061370>
- [6] Assad forces behind deadly Syria sarin attack - UN, 2017. *BBC News* [online]. 27. 11. 2017, 1 [cit. 9. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.bbc.com/news/world-middle-east-41771133>
- [7] VOICU, Victor A., Jiri BAJGAR, Andrei MEDVEDOVICI, Flavian Stefan RADULESCU a Dalia Simona MIRON, 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: a critical review. *Journal of Applied Toxicology*. **30**(8), 719-729. ISSN 0260437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.1561
- [8] EDDLESTON, Michael a Fazle Rabbi CHOWDHURY, 2016. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **81**(3), 462-470. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1111/bcp.12784

- [9] VANOVA, Nela, Anna HOJNA, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, David MALINAK, Eliska PRCHALOVA, Kamil MUSILEK a Jana Zdarova KARASOVA, 2021. Determination of K869, a Novel Oxime Reactivator of Acetylcholinesterase, in Rat Body Fluids and Tissues by Liquid-Chromatography Methods: Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2021.01.031
- [10] PANDEY, Saurabh, Preeti PANDEY, Gaurav TIWARI a Ruchi TIWARI, 2010. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharmaceutical Methods*. **1**(1). ISSN 2229-4708. Dostupné z: doi:10.4103/2229-4708.72223
- [11] COSKUN, Ozlem, 2016. Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul* [online]. [cit. 6. 8. 2019]. ISSN 21484902. Dostupné z: doi:10.14744/nci.2016.32757
- [12] SKLENÁŘOVÁ, Hana, 2013. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. [online] [cit. 20. 7. 2019] Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=164601>
- [13] AHUJA, Satinder a Michael W. DONG, 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. 6. Amsterdam: Elsevier. ISBN 0-12-088547-6.
- [14] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 9788026042433.
- [15] TAYEB, M.A., B.S. ISMAIL, J. KHAIRIATUL-MARDIANA a Goh Choo TA, 2016. Troubleshooting and Maintenance of High-Performance Liquid Chromatography during Herbicide Analysis: An Overview. *Sains Malaysiana*. **45** (2).
- [16] High-Performance Liquid Chromatography System, 2014. In: *Www.waters.com* [online]. Milford, MA, United States: Waters Corporation [cit. 10. 8. 2019]. Dostupné z : https://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primelcsystem.jpg

- [17] SABBIONI, Cesare, Anna FERRANTI, Francesca BUGAMELLI, Giorgio Cantelli FORTI a Maria Augusta RAGGI, 2006. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products. *Phytochemical Analysis*. **17**(1), 25-31. ISSN 0958-0344. Dostupné z: doi:10.1002/pca.877
- [18] NAGADEEP, J., P. KAMARAJ a M. ARTHANAREESWARI, 2019. Gradient RP-HPLC method for the determination of potential impurities in dabigatran etexilate in bulk drug and capsule formulations. *Arabian Journal of Chemistry*. **12**(8), 3431-3443.
- [19] Beginners Guide to Liquid Chromatography: How Does High Performance Liquid Chromatography Work? Ve: www.waters.com [online]. Milford, MA, United States: Waters Corporation, 2014 [cit. 13. 8. 2019]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US
- [20] CARSTEN, Paul, Frank STEINER a Michael W. DONG, 2019. HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*. **37**, 514-529.
- [21] NAGY, KORNÉL a KÁROLY VÉKEY, 2008. Separation methods. *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Elsevier, 2008, 61-92. ISBN 9780444519801. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451980-1.50007-0
- [22] MUKHERJEE, Soumya, 2019. Isolation and Purification of Industrial Enzymes. SARUP SINGH, Ram, Reeta RANI SINGHANIA, Ashok PANDEY a Christian LARROCHE. *Biomass, Biofuels and Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, s. 41-70. ISBN 978-0-444-64114-4.
- [23] BISSANTZ, Caterina, Bernd KUHN a Martin STAHL, 2010. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*. **53**(14), 5061-5084. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm100112j

