

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE

STANOVENÍ NABUMETONU
A JEHO METABOLITU V KREVNÍ
PLASMĚ

DETERMINATION OF NABUMETONE AND ITS
METABOLITE IN PLASMA

Diplomová práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

PRAHA 2009

LENKA NESPĚŠNÁ

Tato diplomová práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze v souvislosti s řešením výzkumného záměru GAUK 257527.

PROHLÁŠENÍ

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře organické a jaderné chemie PřF UK ve spolupráci s Farmakologickým ústavem 1. LF UK.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Martina Štíchy a konzultanta Doc. MUDr. Ondřeje Slanaře, PhD. a že jsem všechny použité prameny rádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 4.5.2009

.....
Lenka Kopečná
podpis

Předmětová hesla:

HPLC reverzní fáze, hmotnostní spektrometrie, extrakce na tuhou fázi

Klíčová slova:

nabumeton, 6-methoxy-2-naftyloctová kyselina, HPLC s UV a APCI-MS detekcí, krevní plasma

Keywords Plus:

HPLC reversed phase, mass spectrometry, solid phase extraction

Keywords:

nabumetone, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, HPLC with UV and APCI-MS detection, plasma

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zvláště pak RNDr. Martinu Štíchovi za jeho ochotnou pomoc a zázemí, dále také Doc. MUDr. Ondřeji Slanařovi, PhD. a kolektivu Farmakologického ústavu 1. LF UK za spolupráci. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.

Lenka Nespěšná

OBSAH

Seznam použitých zkratek	6
1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Nabumeton	10
3.2 Nesteroidní protizánětlivá léčiva a jejich účinek	11
3.3 Metody stanovení nabumetonu a 6-MNA	13
3.4 Vlastnosti nabumetonu a 6-MNA	15
3.5 Volba vnitřního standardu	15
3.6 Význam stanovení koncentrace léčiva a jeho metabolitu pro klinickou praxi	16
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1 Chemikálie	19
4.2 Biologický materiál	19
4.3 Přístroje a vybavení	19
4.4 Příprava zásobních roztoků a jejich skladování	20
4.5 Skladování roztoků krevní plasmy	20
4.6 Podmínky měření MS spekter	20
4.7 Podmínky hmotnostní detekce pro HPLC	21
4.8 Optimalizace HPLC	21
4.9 Extrakce na tuhou fázi	23
4.10 Validace metody	25
4.11 Výsledná metoda zpracování reálných vzorků	27
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	28
5.1 UV absorpční spektra látek	28
5.2 Hmotnostní spektra látek	29
5.2.1 <i>Hmotnostní ESI spektra</i>	29
5.2.2 <i>Hmotnostní APCI spektra</i>	31
5.3 Optimalizace HPLC	35
5.3.1 <i>Volba mobilní fáze a průtokové rychlosti</i>	35
5.3.2 <i>Odezva standardních roztoků</i>	39

5.4	Optimalizace SPE	42
5.4.1	<i>Vliv pH vzorku na výtěžnost extrakce</i>	42
5.4.2	<i>Vliv rychlosti aplikace vzorku na výtěžnost extrakce</i>	45
5.4.3	<i>Vliv elučního rozpouštědla na výtěžnost extrakce</i>	46
5.5	Výsledky validace metody	47
5.6	Analýza reálných vzorků	52
6	ZÁVĚR	54
	SEZNAM LITERATURY	55

Seznam použitých zkratek

$A_{6\text{-MNA}}$	plocha píku 6-MNA
$A_{\text{I.S.}}$	plocha píku vnitřního standardu
A_{NABU}	plocha píku nabumetonu
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
$c_{6\text{-MNA}}$	koncentrace 6-MNA
c_{NABU}	koncentrace nabumetonu
CAS RN	číslo v registru Chemických abstrakt
C8	oktyl
C18	oktadecyl
COX	cyklooxygenasa
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulsní voltametrie
ESI	ionizace elektrosprejem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IM	intermediární metabolizátor
I.S.	vnitřní standard
λ	vlnová délka
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LLE	extrakce kapalina kapalinou
LLOQ	nižší limit stanovení
LOD	limit detekce
M_r	relativní molekulová hmotnost
MRM	„multiple reaction monitoring“
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	efektivní hmotnost iontu
N	počet teoretických pater
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
p.a.	pro analýzu

PCR	polymerasová řetězcová reakce
Ph	fenyl
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PM	pomalý metabolizátor
R	rozlišení
R ²	korelační koeficient
RM	rychlý metabolizátor
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
rpm	počet otáček za minutu
s	směrodatná odchylka
s _r	relativní směrodatná odchylka
S	symetrie píku
SIM	monitorování vybraného iontu
S/N	poměr odezvy signálu a šumu
SPE	extrakce na tuhou fázi
SWV	voltametrie s pravoúhlým napěťovým pulsem
t	čas
t _R	retenční čas
TFA	trifluorooctová kyselina
ULOQ	horní limit stanovení
u	atomová hmotnostní jednotka
UM	ultrarychlý metabolizátor
UV	ultrafialové záření
v	průtoková rychlosť
v/v	poměr objemů
w ₅₀	šířka píku v polovině výšky
6-MNA	6-methoxy-2-naftylooctová kyselina

1 ÚVOD

V současné době je na trhu nepřeberné množství léčivých přípravků obsahujících širokou paletu účinných látek, případně profarmak. Každé léčivo je charakterizováno svým farmakokinetickým profilem. Ovšem v řadě případů je farmakokinetika do značné míry ovlivňována interindividuální odlišností metabolismu. Může se stát, že obecná dávkovací schémata nevyhovují všem pacientům. V jednom případě nemusí být očekávané působení vůbec pozorováno, v druhém může být léčba naopak toxická a pacienta poškozovat. Řešením tohoto problému se do budoucna zdá být farmakogetické vyšetření, které by na základě odhalení odchylek v genech pro metabolickou výbavu umožnilo individualizaci dávkování léčiva, případně úplné vyloučení nevhodného farmaka z možného výběru. Ovšem, aby k tomuto mohlo dojít, je nejprve nutné rádně prostudovat farmakokinetiku příslušného léčiva s využitím klasických metod analýzy a dát je do vztahu s genetickými predispozicemi. Pro tyto účely je tedy nutné vypracovat citlivé metody, s jejichž pomocí bylo možné určit koncentraci sledovaných látek – léčiv, případně jejich metabolitů v časově definovaných biologických vzorcích po jejich řízeném podání.

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení nabumetonu a jeho hlavního metabolitu v krevní plasmě s využitím technik extrakce na tuhou fázi a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a hmotnostní detekcí. Dalším úkolem bylo metodu validovat a použít k analýze reálných vzorků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

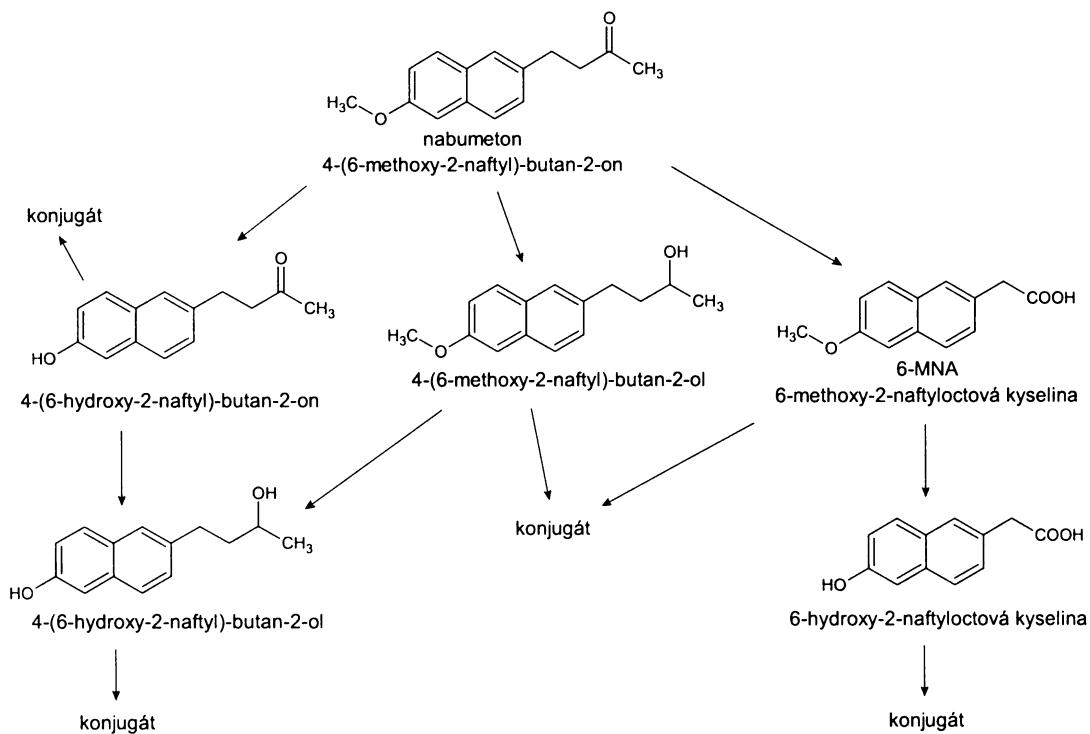
3.1 Nabumeton

Nabumeton (4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-on) je léčivo, které patří mezi nesteroidní protizánětlivé látky. Je používán u zánětlivých a degenerativních revmatoidních onemocnění (revmatoidní artritida, osteoartritida), u revmatismu měkkých tkání a u bolestivých poúrazových a pooperačních stavů [1, 2]. Nabumeton sám o sobě nevykazuje farmakologický účinek. Po orálním podání je dobře absorbován z trávicího traktu a následně v játrech podléhá rozsáhlé biotransformaci za vzniku řady metabolitů, viz Obr. 3.1. Hlavní metabolit, 6-methoxy-2-naftylooctová kyselina, vzniká oxidačním štěpením postranního řetězce. Ostatní méně významné metabolity vznikají O-demethylací a redukcí [3]. 6-MNA má antipyretické, antiflogistické a analgetické účinky, které jsou způsobeny tlumením syntézy prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu [2].

Udává se, že více než 99 % 6-MNA je vázáno na plasmatické proteiny. Distribuční objem je vzhledem k této skutečnosti malý. Po intravenózním podání hodnota dosahuje 7,5 l [3]. 6-MNA dobře proniká do synoviální tekutiny a nepodléhá enterohepatální cirkulaci [4].

Maxima plasmatické koncentrace 6-MNA je dosaženo průměrně 4–12 h po podání nabumetonu [3], ovšem existuje zde veliká variabilita. *Nobilis et al.* uvádí dosažení maxima v čase 4,5 h [4], *De Jager et al.* uvádí rozmezí 1,5–48 h [5], *Patel et al.* zmiňuje čas 6,4 h [6], *Kendall et al.* pak udává rozmezí 3–27 h [7]. Stejně tak variabilní je hodnota maximální dosažené koncentrace: *Nobilis et al.* uvádí hodnoty 18,8 a 21,3 mg·l⁻¹ po podání 500 mg nabumetonu [4], *De Jager et al.* 10,1–38,5 mg·l⁻¹ po podání 1000 mg [5], *Kendall et al.* 11,3–34,0 mg·l⁻¹ po podání 1000 mg [7] a *Patel et al.* 5,9 mg·l⁻¹ po podání 750 mg nabumetonu [6].

Metabolity nabumetonu včetně 6-MNA jsou vylučovány ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou či sírovou – 80 % podané dávky nabumetonu je tak vyloučeno močí a přibližně 10 % stolicí [3, 8].



Obr. 3.1 Schéma metabolismu nabumetonu [3].

3.2 Nesteroidní protizánětlivá léčiva a jejich účinek

Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID) působí cestou inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX), čímž zabraňují syntéze prostaglandinů [9].

Rozeznáváme dvě isoformy cyklooxygenasy, které se vzájemně liší selektivitou vůči substrátům a inhibitorům, úrovní exprese za normálních a pathofyzioligických podmínek i výskytem ve tkáních [10]. Cyklooxygenasa 1 (COX-1) je označována jako konstitutivní enzym. Je zodpovědná za udržování normálních buněčných procesů. Prostaglandiny produkované COX-1 ochraňují sliznice trávicího traktu, stimulují agregaci krevních destiček a podporují funkci ledvin [10, 11]. Naproti tomu cyklooxygenasa 2 (COX-2), označovaná jako indukovatelný enzym, je exprimována během poškození buněk. Prostaglandiny syntetizované za těchto podmínek urychlují zánětlivý proces [10, 12].

Toto rozdělení podle funkcí však není zcela přesné. Je známo, že COX-2 hraje důležitou roli pro správnou funkci ledvin, je přítomna v mozku a v ženských

reprodukčních orgánech, působí tedy i konstitutivně [9]. Dále je známo, že během zánětu se zvyšuje exprese také u COX-1 [3, 10, 13].

Objev COX-2 v roce 1991 umožnil vývoj léčiv žádaného terapeutického působení s menším výskytem nežádoucích účinků [10]. Všeobecně jsou terapeutické schopnosti nesteroidních protizánětlivých látek spojovány s inhibicí COX-2, zatímco inhibice COX-1 je považována za příčinu nežádoucích vedlejších účinků zejména v oblasti trávícího traktu a krevní srážlivosti [9].

Nesteroidní protizánětlivá léčiva lze podle jejich preference vůči COX-1/COX-2 rozdělit do několika skupin: selektivní COX-1 inhibitory, neselektivní COX inhibitory, semiselectivní COX-2 inhibitory a selektivní COX-2 inhibitory [14]. Nabumeton, tedy jeho aktivní metabolit, 6-MNA, je řazen mezi látky s preferencí COX-2, ale důkazy o jeho selektivitě vůči této isoformě nejsou tak přesvědčivé jako u jiných léčiv. Data získaná pokusy *in vitro* nemusí nutně odrážet situaci *in vivo*. Dále se uvádí vliv dávkování – výsledek určený po jednorázovém podání se může lišit od situace, kdy je nabumeton podáván kontinuálně [14]. Přesto nabumeton vykazuje méně nežádoucích účinků ve srovnání se staršími léčivy z řad NSAID (např. kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, naproxen – preferenční COX-1 inhibitory), neovlivňuje srážlivost krve a vedlejší účinky postihující trávící trakt (poškození žaludeční sliznice, žaludeční vředy a krvácení, perforace žaludku) se vyskytují v daleko menší míře. Nižší gastrointestinální toxicita nabumetonu je vysvětlována jako důsledek jeho nepolárního charakteru a skutečnosti, že se jedná o profarmakum [15, 16, 17].