- [24] BERRUEX, Laure G. a Ruth FREITAG, 2003. Separation and Purification of Biochemicals. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. Elsevier, 2003, 651-673. ISBN 9780122274107. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227410-5/00683-9
- [25] ROYLE, Louise, 2017. Separation of glycans and monosaccharides. *Liquid Chromatography*. Elsevier, 2017, 183-200. ISBN 9780128053928. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805392-8.00007-4
- [26] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID, 2013. HPLC Analysis. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier, 2013, 465-519. ISBN 9780123850133. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385013-3.00009-4
- [27] SMOLUCH, M., P. MIELCZAREK, A. DRABIK a J. SILBERRING, 2016. Online and Offline Sample Fractionation. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Elsevier, 2016, 63-99. ISBN 9780444636881. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00005-7
- [28] RATHORE, K.S. a Pinky GUPTA, 2012. An Overview on Ion Exchange Chromatography. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences*. 2(1), 56-64. ISSN 2277–6222.
- [29] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA, 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (402).
- [30] MORI, Sadao a Howard B. BARTH, 1999. *Size Exclusion Chromatography*. 1. Berlin: Springer. ISBN 3-540-65635-9.
- [31] FEKETE, Szabolcs et al. Size Exclusion Chromatography of Protein Biopharmaceuticals: Past, Present and Future. In: *American Pharmaceutical Review*, 2018, p. 1-4. <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:103247>
- [32] YU, Jiechun, Jianhao HUANG, Fei LONG, Ande MA a Jialiang PAN, 2018. “Inverse” cloud point extraction coupled with large volume injection ion-pair chromatography: A green route integrating extraction, challenging sample cleanup and on-column concentration into fast simple operation. *Talanta*. 190, 38-46. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.07.074

- [33] BERGH, Marianne Skov-Skov, Inger Lise BOGEN, Jannike Mørch ANDERSEN, Åse Marit Leere ØIESTAD a Thomas BERG, 2018. Determination of adrenaline, noradrenaline and corticosterone in rodent blood by ion pair reversed phase UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*. **1072**, 161-172. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.11.016
- [34] SWARTZ, Michael, 2010. *HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW*. **33**(9-12), 1130-1150. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2010.484356
- [35] Diagrammatic Illustration of a UV/VIS detector optical system. Ve: www.hitachi-hightech.com [online]. [cit. 29. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>
- [36] *Fluorescenční HPLC detektory*. Ve: www.hplc.cz [online], 2017. [cit. 16. 1. 2021]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html
- [37] Fluorescence detector. Ve: www.chromedia.org [online]. [cit. 29. 3. 2020]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=cregzCsHqnOxmOIIec%20CxBkCP&subNav=edqpcDsHqnOxmOIIecCxBkCPbB>
- [38] FROEHLICH, Peter a E. L. WEHRY, 1981. Fluorescence Detection in Liquid and Gas Chromatography. *Modern Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 1981, 35-94. ISBN 978-1-4684-1094-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-1092-1_2
- [39] *Elektrochemické HPLC detektory*. Ve: www.hplc.cz [online], 2019. [cit. 30. 3. 2020]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html
- [40] MEDHE, Sharad, 2018. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Chemical and Biomolecular Engineering*. **3**(4), 51-58.
- [41] TIMOFEEVA, Irina I., Christina S. VAKH, Andrey V. BULATOV a Paul J. WORSFOLD, 2018. Flow analysis with chemiluminescence detection: Recent advances and applications. *Talanta*. **179**, 246-270. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.11.007
- [42] *Český lékopis 2017*, 2017. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR. ISBN 978-80-271-0500-7.

- [43] MEYER, V.R., 2005. CHROMATOGRAPHY | Principles. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2005, 98-105. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00089-3
- [44] *Asymetrie píku*. Ve: www.hplc.cz [online], 2018. 1 [cit. 24. 2. 2021]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/asymm_factor.htm
- [45] KUPIEC, Tom, 2004. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. **8**(3), 223-227.
- [46] DOUŠA, Michal, Petr GIBALA a Tomáš PEKÁREK, 2015. New approach of validation using internal normalization technique for quantification of related substances in raw material, intermediates and pharmaceutical substances by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **114**, 133-138. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.05.015
- [47] Area Normalisation Method. Ve: www.chromatobuddies.blogspot.com [online]. [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: http://4.bp.blogspot.com/-aLN1v1Tw-h8/VB_aDxPILcI/AAAAAAAAAFr0/oX8NaEG7Pww/s1600/PIC-1.bmp
- [48] GONZÁLEZ, Oskar a Rosa María ALONSO, 2020. Validation of bioanalytical chromatographic methods for the quantification of drugs in biological fluids. *Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics*. Elsevier, 2020, 115-134. Handbook of Analytical Separations. ISBN 9780444640666. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64066-6.00006-X
- [49] SCHOU-PEDERSEN, Anne Marie Voigt a Jens LYKKESFELDT, 2018. Comparison of Three Sample Preparation Procedures for the Quantification of L-Arginine, Asymmetric Dimethylarginine, and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma Using HPLC-FLD. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2018**, 1-7. ISSN 2090-8865. Dostupné z: doi:10.1155/2018/6148515
- [50] BERK, Zeki, 2018. Extraction. *Food Process Engineering and Technology*. Elsevier, 2018, 289-310. ISBN 9780128120187. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7

- [51] KYLE, P.B., 2017. Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier, 2017, 131-163. ISBN 9780128008713. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9
- [52] KONG, Ron, 2005. 17 LC/MS application in high-throughput adme screen. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier, 2005, 413-446. Separation Science and Technology. ISBN 9780120885473. Dostupné z: doi:10.1016/S0149-6395(05)80061-3
- [53] MA, Ji, Jianxia SHI, Hoa LE, Robert CHO, Judy Chi-jou HUANG, Shichang MIAO a Bradley K. WONG, 2008. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. **862**(1-2), 219-226. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.012
- [54] KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, s. 46-49. ISBN 80-86369-07-2.
- [55] PŁOTKA-WASYLKA, Justyna, Natalia SZCZEPAŃSKA, Miguel DE LA GUARDIA a Jacek NAMIEŚNIK, 2016. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **77**, 23-43. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.10.010
- [56] Solid Phase Extraction: Ion Exchange Methodology. Ve: www.sigmaaldrich.com [online]. [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/solid-phase-extraction/ion-exchange-methodology.html>
- [57] ANDRADE-EIROA, Auréa, Moisés CANLE, Valérie LEROY-CANCELLIERI a Victor CERDÀ, 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **80**, 641-654. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.08.015

- [58] SANDOVAL R., Maria Alexandra, 2017. *Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction*. Leicester, UK. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/320024643_Extraction_of_Phorbol_Esters_PEs_from_Pinion_cake_using_computationallydesigned_polymers_as_adsorbents_for_Solid_Phase_Extraction. Thesis. University of Leicester. Vedoucí práce Dr. Elena Piletska. [cit. 15. 4. 2020]
- [59] PAPADOYANNIS, Ioannis N. a Victoria F. SAMANIDOU, 2011. *Validation of HPLC Instrumentation*. **27(5)**, 753-783. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-120029697
- [60] Guideline on Bioanalytical Method Validation. Ve: www.ema.europa.eu [online]. 2011 [cit. 16. 1. 2021]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- [61] KLIMEŠ, Jiří, 2015. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [62] Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: Precision, 1994. www.ema.europa.eu [online]. [cit. 17. 4. 2020]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
- [63] SÄNGER-VAN DE GRIEND, Cari E. a Ann VAN SCHEPDAEL, 2018. Method Development and Validation of Capillary Electromigration Methods. *Capillary Electromigration Separation Methods*. Elsevier, 2018, 235-267. ISBN 9780128093757. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809375-7.00010-1
- [64] RAO, Tentu Nageswara, 2018. Validation of Analytical Methods. *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. InTech, 2018-04-25. ISBN 978-1-78923-084-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72087