Selektivní inhibitory COX-2 nabízejí dále možnost využití k prevenci Alzheimerovy choroby [18, 19] a snížení rizika vzniku rakoviny [18]. Každodenní příjem selektivních COX-2 inhibitorů způsobil pokles rizika vzniku karcinomu prsu o 71 %, prostaty o 55 %, tlustého střeva o 70 % a rakoviny plic o 79 % [20].

3.3 Metody stanovení nabumetonu a 6-MNA

Dosud bylo publikováno jen několik prací zabývajících se stanovením nabumetonu a 6-MNA. Prezentované metody byly určeny pro analýzu farmaceutických přípravků a biologických vzorků.

Wolff et al. [21] se zabýval stanovením nečistot přítomných ve vzorku nabumetonu s využitím HPLC spojené s „particle beam“ MS.

Altun et al. [22] použil ke stanovení nabumetonu diferenční pulsní (DPV) a voltametrii s pravoúhlým napěťovým pulsem (SWV) na elektrodě ze skelného uhlíku. Následně byl postup aplikován na vzorky tablet a modelové vzorky krevního séra a moči obohacené o analyt. Autoři dosáhli detekčního limitu $2,31 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (DPV) a $2,53 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (SWV) v séru a $2,68 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (DPV) a $2,51 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (SWV) v moči.

Rao et al. [23] stanovoval nabumeton společně s dalšími léčivy (celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, nimesulid) pomocí RP-HPLC s UV detekcí. Postup použil pro analýzu farmaceutických přípravků a modelových vzorků krevní plasmy. Vzorky plasmy byly zpracovány LLE do methanolu. Detekční limit činil $0,127 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($5,56 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³) a limit stanovení $0,385 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($1,68 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³), výtěžnost 97,9–99,6 %.

Mikami et al. [24] provedl současnou analýzu naproxenu, nabumetonu a 6-MNA v léčivých přípravcích a v moči metodou RP-HPLC s UV a fluorometrickou detekcí. Po alkalické hydrolýze konjugátů byly vzorky moči předupraveny pomocí SPE na kolonkách Bond Elut Certify II (směsná fáze C8 a anexu). Mez stanovitelnosti pro nabumeton činila $120 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($5,25 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³), pro 6-MNA $16 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($7,40 \cdot 10^{-8}$ mol·dm⁻³), bylo dosaženo výtěžnosti 93,6–97,1 % pro nabumeton, 92,5–95,0 % pro 6-MNA.

Sheen et al. [25] vypracoval metodu stanovení nabumetonu a testosteronu pomocí HPLC s APCI tandemovou hmotnostní detekcí. Pro zvýšení citlivosti detekce byly sledované látky převedeny na deriváty pentafluorofenylhydrazinu. Metoda byla otestována na modelových roztočích krevní plasmy obohacených analyty. Vzorky byly předupraveny LLE, jako extrakční činidlo byla použita směs *n*-hexan/dichlormethan. Pro nabumeton autoři uvádějí detekční limit $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($4,38 \cdot 10^{-10}$ mol·dm⁻³).

Pulgarín et al. [26] využil pro stanovení 6-MNA v biologických matricích techniku „heavy atom – induced room temperature phosphorescence“, která nevyžaduje předúpravu vzorků. Metoda byla testována na modelových vzorcích moči a krevního séra obohacených o analyt. Limit stanovení činí $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($9,25 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), výtěžnost 95,2–104,5 %.

Kobylińska et al. [27] sledovala farmakokinetiku nabumetonu po jednorázovém podání. K tomuto účelu byla použita metoda stanovení nabumetonu v krevní plasmě s využitím LLE (extrakční činidlo ethylacetát) a následně RP-HPLC analýza s fluorimetrickou detekcí. Limit stanovení byl určen na koncentraci $0,313 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($1,37 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

De Jager et al. [5] se ve své práci věnoval stanovení 6-MNA v krevní plasmě. K předúpravě vzorků použil pouze precipitaci proteinů acetonitrilem a následně prováděl analýzu RP-HPLC s UV detekcí. Limit stanovení uvádí $70 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($3,23 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), výtěžnost 100 %. Metoda byla využita ke sledování koncentrace 6-MNA v krevní plasmě po jednorázovém podání nabumetonu.

Nobilis et al. [4] provedl porovnání biotransformace nabumetonu u lidí a miniprasat. Kromě 6-MNA a samotného nabumetonu sledoval i jeho ostatní metabolity, a to v krevní plasmě a v moči u lidí a v krevní plasmě, moči, synoviální tekutině a ve žluči miniprasat. Pro předúpravu vzorků byla využita SPE na C18 stacionární fázi a LLE s diethyletherem jako extrakčním činidlem. Celkem byly prezentovány tři metody:

- 1) LLE/RP-HPLC/UV: limit stanovení pro 6-MNA i nabumeton $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, výtěžnost 78 % pro 6-MNA, 81 % pro nabumeton
- 2) LLE/RP-HPLC s fluorescenční detekcí: limit stanovení pro 6-MNA i nabumeton $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, výtěžnost 79 % pro 6-MNA, 80 % pro nabumeton
- 3) SPE/RP-HPLC/UV: limit stanovení pro 6-MNA $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, výtěžnost 78%, pro nabumeton $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, výtěžnost 80 %

Na tuto práci navazuje další projekt stejného kolektivu autorů, *Nobilis et al.* [8], který se zabýval identifikací a stanovením metabolitů nabumetonu druhé fáze biotransformace pomocí RP-HPLC s DAD UV a MS detekcí. Vzorky

moči, žluči a obsahu tenkého střeva miniprasat byly předupraveny opět LLE do diethyletheru.

Patel et al. [6] sledoval koncentraci 6-MNA v krevní plasmě po jednorázovém podání nabumetonu. Vzorky byly předupraveny pomocí SPE na Oasis HLB kolonkách (stacionární fáze: polystyren–divinylbenzen–*N*-vinylpyrrolidon) a následně analyzovány RP-HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí. Limit stanovení 6-MNA je $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($9,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

3.4 Vlastnosti nabumetonu a 6-MNA

Nabumeton (CAS RN 42924-53-8) je bílá, nebo téměř bílá krystalická látka o relativní molekulové hmotnosti $M_r = 228,3$ [28]. Díky svému nepolárnímu charakteru je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpouští se v ethanolu a ve většině organických rozpouštědel [29]. V České republice je registrován přípravek *Relifex*, což jsou potahované tablety s obsahem 500 mg nabumetonu [30].

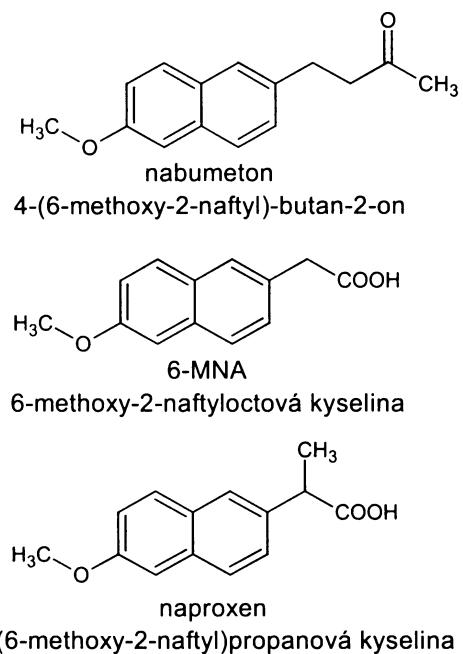
6-MNA (CAS RN 23981-47-7) je bezbarvá krystalická látka o relativní molekulové hmotnosti $M_r = 216,2$. Narozdíl od nabumetonu se jedná o sloučeninu kyselé povahy, $\text{pK}_a = 4,5$ [31], která je rozpustná v organických rozpouštědlech a ve vodných roztocích pufrařů [32].

3.5 Volba vnitřního standardu

Použití vnitřního standardu (I.S.) v bioanalytických metodách je velmi důležité pro zlepšení přesnosti a správnosti. Jeho úlohou je v podstatě napodobovat analyt. Z tohoto důvodu by měl mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako sledovaná látka, avšak nesmí s ní nijak reagovat, musí být dobře separovatelný a stálý. Vnitřní standard by měl být přidán před samotnou předúpravou vzorku, aby byl minimalizován vliv chyb, které se nasčítají během celého analytického procesu. Do kalibračního grafu je pak vynášen poměr plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standardu [33].

Pro účely této práce byl jako vnitřní standard zvolen naproxen (CAS RN 22204-53-1). Jedná se o látku kyselé povahy, $\text{pK}_a = 4,2$ o relativní

molekulové hmotnosti $M_r = 230,3$ [34]. Naproxen vykazuje velkou strukturní podobnost s oběma analyty, pro srovnání viz Obr. 3.2, a stejně jako v případě 6-MNA se jedná o karboxylovou kyselinu.



Obr. 3.2 Struktury analytů a vnitřního standardu.

3.6 Význam stanovení koncentrace léčiva a jeho metabolitu pro klinickou praxi

V klinické praxi se lékaři setkávají s pacienty, u kterých léčba nevede k požadovanému terapeutickému účinku. Jednou z příčin tohoto jevu jsou velké interindividuální rozdíly ve vstřebávání, metabolismu a ve vylučování léku. Podkladem těchto rozdílů bývá polymorfizmus enzymů, transportních systémů i receptorů zajišťujících osud a účinek léků v organizmu. Kromě faktorů ovlivňujících farmakokinetiku léčiv, jako je snížená renální funkce, lékové interakce a životní styl včetně stravovacích návyků, vstřebávání, metabolismus a eliminaci léčiv ovlivňují také dědičné faktory. Studiem genetických příčin různorodosti genetické odpovědi se zabývá farmakogenetika [35, 36].

Častou příčinou variability farmakokinetických vlastností léčiv jsou mutace přítomné na typických místech genů jaterních enzymů, které jsou zodpovědné za

biotransformaci příslušných farmak. Tyto mutace se nazývají polymorfismy. Polymorfizmus je definován jako odchylka v sekvenci DNA, která je přítomna nejméně u 1 % populace, často však bývá rozšířena u daleko většího počtu jedinců. Přítomnost polymorfismu nemusí nutně způsobovat odchylku ve funkci, v mnoha případech však vede ke snížené aktivitě proteinů – enzymů, receptorů nebo transportních proteinů [36, 37].

Aktivita isoenzymů cytochromu P450, které se podílejí na metabolismu léčiv, je kódována monogenně a přenášena autozomálně recesivně. Podle míry ovlivnění metabolické cesty rozlišujeme několik skupin. Lidé s úplným deficitem metabolické cesty, mající obě alely genu defektní, jsou označováni jako *pomalí metabolizátoři* (PM). Heterozygoti s jednou defektní alelou jsou označováni jako *intermediární metabolizátoři* (IM). Většinu populace tvoří homozygoti pro normální gen s dobrou metabolickou funkcí – ti jsou označováni jako *rychlí metabolizátoři* (RM) a jsou považováni za „normu“ v populaci. Méně často může docházet k duplikaci genu, která vede k neobvykle vysokým množstvím funkčního enzymu v hepatocytech – v takovém případě mluvíme o *ultrarychlých metabolizátorech* (UM) [35, 37 – 39].

Existují dva způsoby, jak určit aktivitu enzymů podílejících se na biotransformaci léčiv – určení *fenotypu* a *genotypu*. Při stanovování fenotypu je podána jedna dávka modelového léčiva, které je metabolizováno enzymem, jehož aktivitu stanovujeme. Jako parametr aktivity enzymu potom používáme metabolický poměr (koncentrace metabolitu/koncentrace mateřské látky). Jeho hodnota udává rychlosť přeměny mateřské látky na metabolit a lze podle ní odlišit pomalé a rychlé metabolizátory. Výhodou vyšetření fenotypu je získání informace o aktuální aktivitě enzymu a kinetice aktivity, naopak nevýhodou je vliv neidentifikovatelných faktorů, intraindividuální variabilita a také nutná spolupráce pacienta [35].

Genetický polymorfismus v metabolismu je možné určit stanovením genotypu pomocí PCR, kdy jsou odhaleny mutace v genu příslušného enzymu. Genotyp je narození od fenotypu stálý a po celý život se nemění, ovšem aktuální aktivita enzymu může být proměnlivá a je závislá na ostatních vlivech jako je např. podávání enzymových induktorů, inhibitorů, nebo substrátů, složení stravy, hladiny hormonů a jiných endogenních látek nebo onemocnění. Pokud nejsou přítomny látky výrazně ovlivňující enzym, pohybuje se jeho aktivita v rozmezí odpovídajícím příslušné

genotypové skupině. Výhodou vyšetření genotypu jsou menší nároky na spolupráci pacienta, nepodává se žádne léčivo a nehrozí ovlivnění výsledku jinými léčivy. Nevýhodou je, že se jedná pouze o „předpověď“ aktivity enzymu a pacient je zařazen do fenotypové skupiny bez bližšího určení. Další diskutabilní otázkou je finanční náročnost obou typů vyšetření [35].

Největší počet klinicky významných polymorfismů byl odhalen v podskupině cytochromu P450 2D6. Tento isoenzym metabolizuje asi 25–30 % léků. Obecná dávkovací schémata vyhovují pro střední, eventuálně rychlé metabolizátory, u pomalých dochází ke kumulaci až k toxicickým hladinám, či naopak u velmi rychlých metabolizátorů není dosaženo terapeutické hladiny a léčba je neúčinná. U pomalých metabolizátorů P450 2D6 se můžeme setkat také s opačným fenoménem. V případě, že je podáváno profarmakum, snížená aktivita enzymu způsobí, že mateřská látka není dostatečně transformována na aktivní metabolit, není dosaženo terapeutické koncentrace a očekávaný účinek se nedostaví. Kdyby tedy bylo u pacienta před vlastním zahájením terapie známo, do jaké skupiny metabolizátorů patří, bylo by možné na základě individuálních potřeb upravit dávkování, případně zvolit alternativní léčebný postup v situaci, kdy by měla být léčba neúčinná, nebo toxicická. Jednou z možností je stanovení genotypu. Vliv genotypu však není u mnoha farmak zatím dostatečně prostudován [36, 40].

Tato diplomová práce je součástí projektu Farmakologického ústavu 1. LF UK, který si klade za cíl popsat intra- a inter-individuální variabilitu farmakokinetických parametrů nabumetonu a popsat vliv genotypu biotransformace cestou cytochromu P450 2D6 na variabilitu farmakokinetiky nabumetonu a 6-MNA po jednorázovém a opakovaném podání 24 zdravým dobrovolníkům.