- [65] Nicolas Cimetiere, Isabelle Soutrel, Marguerite Lemasle, Alain Laplanche, André Crocq. Standard addition method for the determination of pharmaceutical residues in drinking water by SPE-LCMS/MS. *Environmental Technology*, Taylor & Francis: STM, Behavioural Science and Public Health Titles, 2013, pp. Published online. [ff10.1080/09593330.2013.800563](https://doi.org/10.1080/09593330.2013.800563)ff. fhal-00870208
- [66] BASAVAI AH, Kanakapura a Sameer A. M. ABDULRAHMAN, 2011. Utility of N-bromosuccinimide as an Environmental-Friendly Reagent for Sensitive Determination of Olanzapine in Pharmaceuticals. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **4**(3), 209-221.
- [67] Extraction Recovery. Ve: *Www.pubmed.ncbi.nih.gov* [online]. [cit. 7. 2. 2021]. Dostupné z: <https://image.slidesharecdn.com/matrixeffect-110413093838-phpapp01/95/matrix-effect-17-728.jpg?cb=1302687742>
- [68] KONIECZKA, P., 2012. Validation and Regulatory Issues for Sample Preparation. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier, 2012, 699-711. ISBN 9780123813749. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381373-2.00064-8
- [69] VASHIST, Sandeep K. a John H.T. LUONG, 2018. Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays. *Handbook of Immunoassay Technologies*. Elsevier, 2018, 81-95. ISBN 9780128117620. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9
- [70] TIWARI, Akhilesh, Megha JOSHI, Sanyam GANDHI, Shantanu BANDOPADHYAY a Rakesh K. TEKADE, 2018. Food and Drug Laws Affecting Pharmaceutical Product Design, Development, and Commercial Manufacturing. *Dosage Form Design Parameters*. Elsevier, 2018, 591-619. ISBN 9780128144213. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814421-3.00017-8
- [71] SAGHIR, Shakil Ahmed a Rais Ahmad ANSARI, 2018. Pharmacokinetics. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2018. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.62154-2
- [72] Area under the curve. *Pharmacokinetics* [online]. [cit. 21. 4. 2021]. Dostupné z: <https://sepia2.unil.ch/pharmacology/parameters/areaunderthecurve/>

- [73] Area under the Curve. Ve: *www.nature.com* [online]. [cit. 21. 1. 2021].
Dostupné z: https://media.springernature.com/full/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fsj.jjir.3901522/MediaObjects/41443_2007_Article_BF3901522_Fig1_HTML.jpg?as=webp
- [74] SCHRAG, Michael a Kelly REGAL, 2013. Pharmacokinetics and Toxicokinetics. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development*. Elsevier, 2013, 31-68. ISBN 9780123878151. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-387815-1.00003-4
- [75] HAN, Yi Rang, Ping I. LEE a K. Sandy PANG, 2018. Finding T max and C max in Multicompartmental Models. *Drug Metabolism and Disposition*. **46**(11), 1796-1804. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.118.082636
- [76] PATOČKA, Jiří, 2004. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0608-3.
- [77] EDDLESTON, Michael, Nick BUCKLEY, Peter EYER a Andrew DAWSON, 2007. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* [online]. August 15, 2007, **2015**(371) [cit. 2020-07-04]
- [78] VANOVA, Nela, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Alzbeta DLABKOVA a Daniel JUN, 2018. Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *Journal of Applied Toxicology*. **38**(8), 1058-1070. ISSN 0260437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3605
- [79] ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, Jana a Ladislav NOVOTNÝ, 2010. Time-dependent Changes In Two Clinically Used Acetylcholinesterase Reactivators (HI-6 and Obidoxime) in Rat Plasma Determined by HPLC Techniques after in vivo Administration. *Analytical Sciences*. (26).
- [80] ZORBAZ, Tamara, David MALINAK, Kamil KUCA, Kamil MUSILEK a Zrinka KOVARIK, 2019. Butyrylcholinesterase inhibited by nerve agents is efficiently reactivated with chlorinated pyridinium oximes. *Chemico-Biological Interactions*. **307**, 16-20. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2019.04.020

- [81] ZORBAZ, Tamara, David MALINAK, Nikola MARAKOVIĆ, et al., 2018. Pyridinium Oximes with Ortho -Positioned Chlorine Moiety Exhibit Improved Physicochemical Properties and Efficient Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Several Nerve Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **61**(23), 10753-10766. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01398
- [82] WOREK, Franz, Horst THIERMANN a Timo WILLE, 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions*. **259**, 93-98. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.032
- [83] KUČA, Kamil, Daniel JUN a Kamil MUSILEK, 2006. Structural Requirements of Acetylcholinesterase Reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **6**(3), 269-277. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/138955706776073510
- [84] GALINIS-LUCIANI, D., L. NGUYEN a M. YAZDANIAN, 2007. Is PAMPA a useful tool for discovery? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **96**(11), 2886-2892. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21071
- [85] KARASOVA JZ, CHLADEK J, HROCH M, JOSEF F, HNIDKOVA D, KUČA K. Pharmacokinetic study of two acetylcholinesterase reactivators, trimedoxime and newly synthesized oxime K027, in rat plasma. *J Appl Toxicol*. 2013;33(1):18-23. <https://doi.org/10.1002/jat.1699>
- [86] *Clinical Pharmacokinetics Preferred Symbols*. *Clin-Pharmacokinet* **29**, 210–212 (1995). <https://doi.org/10.2165/00003088-199529030-00006>
- [87] BEREZHKOVSIIY, LEONID M., 2007. The Connection Between the Steady State (V_{ss}) and Terminal (V_{β}) Volumes of Distribution in Linear Pharmacokinetics and The General Proof That $V_{\beta} \geq V_{ss}$. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **96**(6), 1638-1652. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20804
- [88] TILLEMENT, J.-P. a D. TREMBLAY, 2007. Clinical Pharmacokinetic Criteria for Drug Research. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier, 2007, **2007**(5), 11-30. ISBN 9780080450445. Dostupné z: doi:10.1016/B0-08-045044-X/00117-6