Popis variability farmakokinetiky léčiva v populaci je významný pro predikci variability lékové odpovědi v praxi i plánování farmakokinetických studií. Pokud se na variabilitě farmakokinetiky léčiva podílí genetické faktory, je možné využít jejich analýzy k identifikaci pacientů s vysokým rizikem neúčinnosti léčby nebo její nadměrné toxicity. Farmakogenetické vyšetření by potom mohlo být doplňujícím vyšetřením při rozhodování o léčbě a dávkování nabumetonu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

studované látky: 6-MNA p.a. (MP Biomedicals), nabumeton p.a. (Sigma-Aldrich)

vnitřní standard: naproxen 98% (Sigma-Aldrich)

methanol pro HPLC (Lach-Ner), aceton p.a. (Merck), propan-2-ol p.a. (Lach-Ner)

kyselina *o*-fosforečná 85 % (Merck), fosforečnan sodný terciární čistý (Lachema),

acetonitril pro HPLC (Lach-Ner), kyselina trifluorooctová 99% (Sigma-Aldrich),

deionizovaná voda (Millipore), dusík 4.6 (Linde Gas), helium 4.6 (Linde Gas)

4.2 Biologický materiál

krevní plasma a reálné vzorky (1.LF UK)

4.3 Přístroje a vybavení

SPE kolonky *Discovery® DSC-18* (1ml, 100 mg), Supelco, USA

SPE kolonky *Discovery® DSC-8* (1ml, 100 mg), Supelco, USA

SPE kolonky *Discovery® DSC-Ph* (1ml, 100 mg), Supelco, USA

SPE aparatura *Vac Elut 20*, Varian, USA

pH metr *pH mini Lab IQ 125 Professional*, IQ Scientific, Japonsko

Analytické váhy *KERN ALJ 220-4*, KERN, Německo

Mikrováhy *Sartorius 7085011*, Sartorius AG, Německo

Odpařovací systém *TCS-Trockentemperier System*, Labortechnik Barkey, Německo

Kapalinový chromatograf *HP 1100* s UV DAD, Hewlett Packard, USA

Kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 µm, Supelco, USA

Security Guard *Fusion-RP* 4 x 2 mm, Phenomenex, USA

Hmotnostní spektrometr *Esquire 3000*, Bruker Daltonics, Německo

Vortex *Rx³*, Velp Scientifica, Itálie

Mikro dávkovač *Cole-Parmer® 74900*, Cole-Parmer Instrument Company, USA

Systém na přípravu deionizované vody *Direct-Q® 3 UV*, Millipore, USA

Centrifuga *Mini Spin Plus*, Eppendorf, Německo

Programové vybavení: Agilent ChemStation (Agilent), Esquire Control (Bruker Daltonics), pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)

4.4 Příprava zásobních roztoků a jejich skladování

Zásobní roztoky 6-MNA, nabumetonu a naproxenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v methanolu a skladovány bez přístupu světla při teplotě 5 °C. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou, nebo mobilní fází v případě HPLC experimentů.

4.5 Skladování vzorků krevní plasmy

Plasma pro SPE experimenty a reálné vzorky byly skladovány při teplotě -70 °C. Před analýzou byly ponechány stát při laboratorní teplotě 45 min. Tato doba byla dostatečná pro jejich kompletní rozštípení.

4.6 Podmínky měření MS spekter

Hmotnostní spektra 6-MNA, nabumetonu a naproxenu byla změřena s využitím ionizačních technik ESI (elektrosprej), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) v režimech snímání pozitivních i negativních iontů. Kromě těchto dvou ionizací byla vyzkoušena také APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku). Pracovní roztoky o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ připravené ve směsích acetonitril:voda 50:50 (v/v) a acetonitril:0,1% trifluorooctová kyselina 50:50 (v/v) byly aplikovány prostřednictvím přímé infúze. Podmínky měření shrnuje tabulka 4.1.

Tab. 4.1 Podmínky měření ESI a APCI spekter.

podmínky měření	ionizace	
	ESI	APCI
rozsah skenu [u]	50-500	50-500
teplota sušícího plynu [°C]	330	300
teplota iontového zdroje [°C]	-	300
tlak ve zmlžovači [psi]	8	30
průtok sušícího plynu (N ₂) [l·min ⁻¹]	4	7
napětí na kapiláře [kV]	4	4
průtoková rychlosť [μl·min ⁻¹]	14	155

4.7 Podmínky hmotnostní detekce pro HPLC

Vzhledem k tomu, že současné ionizace 6-MNA, naproxenu (I.S.) a nabumetonu bylo dosaženo při použití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v pozitivním módu, byla tato technika zvolena pro detekci při HPLC analýze. Hmotnostní spektrometr byl nastaven, aby společný ion analytů m/z 171 poskytoval maximální odezvu. Podmínky hmotnostní detekce uvádí tabulka 4.2.

TAB. 4.2 Podmínky APCI detekce pro HPLC.

podmínky měření	
rozsah skenu [u]	50-800
teplota sušícího plynu [°C]	250
teplota iontového zdroje [°C]	400
tlak plynu ve zmlžovači [psi]	30
průtok sušícího plynu (N_2) [$I \cdot min^{-1}$]	5
napětí na kapiláře [kV]	4

4.8 Optimalizace HPLC

HPLC separace byla prováděna na reverzní C18 koloně. Jako mobilní fáze byly vyzkoušeny směsi acetonitril/voda a acetonitril/0,1% TFA v izokratickém módu. UV detekce byla na základě spekter sledovaných látek prováděna při vlnové délce $\lambda = 230$ nm. Modelový roztok obsahoval směs 6-MNA, naproxenu (I.S.) a nabumetonu o koncentraci jednotlivých složek $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³. Nástřik činil 30 µl.

Pro charakterizaci retenčního chování látek byl sledován retenční čas (t_R), symetrie píku (S), počet teoretických pater (N) a rozlišení píků (R). Tyto parametry byly vypočítány programem Agilent ChemStation.

Symetrie píku (S) byla určena jako pseudomoment dle rovnice (1), výpočet jednotlivých momentů ukazují rovnice (1.1), (1.2), (1.3) a (1.4). Význam jednotlivých proměnných je vysvětlen obrázkem 4.1.

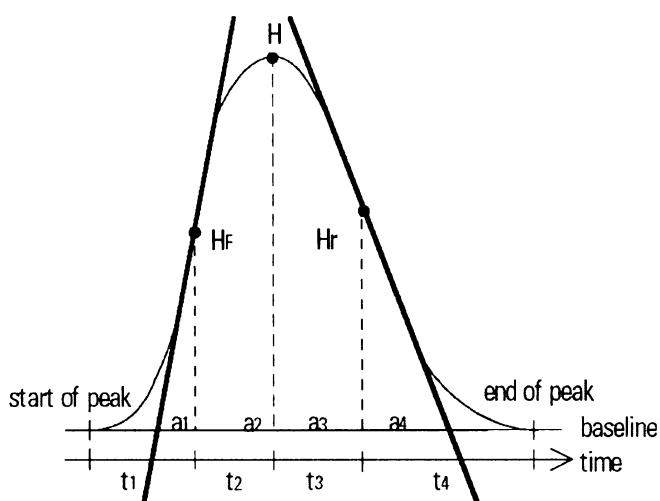
$$S = \sqrt{(m_1 + m_2)/(m_3 + m_4)} \quad (1)$$

$$m_1 = a_1(t_2 + a_1/1,5H_f) \quad (1.1)$$

$$m_2 = a_2^2 / 0,5H_f + 1,5H \quad (1.2)$$

$$m_3 = a_3^2 / 0,5H_r + 1,5H \quad (1.3)$$

$$m_4 = a_4(t_3 + a_4/1,5H_r) \quad (1.4)$$



Obr. 4.1 Výpočet symetrie píku v Agilent ChemStation [41].
(a_i = plocha řezu, t_i = čas řezu, H_F = výška předního inflexního bodu, H_r = výška zadního inflexního bodu, H = výška vrcholu)

Počet teoretických patér (N) byl vypočten dle vztahu

$$N = 5,54(t_R / w_{50})^2 \quad (2)$$

kde t_R je retenční čas látky [min], w_{50} je šířka píku v polovině výšky [min].

Rozlišení (R) bylo vypočteno podle rovnice

$$R = [(2,35/2)(t_{R(b)} - t_{R(a)})] / (w_{50(b)} + w_{50(a)}) \quad (3)$$

kde t_R je retenční čas látky [min], w_{50} je šířka píku v polovině výšky [min].

Současně s výše uvedenými parametry byla sledována intenzita signálu MS, konkrétně výška píku, která je méně ovlivňována průtokovou rychlostí [42], proto se zdá být pro tento účel vhodnější než plocha píku. Optimální podmínky pro analýzu extractů vzorků byly vybrány na základě dostatečné separace látek s dosažením co nejvyšší odezvy MS detekce. Zřetel byl brán na oddělení matričních píků, které by mohly interferovat s píky analytu a vnitřního standardu.

Za vybraných podmínek byla proměřena koncentrační závislost odezvy standardních roztoků 6-MNA a nabumetonu na těchto koncentračních úrovních $2 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ a $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do kalibračního grafu byl vynášen poměr plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standardu, nproxenu, který byl přítomen v koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Současně byly určeny instrumentální detekční limity (LOD) pro UV i MS detekci, a to jako koncentrace analytu, při které bylo dosaženo poměru signál/šum (S/N) o velikosti 3.

4.9 Extrakce na tuhou fázi

Pro předúpravu vzorků byla zvolena technika extrakce na tuhou fázi (SPE). Vzhledem k povaze studovaných látek byly vybrány tři nepolární sorbenty – silikagel modifikovaný C8, C18 a Ph, které byly dále porovnávány. Vlastnosti použitých kolonek jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 4.3 Vlastnosti použitých SPE kolonek.

kolonka	DSC-18	DSC-8	DSC-Ph
objem [ml]	1	1	1
množství sorbentu [mg]	100	100	100
rozsah značení [% C]	18	9	7
matrice	silikagel	silikagel	silikagel
velikost částic [μm]	50	50	50
velikost pórů [\AA]	70	70	70
plocha povrchu [$\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$]	480	480	480

Ve všech případech byl sorbent aktivován 2 ml methanolu a promyt 2 ml fosfátového pufru ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), stejným, jakým byl ředěn vzorek.

Modelové vzorky o známé koncentraci byly připraveny z krevní plasmy neobsahující žádný z analytů ani vnitřní standard přidáním příslušného množství roztoku analytů o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nižší. Celkový objem vzorku činil 0,5 ml. Ke vzorku bylo přidáno 50 μl roztoku vnitřního standardu $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, směs byla naředěna 0,5 ml fosfátového pufru a promíchána.

Pro úpravu pH vzorků bylo používáno ředění fosfátovým pufrem o různých hodnotách pH (pH 7,4; 6; 5; 4; 3; 2). Pro dosažení ještě nižších hodnot pH byly vzorky naředěny fosfátovým pufrem pH 2 a více okyseleny kyselinou fosforečnou (10% roztok ve vodě; přídavky 5, 10, 20, 50, 70 μl). Po promíchání směsi byla změřena skutečná hodnota pH.

Vzorek byl, stejně jako ostatní roztoky, aplikován pomocí negativního tlaku. Poté byla kolonka promyta 1 ml fosfátového pufru pro odstranění zbytků matrice a následně prosávána vzduchem po dobu 5 minut.

Zachycené látky byly vymyty 2 ml methanolu. Získaný extrakt byl odpařen dosucha pod mírným proudem dusíku při teplotě 45°C . Odpařený zbytek byl poté rozpuštěn ve 250 μl mobilní fáze a analyzován, nástřik na HPLC byl 30 μl .

Výtěžnost extrakce byla určována porovnáním plochy páku analytu z extraktu a plochy páku standardního roztoku o příslušné koncentraci.

Pro optimalizaci postupu byl sledován vliv pH vzorku, rychlosti aplikace a vliv elučního rozpouštědla na výtěžnost extrakce.

4.10 Validace metody

Validace metody byla provedena na základě doporučení pro validaci bioanalytických metod [43].

Pro nabumeton i 6-MNA byla sestrojeny kalibrační křivky. Vzorky o známé koncentraci s přídavkem vnitřního standardu byly zpracovány SPE a dále analyzovány pomocí HPLC s UV a MS detekcí. Pro 6-MNA byly připraveny roztoky o těchto koncentracích: $2 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm⁻³, pro nabumeton $2 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³.

Limit stanovení (LLOQ, Lower Limit of Quantification) byl určen jako nejnižší bod kalibrační křivky, kde pík analytu je identifikovatelný, oddělený a reprodukovatelný s přesností 20 % a správností 80 – 120 %.

Na všech koncentračních úrovních bylo zpracováno celkem pět vzorků. Ze získaných dat byly vypočítány následující parametry.

Správnost (accuracy) vyjadřuje blízkost změřené hodnoty a skutečné hodnoty koncentrace analytu. Hodnota by měla dosahovat maximálně 15% odchylky od skutečné hodnoty, v případě LLOQ by se neměla lišit o více než 20 %.

Přesnost (precision) vyjadřuje blízkost individuálních měření vzorků na stejné koncentrační hladině. Přesnost stanovení vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka by neměla přesáhnout 15 %, v případě LLOQ 20%.

Výtěžnost je určována jako odezva detektoru na analyt obsažený ve zpracovaném vzorku o známé koncentraci vztažená ku odezvě detektoru získané pro koncentraci čistého standardu. Výtěžnost nemusí dosahovat 100 %, ale měla by být stálá, přesná a reprodukovatelná. Výtěžnost byla sledována na nízké, střední a vysoké koncentraci, tj. $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ v případě 6-MNA a $5 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ pro nabumeton.

Selektivita metody byla testována analýzou slepých vzorků plasmy a bylo sledováno, zda se v chromatogramu nevyskytují interferenční píky, které by rušily stanovení analytů.

Součástí validace metody bylo studium stability zásobních roztoků a vzorků. V případě zásobních roztoků analytů a vnitřního standardu byla v časových intervalech měřena odezva detektoru skladovaných roztoků – nástrík 5 µl zásobního

roztoku (10^{-3} mol·dm $^{-3}$) při HPLC a detekčních podmírkách stejných jako při měření extraktů z plasmy. První měření proběhlo ihned po jejich přípravě.

Dále byla sledována stabilita popisující vliv zmrazení a roztáti vzorků v několika cyklech na koncentraci analytů ve vzorku. Vzorky o nízké a vysoké koncentraci analytů (množství dostatečné pro tři analýzy na koncentraci, pro 6-MNA $1 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$; $5 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ pro nabumeton) byly skladovány při teplotě -70°C po dobu 24 h. Poté byly nechány roztát při laboratorní teplotě a následně znova zmraženy. Tento postup byl opakován, až po čtvrtém roztáti vzorků byla provedena analýza.

Pro studium krátkodobé teplotní stability byly připraveny vzorky o nízké a vysoké koncentraci (pro 6-MNA $1 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$, $5 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ pro nabumeton, tři alikvoty od každé), ponechány při laboratorní teplotě 6 h a následně zpracovány.

Dále byla sledována dlouhodobá teplotní stabilita vzorků. Byly připraveny vzorky o nízké a vysoké koncentraci analytů (pro 6-MNA $1 \cdot 10^{-6}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$; $5 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ pro nabumeton). Vzorky byly uchovávány při teplotě -70°C a v časových intervalech analyzovány – tři stanovení od každé koncentrace.

4.11 Výsledná metoda zpracování reálných vzorků

Vzorky krevní plasmy byly nechány stát při laboratorní teplotě po dobu 45 min pro jejich kompletní roztátí. Poté byly promíchány a centrifugovány 1 min při 5000 rpm pro odstranění případných pevných částic.

K 0,5 ml vzorku bylo přidáno 50 μl roztoku vnitřního standardu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorek byl naředěn 0,5 ml fosfátového pufru pH 2 ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), okyselen 50 μl 10% kyseliny fosforečné a rádně promíchán.

Takto připravený vzorek byl aplikován na DSC-18 SPE kolonku předem promytou 2 ml methanolu a 2 ml fosfátového pufru pH 2 ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechny roztoky byly nechány protéct rychlostí $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Následně byla kolonka prosávána vzduchem po dobu 5 min. Zachycené látky byly vymyty 2 ml methanolu. Získaný extrakt byl odpařen dosucha při 45°C pod mírným proudem dusíku. Reziduum bylo poté rozpuštěno ve 250 μl mobilní fáze a 30 μl bylo nastříknuto na HPLC.

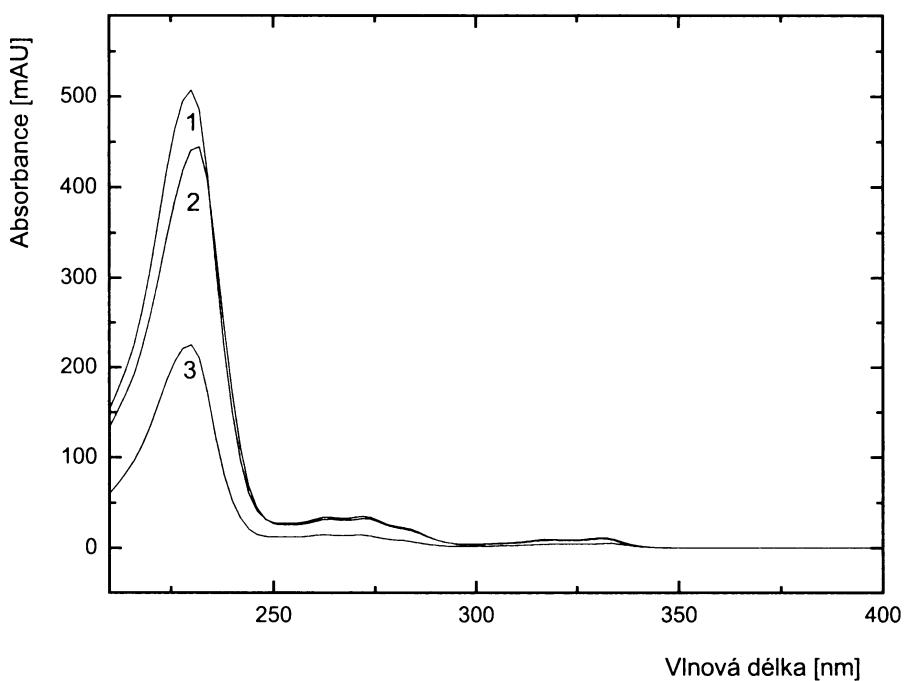
Separace probíhala na koloně *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm a jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril:0,1% TFA v poměru 50:50 (v/v) o průtokové rychlosti $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

UV detekce byla prováděna při vlnové délce absorpčního maxima sledovaných látek $\lambda = 230 \text{ nm}$. Současně byla využita hmotnostní detekce s chemickou ionizací za atmosférického tlaku v pozitivním módu (podmínky MS detekce jsou uvedeny v kapitole 4.7, str. 21). Vyhodnocení bylo prováděno podle chromatogramu nálezejícího nejintenzivnějšímu iontu ve spektru příslušné látky. Pro 6-MNA a nabumeton to byl ion m/z 171 a pro naproxen m/z 185.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 UV absorpční spektra látek

Studované látky díky svému aromatickému charakteru velmi dobře absorbují v UV oblasti. Na obrázku 5.1 lze vidět absorpční spektra 6-MNA, naproxenu a nabumetonu. Spektra byla zaznamenána pomocí DAD UV detektoru během HPLC analýzy a odečtena v maximech jednotlivých píků.



Obr. 5.1 UV absorpční spektrum 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3). (zaznamenáno DAD během HPLC analýzy $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ směsi 6-MNA, naproxenu a nabumetonu. Spektra odečtena v maximech píků. Kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 µm, ACN:voda 50:50 (v/v) 0,3 ml·min $^{-1}$, nástřik 30 µl)

Z obrázku je zřejmé, že průběh absorpčních křivek 6-MNA, naproxenu i nabumetonu je obdobný. Jejich absorpční maxima leží při vlnové délce $\lambda = 230$ nm, další méně intenzivní lokální maxima leží při vlnových délkách $\lambda = 270$ nm a $\lambda = 330$ nm. Pro detekci analytů ve spojení s HPLC byla zvolena vlnová délka $\lambda = 230$ nm.

5.2 Hmotnostní spektra látek

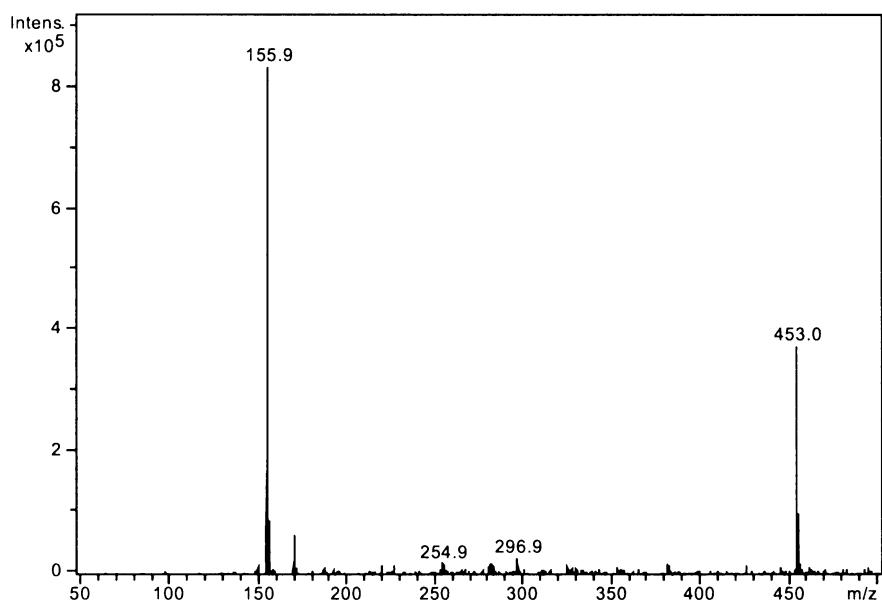
Pro měření hmotnostních spekter látek byly použity tři ionizační techniky – ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Při použití APPI nebyly nalezeny podmínky, při kterých by docházelo k významné ionizaci sledovaných látek, proto zde nejsou spektra uvedena.

5.2.1 Hmotnostní ESI spektra

Ionizace elektrosprejem patří stejně jako APCI a APPI mezi měkké ionizační techniky. Je vhodná zejména pro polární analyty snadno přístupné protonaci, či deprotonaci. Charakteristická je také přítomnost iontů tvořených adukty s kationty draslíku a sodíku.

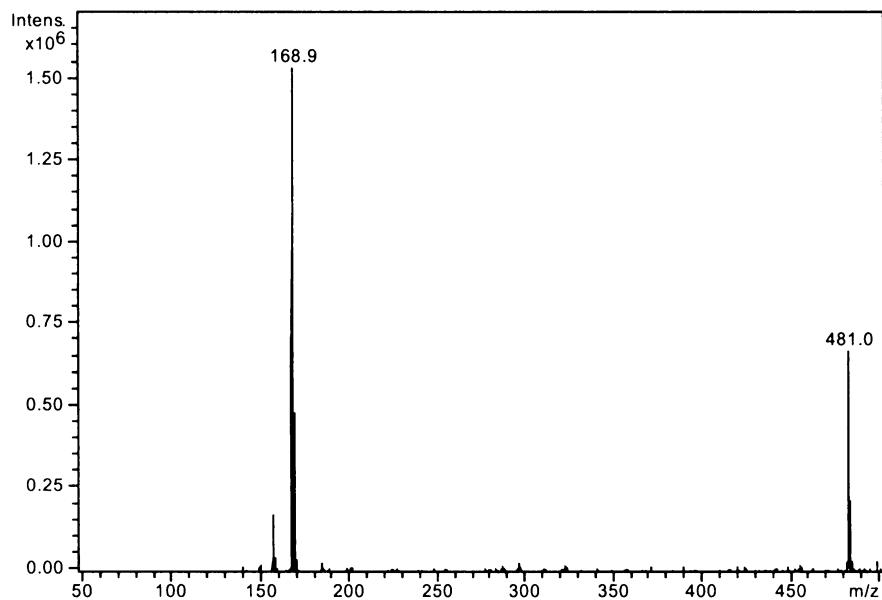
V případě 6-MNA a naproxenu se jedná o karboxylové kyseliny, které snadno odštěpují proton, proto byly obě látky dobře ionizovatelné v negativním módu. Naopak struktura nabumetonu obsahuje karbonyl, který je přístupný protonaci, proto poskytoval signál v pozitivním módu.

Na obrázku 5.2 je ESI spektrum 6-MNA v negativním módu, které se vyznačuje dvěma intenzivními ionty. Hmota m/z 453 náleží iontu tvořenému dvěma molekulami 6-MNA bez dvou atomů vodíku s jedním atomem sodíku $[2M-2H+Na]^-$, m/z 156 je pak fragmentovým iontem, který vznikl odštěpením kyseliny octové z postranního řetězce.



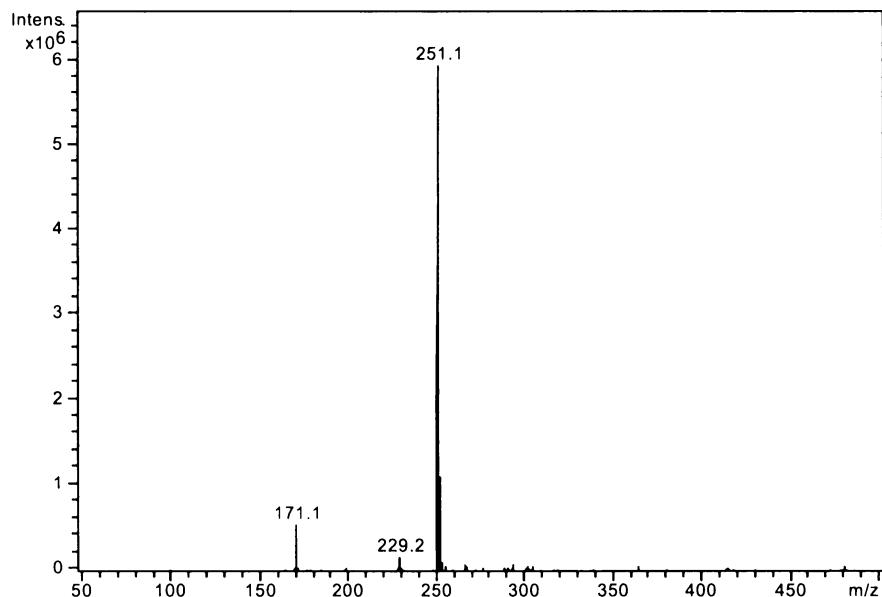
Obr. 5.2 Hmotnostní ESI spektrum 6-MNA, negativní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ roztok, ACN:voda 50:50 (v/v))

Na obrázku 5.3 je ESI spektrum naproxenu v negativním módu. Stejně jako v případě 6-MNA jsou zde zastoupeny dva intenzivní ionty, m/z 481 náleží opět iontu $[2M-2H+Na]^-$ a m/z 169 je fragmentový ion vzniklý odštěpením kyseliny octové.



Obr. 5.3 Hmotnostní ESI spektrum naproxenu, negativní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³ roztok, ACN:voda 50:50 (v/v))

V případě nabumetonu (viz Obr. 5.4) je v ESI spektru v pozitivním módu pozorovatelný ion m/z 229, který náleží protonované molekule $[M+H]^+$ a fragmentový ion m/z 171 vzniklý odštěpením části postranního řetězce $[M-CH_3COCH_2]^+$. Nejintenzivnějším iontem ve spektru je m/z 251, který odpovídá aduktu molekuly s atomem sodíku $[M+Na]^+$.



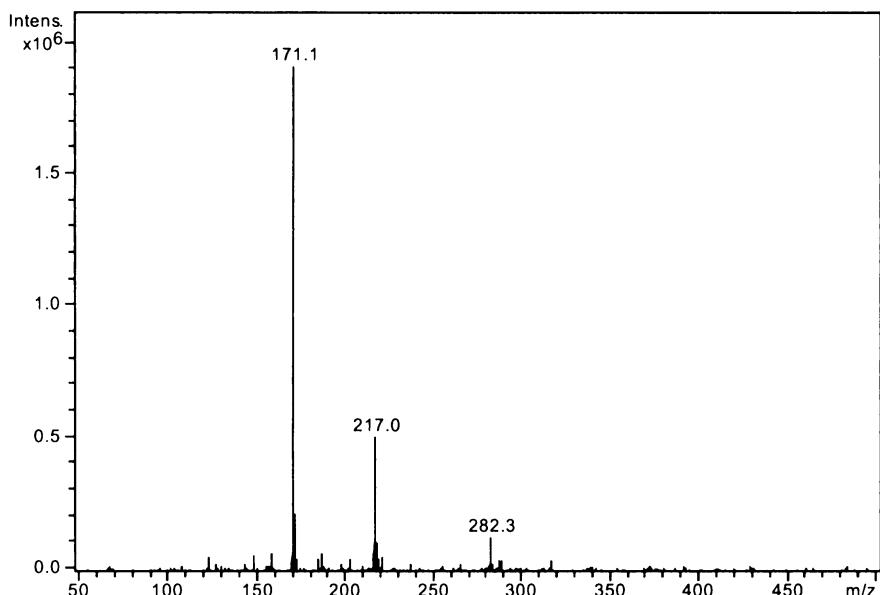
Obr. 5.4 Hmotnostní ESI spektrum nabumetonu, pozitivní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ roztok, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v))

5.2.2 Hmotnostní APCI spektra

Chemická ionizace za atmosférického tlaku také patří mezi šetrné ionizační techniky a je rovněž typická vznikem iontů protonovaných a deprotonovaných molekul. V porovnání s ESI je více energetická a vzniká tedy více fragmentů. APCI lze použít pro ionizaci látek špatně ionizovatelných pomocí ESI v důsledku jejich nižší polarity.