- [89] KARASOVA JZ, ZEMEK F, BAJGAR J, et al. Partition of bispyridinium oximes (trimedoxime and K074) administered in therapeutic doses into different parts of the rat brain. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(5):1082-108. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.024>
- [90] KARASOVA JZ, HNÍDKOVÁ D, POHANKA M, MUSILEK K, CHILCOTT R, KUČA K. Pharmacokinetics of acetylcholinesterase reactivator K203 and consequent evaluation of low molecular weight antioxidants/markers of oxidative stress. *J Appl Biomed.* 2012;10:71-78. <https://doi.org/10.2478/v10136-011-0015-2>
- [91] ZDAROVA KARASOVA J, ZEMEK F, KUNES M, et al. Intravenous application of HI-6 salts (dichloride and dimethansulphonate) in pigs: comparison with pharmacokinetics profile after intramuscular administration. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013;34 Suppl 2:74-78.
- [92] KUNEŠ M, KVĚTINA J, BUREŠ J, et al. HI-6 oxime (an acetylcholinesterase reactivator): blood plasma pharmacokinetics and organ distribution in experimental pigs. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014;35 Suppl 2:191-196.
- [93] KARASOVA JZ, KVĚTINA J, TACHECI I, et al. Pharmacokinetic profile of promising acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 in experimental pigs. *Toxicol Lett.* 2017;273:20-25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.017>
- [94] KALÁSZ H, SZIMRÓK Z, KARVALY G, ADEGHATE J, TEKES K. Pharmacokinetics of Two Chlorine-Substituted Bis-Pyridinium Mono-Aldoximes with Regenerating Effect on Butyrylcholinesterase. *Molecules.* 2020;25(5):1250. Published 2020 Mar 10. <https://doi.org/10.3390/molecules25051250>
- [95] SINGH H, MOORAD-DOCTOR D, RATCLIFFE RH, WACHTEL K, CASTILLO A, GARCIA GE. A rapid cation-exchange HPLC method for detection and quantification of pyridinium oximes in plasma and tissue. *J Anal Toxicol.* 2007;31(2):69-74. <https://doi.org/10.1093/jat/31.2.69>
- [96] KALÁSZ H, HASAN MY, SHEEN R, et al. HPLC analysis of K-48 concentration in plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385(6):1062-1067. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0490-6>

- [97] KARASOVA JZ, ZEMEK F, MUSILEK K, KUCA K. Time-dependent changes of oxime K027 concentrations in different parts of rat central nervous system. *Neurotox Res.* 2013;23(1):63-68. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9329-4>
- [98] GARCIA GE, SINGH H, MOORAD DD, RATCLIFFE RH, WACHTEL K, CASTILLO A, GORDON RK, MYERS TM, MCDONOUGH H. Sensitive and Rapid Blood and Tissue HPLC Oxime Assay and Pharmacokinetics of MMB-4 in Guinea Pigs and African Green Monkeys. ADA481798 Walter Reed Army Institute of Research 2006.
- [99] KARASOVA JZ, HROCH M, MUSILEK K, KUCA K. Small Quaternary Inhibitors K298 and K524: Cholinesterases Inhibition, Absorption, Brain Distribution, and Toxicity. *Neurotox Res.* 2016;29(2):267-274. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9582-4>
- [100] LORKE DE, HASAN MY, NURULAIN SM, SHEEN R, KUCA K, PETROIANU GA. Entry of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J Appl Toxicol.* 2007;27(5):482-490. <https://doi.org/10.1002/jat.1229>
- [101] KOBRLOVA T, KORABECNY J, SOUKUP O. Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology.* 2019, 423:75-83. <https://doi:10.1016/j.tox.2019.05.006>