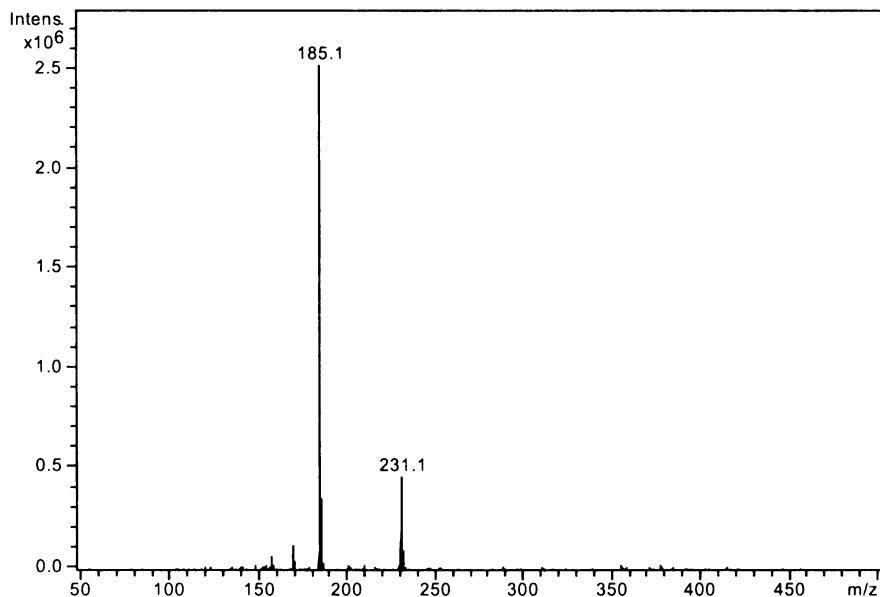
Při použití chemické ionizace za atmosférického tlaku všechny tři sledované látky poskytovaly signál pouze při záznamu kladných iontů.

Na obrázku 5.5 je zobrazeno spektrum 6-MNA, kde lze vidět ion m/z 217, který je tvořen protonovanou molekulou $[M+H]^+$ a fragmentový ion m/z 171, vzniklý dekarboxylací molekuly. Ion m/z 282 nepatří sledované látce, jedná se o ion z pozadí.



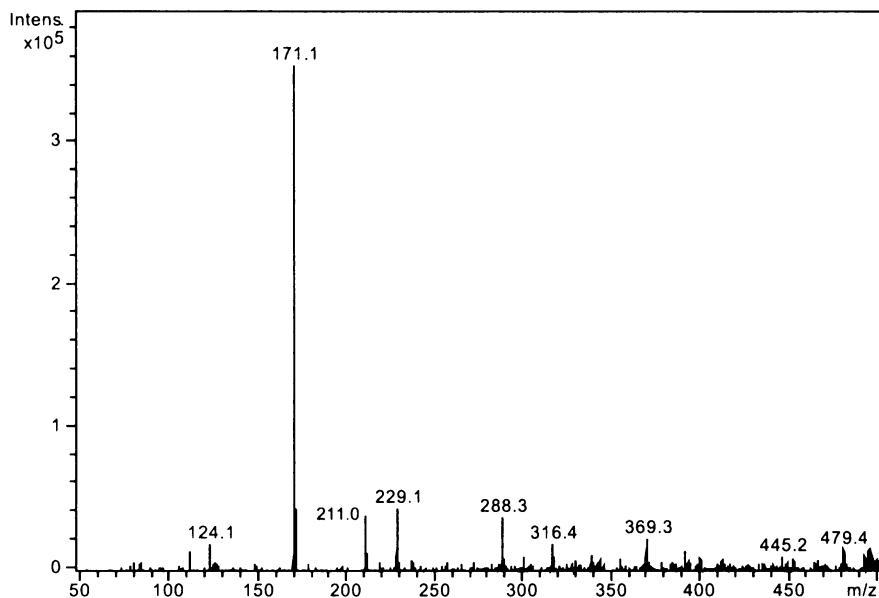
Obr. 5.5 Hmotnostní APCI spektrum 6-MNA, pozitivní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ roztok, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v))

Na obrázku 5.6 je APCI spektrum naproxenu. Opět je zde pozorovatelná protonovaná molekula $[M+H]^+$ o hmotě m/z 231 a intenzivní fragmentový ion m/z 185 vzniklý dekarboxylací.



Obr. 5.6 Hmotnostní APCI spektrum naproxenu, pozitivní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ roztok, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v))

Na obrázku 5.7 je zobrazeno spektrum nabumetonu. Ion m/z 229 patří protonované molekule $[M+H]^+$ a intenzivní m/z 171 je fragment vzniklý odštěpením části postranního řetězce $[M-\text{CH}_3\text{COCH}_2]^+$. Ion m/z 211 pak odpovídá ztrátě 17 u. Ostatní přítomné ionty patří k signálu pozadí.



Obr. 5.7 Hmotnostní APCI spektrum nabumetonu, pozitivní mód.
($5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ roztok, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v))

Spektra látek v pozitivním módu byla proměřena také s roztoky s přídavkem trifluorooctové kyseliny, která sloužila k podpoření ionizace v pozitivním módu. Celkový přehled všech významných iontů sledovaných látek je uveden v tabulce 5.1.

Tab. 5.1 Přehled významných iontů 6-MNA, naproxenu a nabumetonu při použití ionizací ESI a APCI.

sloučenina	ESI+		ESI-		APCI+		APCI-	
	iont	hmota	iont	hmota	iont	hmota	iont	hmota
6-MNA	-	-	2M-2H+Na	453	M+H	217	-	-
			M-60	156	M-45	171		
naproxen	-	-	2M-2H+Na	481	M+H	231	-	-
			M-61	169	M-45	185		
nabumeton	M+Na	251			M+H	229		
	M-57	171	-	-	M-57	171	-	-
					M-17	211		

Vysvětlivky: 2M-2H+Na ... ion tvořený dvěma molekulami analytu se ztrátou dvou atomů vodíku a připojením jednoho atomu sodíku; M+H ... ion odpovídající protonované molekule analytu; M-60 ... fragmentový ion odpovídající molekule se ztrátou 60 u, obdobně ostatní fragmentové ionty; proškrtnuté poličko znamená, že za daných podmínek nebyla pozorována ionizace sledovaných látek.

Z tabulky 5.1 vyplývá, že ionizace obou analytů a vnitřního standardu bylo dosaženo při použití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v režimu snímání kladných iontů. Tato ionizační technika byla zvolena pro detekci sledovaných látek ve spojení s HPLC. U všech látek byl k vyhodnocování používán chromatogram naležící jejich neintenzivnějšímu iontu. Pro 6-MNA a nabumeton se jedná o fragmentový ion m/z 171 a pro vnitřní standard naproxen fragmentový ion m/z 185.

5.3 Optimalizace HPLC

5.3.1 Volba mobilní fáze a průtokové rychlosti

HPLC separace analytů byla prováděna na reverzní C18 koloně. Testovány byly mobilní fáze o složení acetonitril/voda a acetonitril/0,1% TFA. Chromatografická separace byla ve všech případech provedena isokratickou eluční technikou.

Jako výchozí bod byla zvolena mobilní fáze acetonitril:voda 50:50 (v/v), kdy bylo dosaženo dobré separace analytů a vnitřního standardu. S využitím této mobilní fáze byl sledován vliv průtokové rychlosti na retenční chování analytů a zejména na ionizaci v MS detekci. Bylo zjištěno, že rostoucí průtoková rychlosť má negativní vliv na symetrii píků a odezva MS detekce (výška píku) při překročení průtoku $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ klesá (viz Tab. 5.2).

Tab. 5.2 Vliv průtokové rychlosti na retenční chování analytů a vnitřního standardu v mobilní fázi ACN:voda 50:50 (v/v).
(směs $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm , ACN:voda 50:50 (v/v), nástřik 30 μl)

	v [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	t_R [min]	S	N	R	výška píku MS
6-MNA	0,2	16,8	0,56	7748	-	886853
	0,3	11,5	0,56	7795	-	948176
	0,4	8,7	0,54	7536	-	731062
	0,5	7,0	0,53	7133	-	467083
	0,6	5,7	0,45	7469	-	245322
naproxen	0,2	20,9	0,66	8376	4,95	1399532
	0,3	14,1	0,59	8610	4,74	2175962
	0,4	10,8	0,55	8676	4,81	2070463
	0,5	8,6	0,53	8261	4,62	1620592
	0,6	7,1	0,46	8603	4,84	950832
nabumeton	0,2	36,5	0,91	8262	12,30	1210068
	0,3	24,0	0,88	9941	12,44	1692410
	0,4	18,4	0,89	10538	12,90	1320174
	0,5	14,7	0,88	11019	12,82	759193
	0,6	12,2	0,89	11316	13,34	312077

Separace látek na chemicky vázaných fázích, mezi které patří i použitá C18, využívá rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti. Vzhledem k tomu, že oktadecylové řetězce jsou nepolární, lépe s nimi interagují nepolární látky. Retenční mechanismus na chemicky vázaných fázích je složitý a stále ještě není zcela objasněn. Separaci komplikují volné silanolové skupiny na povrchu sorbentu,

které interagují s polárními molekulami solutu a způsobují nežádoucí chvostování píků [44]. 6-MNA i naproxen jsou polární látky, proto v jejich případě můžeme pozorovat nižší symetrii píků způsobenou zmínovanými interakcemi. V případě použití mobilní fáze s obsahem kyselé složky dojde k potlačení disociace karboxylových skupin 6-MNA a naproxenu a tím i ke zvýšení rozpustnosti v nepolární stacionární fázi. To má za následek vylepšení symetrie píků těchto dvou látek.

Jako druhá detekční technika byla použita hmotnostní spektrometrie s APCI ionizací v pozitivním módu. V tomto režimu jsou zaznamenávány kladné ionty a ve spektrech jsou kromě jiných pozorovány ionty odpovídající protonovaným molekulám analytů. Protonace molekul byla podpořena použitím okyselené mobilní fáze.

V tabulce 5.3 jsou uvedena data popisující chování sledovaných látek při použití mobilní fáze acetonitril:0,1% TFA v poměru 50:50 (v/v) při různých průtokových rychlostech. V porovnání s mobilní fází obsahující vodu, došlo k očekávanému vylepšení symetrie píků a k navýšení signálu MS, nicméně při překročení průtokové rychlosti $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ i za těchto podmínek účinnost ionizace MS klesá. S ohledem na zachování dobré odezvy hmotnostní detekce byla pro další práci zvolena průtoková rychlosť $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 5.3 Vliv průtokové rychlosti na retenční chování analytů a vnitřního standardu v mobilní fázi ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v).
(směs $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kolona Supelcosil LC-18 15cm x 4,6 mm 5 µm, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v), nástřík 30µl)

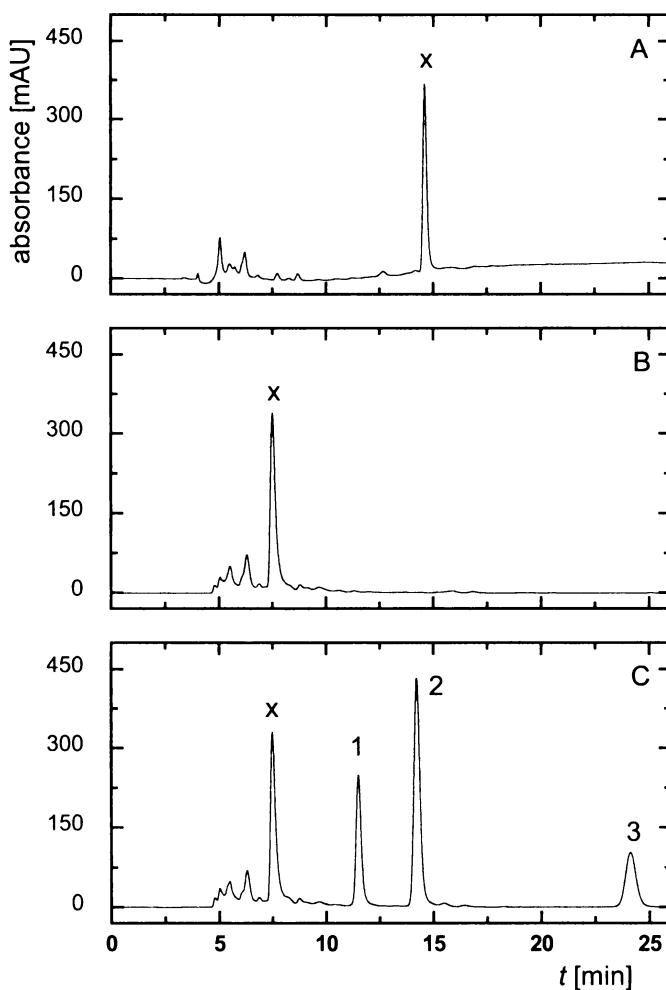
	v [ml·min ⁻¹]	t _R [min]	S	N	R	výška píku MS
6-MNA	0,2	17,9	0,78	7057	-	902291
	0,3	11,7	0,77	7566	-	1034917
	0,4	9,0	0,76	7686	-	785012
	0,5	7,2	0,76	7528	-	651948
	0,6	6,0	0,76	7389	-	348011
naproxen	0,2	22,2	0,82	7757	4,54	1389717
	0,3	14,6	0,79	8523	5,01	2176436
	0,4	11,2	0,81	8809	4,82	2448185
	0,5	8,9	0,80	8587	4,77	1859911
	0,6	7,4	0,80	8764	4,75	1413744
nabumeton	0,2	37,0	0,91	7930	11,53	1381150
	0,3	25,2	0,88	9603	12,73	1657266
	0,4	19,0	0,89	10535	12,91	1565902
	0,5	15,2	0,89	10895	12,99	838279
	0,6	12,6	0,89	11270	13,10	544907

Tabulka 5.4 shrnuje údaje o chování sledovaných látek v mobilní fázi s obsahem TFA za podmínek, kdy byl zvyšován podíl acetonitrilu. Vyšší obsah acetonitrilu vedl ke snížení retence a zhoršení symetrie píků. Odezva MS při obsahu acetonitrilu 50 % a více setrvávala na přibližně konstantní úrovni. Pro další práci byl zvolen poměr acetonitril:0,1% TFA 50:50 (v/v).

Tab. 5.4 Vliv složení mobilní fáze na retenční chování analytů a vnitřního standardu.
(směs $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$, kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 µm, průtok 0,3 ml·min $^{-1}$, nástřik 30µl)

	ACN:0,1% TFA	<i>t_R</i> [min]	S	N	R	výška píku MS
6-MNA	45:55	14,7	0,80	6977	-	881929
	50:50	11,8	0,75	7553	-	1194134
	55:45	10,0	0,73	8260	-	1420875
	60:40	8,9	0,72	8812	-	1510647
	65:35	8,1	0,72	8511	-	1588493
naproxen	45:55	19,4	0,84	8064	5,92	1734673
	50:50	14,5	0,79	8616	4,86	2337332
	55:45	11,8	0,76	9062	3,87	2675758
	60:40	10,1	0,74	9396	3,13	2656248
	65:35	8,9	0,74	9244	2,44	2586322
nabumeton	45:55	36	0,92	9010	13,87	1299403
	50:50	24,8	0,88	9716	12,56	2084224
	55:45	18,7	0,86	10091	11,08	2272620
	60:40	15,0	0,83	10387	9,61	2393887
	65:35	12,4	0,80	10279	8,08	2238555

Kromě již zmíněného vylepšení tvaru píků a podpoření ionizace MS detekce, mělo použití mobilní fáze s obsahem TFA další pozitivní dopad. Při analýze extraktu z „čisté“ krevní plasmy v mobilní fázi acetonitril/voda byl v oblasti předpokládané eluce analytů přítomen blíže neurčený pík z matrice (viz Obr. 5.8 chromatogram A). Při použití mobilní fáze s obsahem TFA byl tento pík méně zadržován na koloně, eluoval v kratším čase (viz Obr. 5.8 chromatogram B) a nijak neinterferoval s páky sledovaných látek (viz Obr. 5.8 chromatogram C).



Obr. 5.8 Vliv mobilní fáze na retenční chování matričních píků.

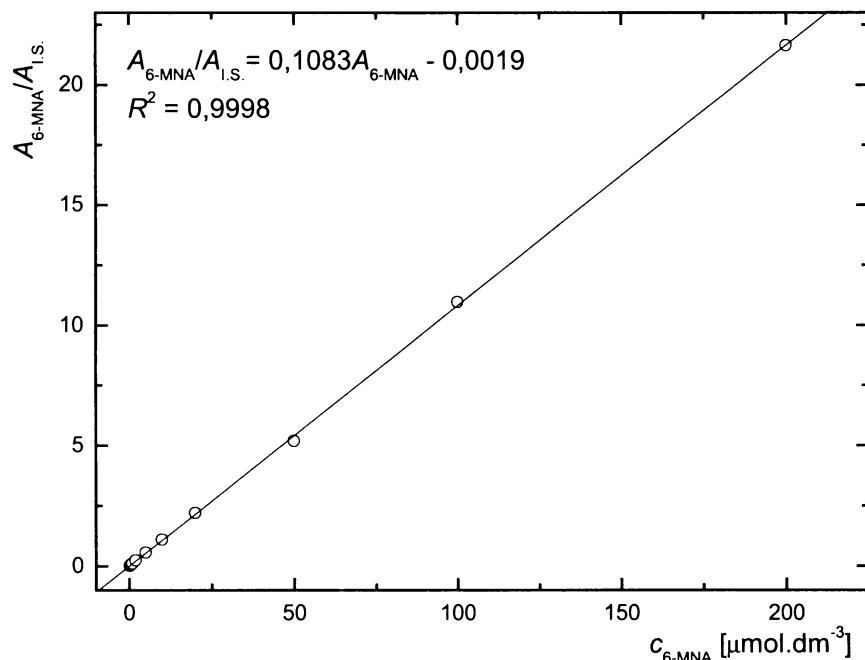
A – slepý vzorek z plasmy, ACN:voda 50:50 (v/v), $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 B – slepý vzorek z plasmy, ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v), $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
 C – extrakt z plasmy s analyty a I.S.
 6-MNA (1), naproxen (2), nabumeton (3), blíže neurčený pík (x)
 (kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm ACN:0,1% TFA
 50:50 (v/v); $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl ; UV 230 nm)

5.3.2 Odezva standardních roztoků

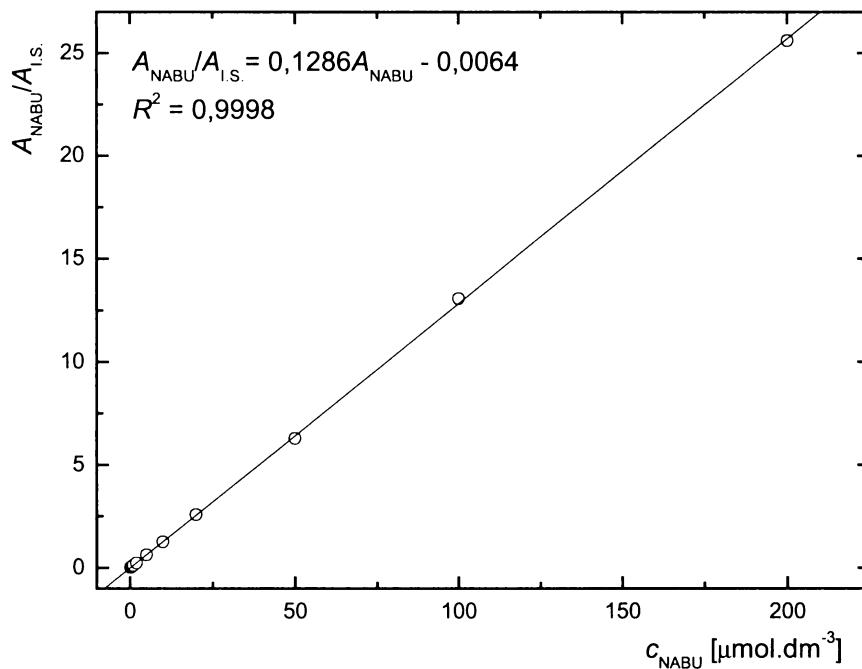
V přítomnosti naproxenu jako vnitřního standardu ($1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$) byla v koncentračním rozmezí $2 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm $^{-3}$ na deseti koncentračních úrovních proměřena odezva standardních roztoků 6-MNA a nabumetonu s využitím UV detekce. Rozmezí pro MS detekci bylo $5 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ mol·dm $^{-3}$, devět koncentračních úrovní.

Na obrázku 5.9 je zobrazena křivka instrumentální odezvy při UV detekci pro 6-MNA, na obrázku 5.10 pak pro nabumeton.

Odezva je pro oba analyty v uváděném rozsahu lineární a citlivost UV detekce je pro oba analyty obdobná. Instrumentální mez detekce pro 6-MNA činí $5 \cdot 10^{-8}$ mol·dm $^{-3}$ ($10,8$ ng·ml $^{-1}$), pro nabumeton $1 \cdot 10^{-7}$ mol·dm $^{-3}$ ($22,8$ ng·ml $^{-1}$).

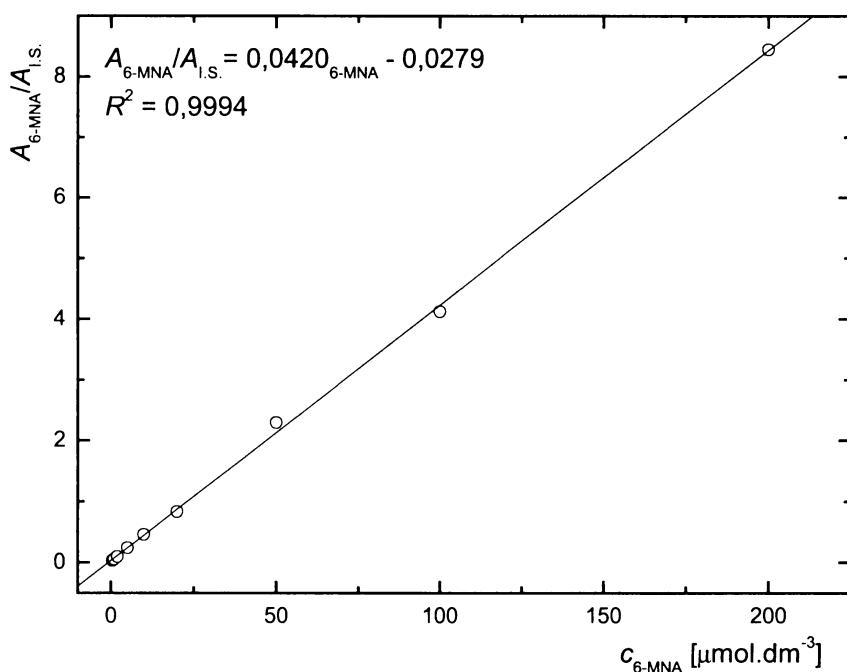


Obr. 5.9 Závislost odezvy standardních roztoků 6-MNA na koncentraci.
(kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA 50:50
(v/v) 0,3 ml·min $^{-1}$; nástřík 30 μl , UV 230 nm)

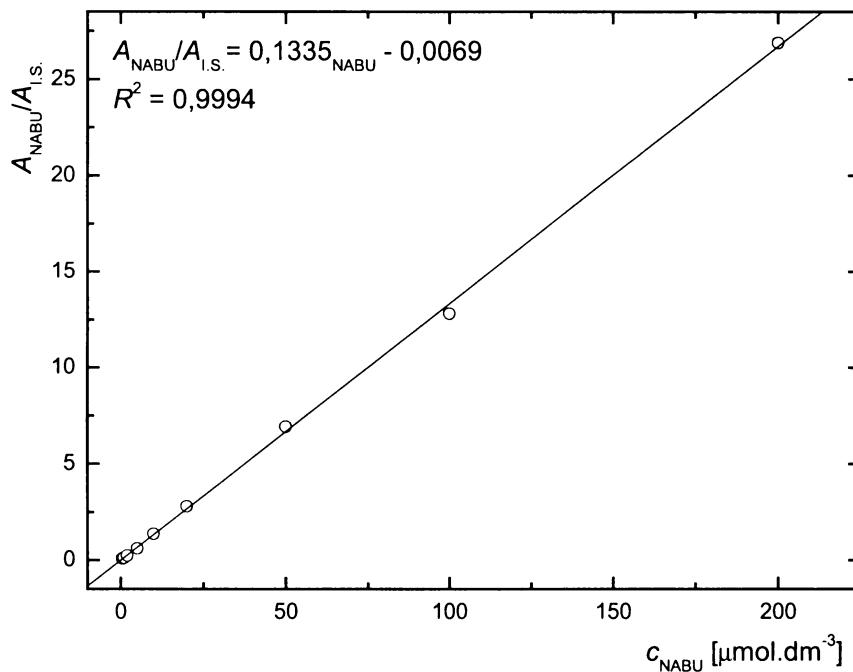


Obr. 5.10 Závislost odezvy standardních roztoků nabumetonu na koncentraci.
 (kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA 50:50
 (v/v) 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl , UV 230 nm)

Na obrázku 5.11 je zobrazena koncentrační závislost odezvy MS detekce pro 6-MNA, na obrázku 5.12 pak pro nabumeton. Obě křivky jsou v uváděném rozmezí lineární. Jak ukazuje směrnice přímky, MS detekce je citlivější pro nabumeton. Instrumentální mez detekce pro 6-MNA činí $2 \cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($43,2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), pro nabumeton $1 \cdot 10^{-7}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($22,8 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Obr. 5.11 Závislost odezvy standardních roztoků 6-MNA na koncentraci.
 (kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA
 50:50 (v/v) 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl , MS m/z 171, m/z 185)



Obr. 5.12 Závislost odezvy standardních roztoků nabumetonu na koncentraci.
 (kolona *Supelcosil LC-18* 15cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA
 50:50 (v/v) 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl , MS m/z 171, m/z 185)

5.4 Optimalizace SPE

Pro předúpravu vzorků krevní plasmy pomocí SPE byly testovány tři nepolární sorbenty na bázi silikagelu – C8, C18, Ph.

5.4.1 Vliv pH vzorku na výtěžnost extrakce

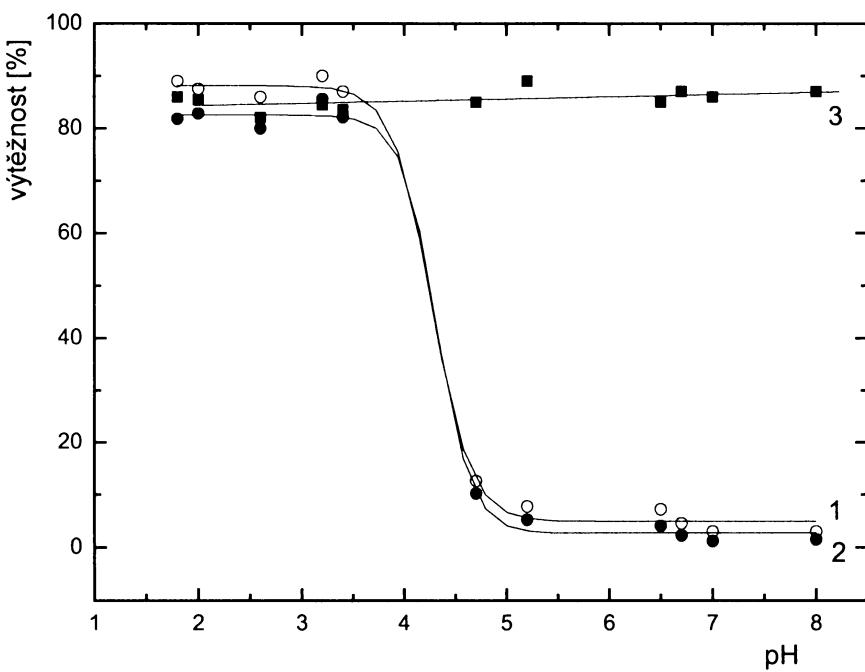
Vzhledem ke skutečnosti, že 6-MNA i naproxen (I.S.) jsou karboxylové kyseliny, je úprava pH vzorku před samotnou extrakcí kritickým krokem pro dosažení co nejvyšší výtěžnosti. V této práci byly použity nepolární sorbenty. Okyselením vzorků dojde k potlačení disociace karboxylové skupiny naproxenu a 6-MNA. Tím se zlepší interakce s nepolární stacionární fází a je tak dosaženo vyšší výtěžnosti extrakce. Úprava pH byla prováděna postupem uvedeným v kapitole 4.9 (str. 23).

Závislost výtěžnosti extrakce na pH vzorku je zobrazena na následujících obrázcích. Obr. 5.13 uvádí tuto závislost při použití SPE kolonky DSC-Ph, Obr. 5.14 kolonky DSC-8 a Obr. 5.15 DSC-18.

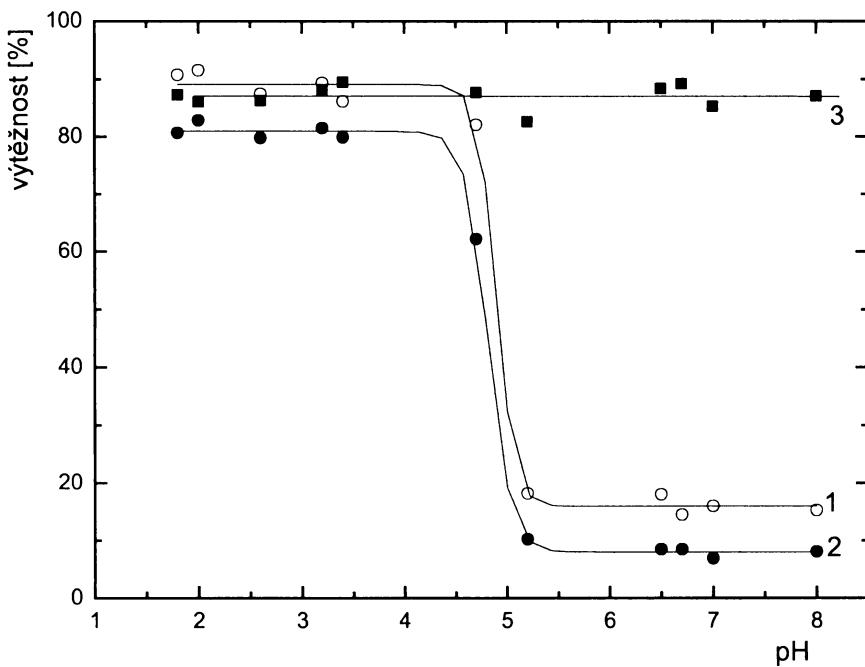
6-MNA i naproxen se vzhledem ke své kyselé povaze dobře extrahují z kyselých roztoků. Naopak nabumeton je neutrální látka a pH vzorku nemá v jeho případě na výtěžnost extrakce vliv.

Na všech použitých sorbentech bylo dosaženo přibližně stejné výtěžnosti. Všechny tři typy SPE kolonek by byly vhodné pro tuto práci. Další experimenty byly prováděny s kolonkami DSC-18, které byly vybrány s ohledem na jejich univerzálnost a možnost využití i pro jiné aplikace.

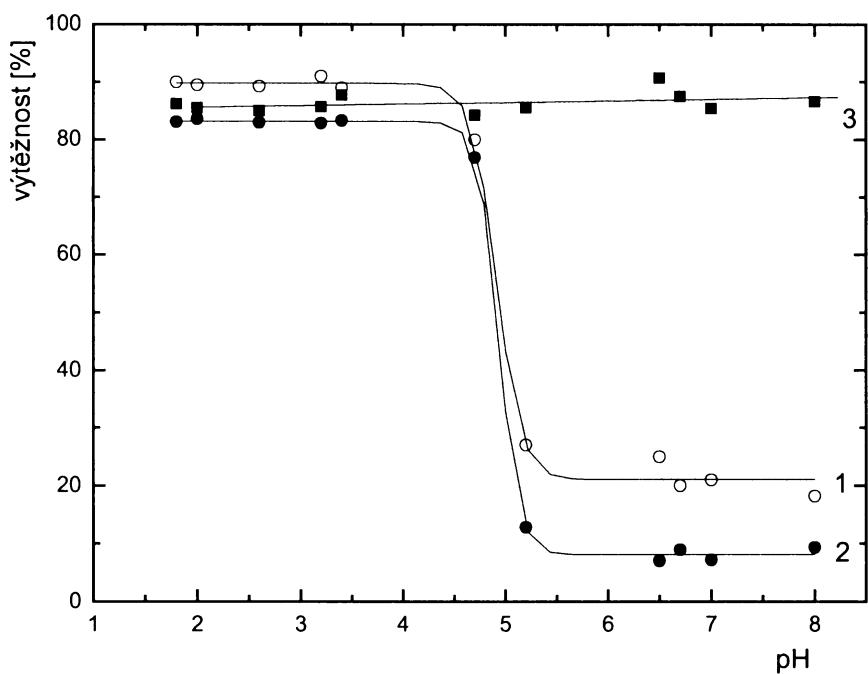
V případě extrakce analytů kyselé povahy se všeobecně doporučuje upravit pH vzorku na hodnotu o dvě jednotky nižší než je pK_a dané látky. V takovém případě je dosaženo úplného potlačení disociace. Pro další zpracování vzorků byla zvolena úprava pH na hodnotu 2 (ředění 0,5 ml fosfátového pufra a přídavek 50 μ l 10% kyseliny fosforečné), kdy bylo dosaženo výtěžnosti v rozmezí 80–90 %. I přes nízkou hodnotu pH byl sorbent v použitých kolonkách stabilní. K jejich znehodnocení došlo obvykle ucpáním. Nepříznivý vliv nízkého pH vzorku na životnost sorbentu nebyl pozorován. Průměrně bylo možné na jedné kolonce provést pět až sedm extrakcí.



Obr. 5.13 Vliv pH vzorku na výtěžnost 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3) při použití SPE kolonky DSC-Ph.
(koncentrace analytů $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$; eluce: 2ml methanol; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 μ m; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v)
0,3 ml·min $^{-1}$; nástřik 30 μ l; UV 230 nm)



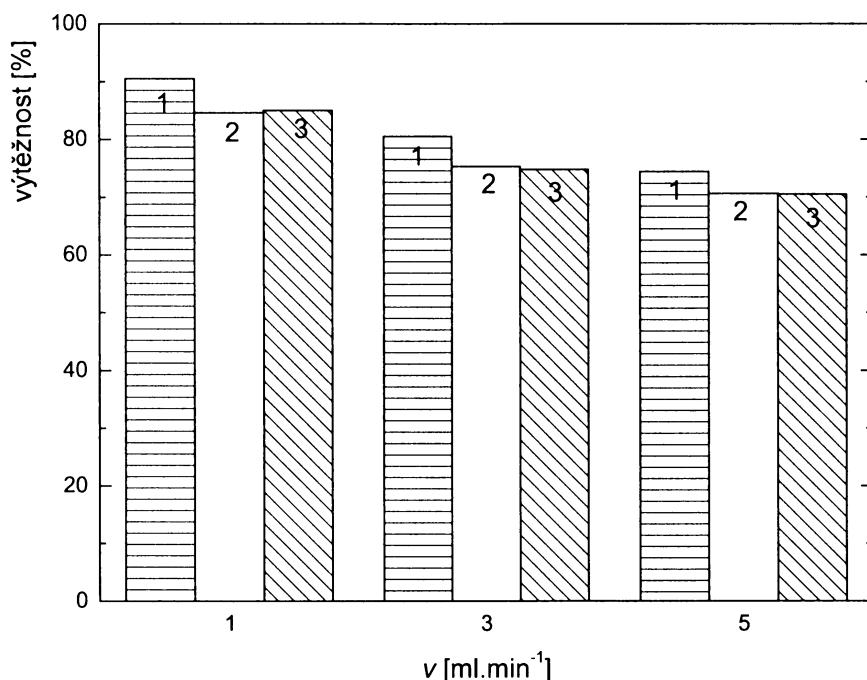
Obr. 5.14 Vliv pH vzorku na výtěžnost 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3) při použití SPE kolonky DSC-C8.
(koncentrace analytů $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$; eluce: 2ml methanol; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 μ m; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v)
0,3 ml·min $^{-1}$; nástřik 30 μ l; UV 230 nm)



Obr. 5.15 Vliv pH vzorku na výtěžnost 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3) při použití SPE kolonky DSC-C18.
 (koncentrace analytů $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$; eluce: 2ml methanol; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 µm; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v) 0,3 ml·min $^{-1}$; nástrčík 30 µl; UV 230 nm)

5.4.2 Vliv rychlosti aplikace vzorku na výtěžnost extrakce

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje výtěžnost extrakce, je rychlosť aplikace vzorku. Porovnány byly tři průtokové rychlosti – 1, 3 a 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, viz Obr. 5.16. Při rychlejší aplikaci nestačí analyty v dostatečné míře interagovat se stacionární fází a výtěžnost extrakce se snižuje. Pro další práci byla používána průtoková rychlosť 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy bylo dosaženo uspokojivé výtěžnosti 85–90 % pro všechny tři látky.

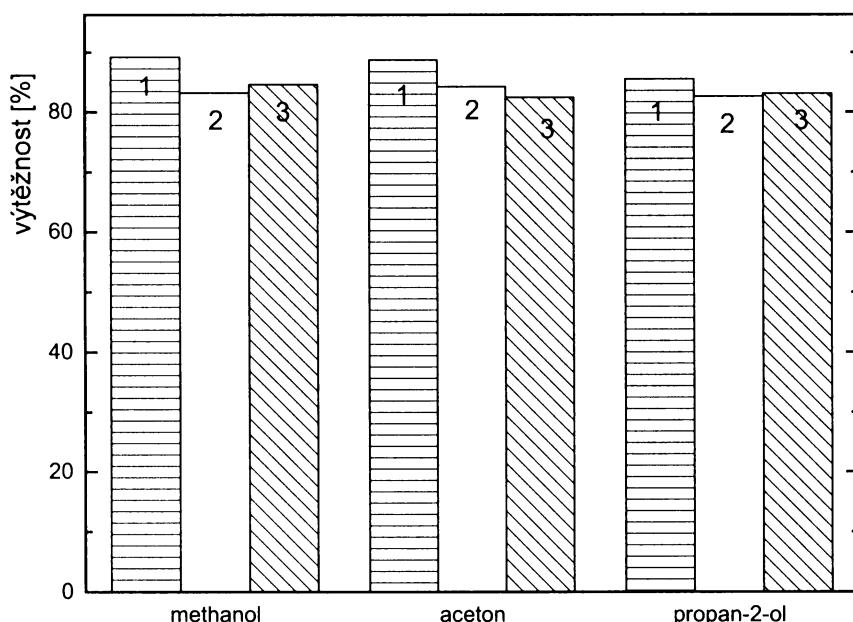


Obr. 5.16 Vliv rychlosti aplikace vzorku na výtěžnost 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3).

(koncentrace analytů $2\cdot10^{-5}$ mol \cdot dm $^{-3}$, pH 2, eluce: 2 ml methanol; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v) 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl ; UV 230 nm)

5.4.3 Vliv elučního rozpouštědla na výtěžnost extrakce

Dalším krokem optimalizace SPE bylo pozorování vlivu elučního rozpouštědla. Porovnávána byla tři různá rozpouštědla – methanol, aceton a propan-2-ol. Z obrázku 5.17 je zřejmé, že dosažená výtěžnost u všech tří rozpouštědel je přibližně stejná, analyty jsou tedy vymývány ze stacionární fáze všemi sledovanými rozpouštědly stejně dobře. Pro další práci byl zvolen methanol, s ohledem na jeho běžné použití v laboratoři.



Obr. 5.17 Vliv elučního rozpouštědla na výtěžnost extrakce 6-MNA (1), naproxenu (2) a nabumetonu (3).
(koncentrace analytů $2 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$, pH 2, eluce: 2ml rozpouštědla; kolona Supelcosil LC-18 15 cm x 4,6 mm 5 µm; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v) 0,3 ml·min $^{-1}$; nástřik 30 µl; UV 230 nm)

5.5 Výsledky validace metody

V kapitole 4.11 (str. 27) je uvedena výsledná podoba metody tak, jak byla validována. Stejným postupem pak byly zpracovávány reálné vzorky.

Vyhodnocení validace bylo provedeno pro UV a pro MS detekci zvlášť. Parametry validace pro stanovení 6-MNA jsou uvedeny v tabulce 5.5. Výsledky validace metody stanovení nabumetonu jsou uvedeny v tabulce 5.6.

Tab. 5.5 Vyhodnocení validace metody stanovení 6-MNA.

detekce	UV	MS
rovnice regrese	$y = 98284x + 0,0073$	$y = 49262x - 0,0884$
R^2	0,9993	0,9989
LLOQ [mol·dm ⁻³]	$5 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$
ULOQ [mol·dm ⁻³]	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
počet kalibračních bodů	8	6
přesnost [%]	2,4 - 12,5	2,1 - 9,4
správnost [%]	87,8 - 107,4	86,3 - 106,4

TAB. 5.6 Vyhodnocení validace metody stanovení nabumetonu.

detekce	nabumeton	
	UV	MS
rovnice regrese	$y = 90991x - 0,0006$	$y = 107776x - 0,0479$
R^2	0,9990	0,9977
LLOQ [mol·dm ⁻³]	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$
ULOQ [mol·dm ⁻³]	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
počet kalibračních bodů	6	6
přesnost [%]	4,2-14,4	4,6-8,5
správnost [%]	93,4-109,6	86,2-107,9

Tab. 5.7 Výtěžnost metody pro 6-MNA a nabumeton.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

	koncentrace [mol·dm ⁻³]	výtěžnost [%]			medián
6-MNA	$1 \cdot 10^{-6}$	86	89	91	86
	$1 \cdot 10^{-5}$	85	92	87	87
	$5 \cdot 10^{-5}$	90	91	90	90
nabumeton	$5 \cdot 10^{-7}$	79	80	84	84
	$2 \cdot 10^{-6}$	84	82	88	84
	$1 \cdot 10^{-5}$	85	86	84	85

Metoda stanovení 6-MNA a nabumetonu splňuje požadavky na přesnost a správnost. Kalibrační závislosti byly ve studovaných rozmezích lineární a výtěžnost pro oba analyty se pohybovala v rozmezí 84–90 % (viz Tab. 5.7). Selektivita metody byla testována analýzou deseti „slepých“ vzorků, přičemž nebyly pozorovány žádné interference.

Zároveň byly určeny detekční limity pro obě stanovované látky. Limit UV detekce pro 6-MNA byl $5 \cdot 10^{-8}$ mol·dm⁻³ (10,8 ng·ml⁻¹), pro nabumeton $1 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (22,8 ng·ml⁻¹). Limit MS detekce pro 6-MNA činil $1 \cdot 10^{-6}$ mol·dm⁻³ (216,2 ng·ml⁻¹), pro nabumeton $5 \cdot 10^{-7}$ mol·dm⁻³ (114,2 ng·ml⁻¹).

Pokud je provedeno srovnání obou detekčních technik, lze říci, že UV detekce, jak dokládají směrnice z rovnic kalibračních přímek, je stejně citlivá pro 6-MNA i pro nabumeton. Pokud stejným způsobem zhodnotíme hmotnostní detekci, je citlivější pro nabumeton (směrnice kalibrační přímky nabumetonu je přibližně dvakrát větší než směrnice kalibrační přímky 6-MNA). Při použití UV detekce bylo u obou analytů dosaženo nižší meze detekce než v případě detekce hmotnostní. Lze předpokládat, že použitím techniky SIM u kvadrupólového hmotnostního spektrometru, případně techniky MRM u tandemových přístrojů by bylo možné zvýšit citlivost o několik řádů a dostat se minimálně na úroveň UV detekce.

Stabilita zásobních roztoků

Součástí validace bylo sledování stability zásobních roztoků a vzorků krevní plasmy, vyhodnocení bylo prováděno podle UV detekce.

Tabulka 5.8 uvádí data stability zásobních roztoků 6-MNA, naproxenu a nabumetonu. Stabilita byla sledována v intervalech po dobu 120 dní, během této doby nedošlo k významnému poklesu koncentrace v roztocích jednotlivých látek.

Tab. 5.8 Stabilita zásobních roztoků analytů a vnitřního standardu.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

den	$A_{6\text{-MNA}}$	$A_{I.S.}$	A_{NABU}
0	58460 (100%)	57615 (100%)	71270 (100%)
14	58396 (99%)	57288 (99%)	72888 (102%)
30	58646 (100%)	56998 (99%)	71003 (100%)
60	56153 (96%)	56087 (97%)	70132 (98%)
120	57517 (98%)	56432 (98%)	69824 (98%)

Stabilita vzorků krevní plasmy

Vzorky krevní plasmy byly podrobeny čtyřem cyklům zmrazení a opětovného roztáti. Takováto manipulace se vzorky nevedla k významnému poklesu obsahu analytů ve vzorku, viz Tab. 5.9.

TAB. 5.9 Stabilita vzorků krevní plasmy po čtyřech cyklech zmrazení a roztáti.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

	6-MNA	nabumeton	
koncentrace vzorku [mol·dm ⁻³]	1·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁷
1·10 ⁻⁵			
nalezená koncentrace [mol·dm ⁻³]	1,08·10 ⁻⁶	4,97·10 ⁻⁵	5,04·10 ⁻⁷
9,99·10 ⁻⁷	4,84·10 ⁻⁵	4,76·10 ⁻⁷	9,72·10 ⁻⁶
1,07·10 ⁻⁶	4,75·10 ⁻⁵	4,84·10 ⁻⁷	9,87·10 ⁻⁶
medián	1,07·10 ⁻⁶	4,84·10 ⁻⁵	4,84·10 ⁻⁷
s	4,79·10 ⁻⁸	1,30·10 ⁻⁶	1,65·10 ⁻⁸
s _r [%]	4,5	2,7	3,4
L _{1,2}	1,11·10 ⁻⁷	2,86·10 ⁻⁶	3,64·10 ⁻⁸
			7,54·10 ⁻⁷

Dále byla sledována krátkodobá teplotní stabilita vzorků krevní plasmy, kdy byly roztoky ponechány při laboratorní teplotě po dobu šesti hodin. Vzorky se ukázaly být stabilní (viz Tab. 5.10). Doba potřebná pro předúpravu vzorků je výrazně kratší, proto lze předpokládat, že během tohoto zpracování ke ztrátám nedochází.

Tab. 5.10 Krátkodobá teplotní stabilita vzorků krevní plasmy.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

	6-MNA	nabumeton	
koncentrace vzorku [mol·dm ⁻³]	1·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁷
1·10 ⁻⁵			
nalezená koncentrace [mol·dm ⁻³]	9,57·10 ⁻⁷	4,85·10 ⁻⁵	5,09·10 ⁻⁷
1,05·10 ⁻⁶	4,76·10 ⁻⁵	4,96·10 ⁻⁷	9,55·10 ⁻⁶
9,86·10 ⁻⁷	4,75·10 ⁻⁵	5,01·10 ⁻⁷	9,70·10 ⁻⁶
medián	9,86·10 ⁻⁷	4,76·10 ⁻⁵	5,01·10 ⁻⁷
s	5,40·10 ⁻⁸	5,91·10 ⁻⁷	7,68·10 ⁻⁹
s _r [%]	5,5	1,2	1,5
L _{1,2}	1,21·10 ⁻⁷	1,30·10 ⁻⁶	1,69·10 ⁻⁸
			1,95·10 ⁻⁷

Dalším parametrem, který byl sledován, byla dlouhodobá stabilita. Vzorky plasmy byly skladovány při teplotě -70°C a v časových intervalech analyzovány. Tabulka 5.11 udává výsledky analýzy po 60 a 120 dnech skladování. Jak je vidět z uvedených nalezených koncentrací, nedochází během této doby k významnému poklesu koncentrace analytů ve vzorcích.

TAB. 5.11 Dlouhodobá stabilita vzorků. (vyhodnoceno podle UV detekce)

	6-MNA	nabumeton		
konzentrace vzorku [mol·dm ⁻³]	$1\cdot10^{-6}$	$5\cdot10^{-5}$	$5\cdot10^{-7}$	$1\cdot10^{-5}$
nalezená koncentrace po 60 dnech [mol·dm ⁻³]	$9,75\cdot10^{-7}$	$4,81\cdot10^{-5}$	$4,82\cdot10^{-7}$	$9,75\cdot10^{-6}$
medián	$9,75\cdot10^{-7}$	$4,81\cdot10^{-5}$	$4,82\cdot10^{-7}$	$9,75\cdot10^{-6}$
s	$1,18\cdot10^{-8}$	$1,06\cdot10^{-6}$	$2,13\cdot10^{-8}$	$8,87\cdot10^{-8}$
s _r [%]	1,2	2,2	4,4	0,9
L _{1,2}	$2,60\cdot10^{-8}$	$2,34\cdot10^{-6}$	$4,68\cdot10^{-8}$	$1,95\cdot10^{-7}$
nalezená koncentrace po 120 dnech [mol·dm ⁻³]	$9,89\cdot10^{-7}$	$4,91\cdot10^{-5}$	$4,92\cdot10^{-7}$	$9,91\cdot10^{-6}$
medián	$1,04\cdot10^{-6}$	$4,92\cdot10^{-5}$	$5,06\cdot10^{-7}$	$1,01\cdot10^{-5}$
s	$5,97\cdot10^{-8}$	$7,68\cdot10^{-7}$	$1,00\cdot10^{-8}$	$5,85\cdot10^{-7}$
s _r [%]	5,7	1,6	2,0	5,8
L _{1,2}	$1,31\cdot10^{-7}$	$1,69\cdot10^{-6}$	$2,21\cdot10^{-8}$	$1,29\cdot10^{-6}$

Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla zhodnocena na základě výsledků analýz kontrolních vzorků, které byly provedeny v průběhu pěti týdnů. Celkem bylo analyzováno deset sérií po třech koncentracích (nízké, střední a vysoké) pro oba analyty. 6-MNA byla sledována na koncentračních úrovních $1\cdot10^{-6}$, $1\cdot10^{-5}$ a $5\cdot10^{-5}$ mol·dm⁻³, nabumeton pak na koncentracích $5\cdot10^{-7}$, $2\cdot10^{-6}$ a $1\cdot10^{-5}$ mol·dm⁻³. V tabulce 5.12 je uvedeno vyhodnocení opakovatelnosti metody pro 6-MNA, v tabulce 5.13 pro nabumeton.

Tab. 5.12 Opakovatelnost stanovení 6-MNA na koncentracích $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³, statistické vyhodnocení.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

č.	nalezená koncentrace [mol·dm ⁻³]		
1	$9,30 \cdot 10^{-7}$	$1,02 \cdot 10^{-5}$	$5,21 \cdot 10^{-5}$
2	$1,08 \cdot 10^{-6}$	$1,02 \cdot 10^{-5}$	$4,83 \cdot 10^{-5}$
3	$9,99 \cdot 10^{-7}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$4,95 \cdot 10^{-5}$
4	$1,08 \cdot 10^{-6}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	$4,97 \cdot 10^{-5}$
5	$8,98 \cdot 10^{-7}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$	$5,10 \cdot 10^{-5}$
6	$9,57 \cdot 10^{-7}$	$8,97 \cdot 10^{-6}$	$4,96 \cdot 10^{-5}$
7	$1,07 \cdot 10^{-6}$	$1,03 \cdot 10^{-5}$	$4,76 \cdot 10^{-5}$
8	$9,86 \cdot 10^{-7}$	$9,49 \cdot 10^{-6}$	$4,99 \cdot 10^{-5}$
9	$9,95 \cdot 10^{-7}$	$1,02 \cdot 10^{-5}$	$4,87 \cdot 10^{-5}$
10	$9,20 \cdot 10^{-7}$	$9,25 \cdot 10^{-6}$	$4,83 \cdot 10^{-5}$
medián	$9,91 \cdot 10^{-7}$	$1,02 \cdot 10^{-5}$	$4,96 \cdot 10^{-5}$
s	$5,92 \cdot 10^{-8}$	$6,27 \cdot 10^{-7}$	$1,46 \cdot 10^{-6}$
s _r [%]	5,9	6,1	2,9
L _{1,2}	$4,19 \cdot 10^{-8}$	$4,43 \cdot 10^{-7}$	$1,04 \cdot 10^{-6}$

Tab. 5.13 Opakovatelnost stanovení nabumetonu na koncentracích $5 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm⁻³, statistické vyhodnocení.
(vyhodnoceno podle UV detekce)

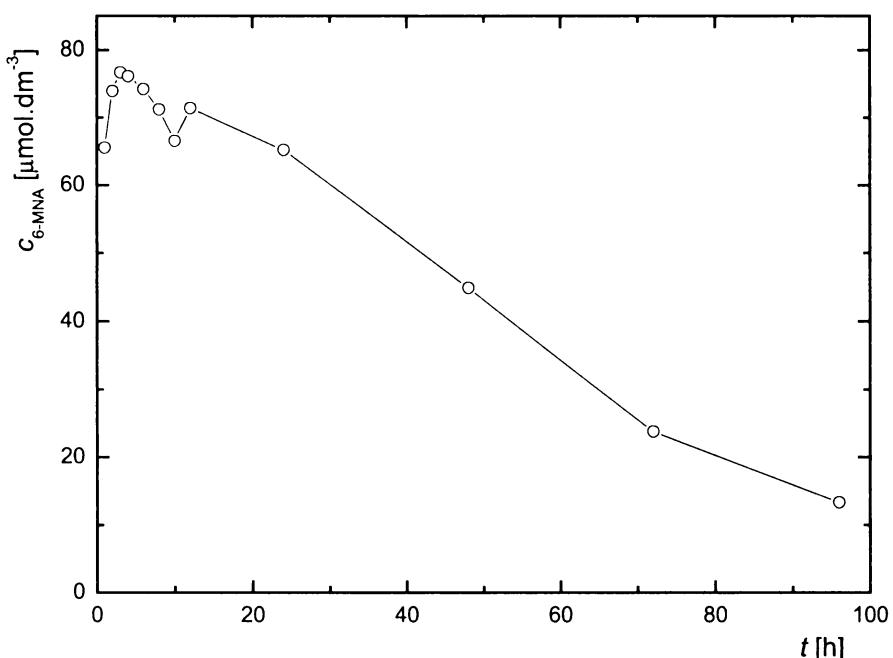
č.	nalezená koncentrace [mol·dm ⁻³]		
1	$5,03 \cdot 10^{-7}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$	$1,08 \cdot 10^{-5}$
2	$5,15 \cdot 10^{-7}$	$2,03 \cdot 10^{-6}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$
3	$4,97 \cdot 10^{-7}$	$1,98 \cdot 10^{-6}$	$9,84 \cdot 10^{-6}$
4	$5,09 \cdot 10^{-7}$	$1,92 \cdot 10^{-6}$	$1,03 \cdot 10^{-5}$
5	$4,96 \cdot 10^{-7}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$	$9,88 \cdot 10^{-6}$
6	$5,01 \cdot 10^{-7}$	$1,95 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-5}$
7	$5,17 \cdot 10^{-7}$	$1,89 \cdot 10^{-6}$	$9,75 \cdot 10^{-6}$
8	$4,92 \cdot 10^{-7}$	$1,85 \cdot 10^{-6}$	$9,89 \cdot 10^{-6}$
9	$4,97 \cdot 10^{-7}$	$1,89 \cdot 10^{-6}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$
10	$5,03 \cdot 10^{-7}$	$1,93 \cdot 10^{-6}$	$1,05 \cdot 10^{-5}$
medián	$5,02 \cdot 10^{-7}$	$1,94 \cdot 10^{-6}$	$1,04 \cdot 10^{-5}$
s	$8,12 \cdot 10^{-9}$	$5,85 \cdot 10^{-8}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$
s _r [%]	1,6	3,0	3,6
L _{1,2}	$5,75 \cdot 10^{-9}$	$4,14 \cdot 10^{-8}$	$2,64 \cdot 10^{-7}$

Na základě statistického vyhodnocení uvedeného v tabulkách 5.12 a 5.13 lze usuzovat na dobrou opakovatelnost metody. Relativní směrodatná odchylka stanovení 6-MNA v kontrolních vzorcích na třech různých koncentračních hladinách se pohybovala v rozmezí 2,9–6,1 %. Obdobně dobrých výsledků bylo dosaženo i v případě nabumetonu, relativní směrodatná odchylka nabývala hodnot 1,6–3,6 %.

5.6 Analýza reálných vzorků

Vypracovaná metoda byla použita k analýze vzorků krevní plasmy z klinické studie Farmakologického ústavu 1. LF UK. Vzhledem k vyšší citlivosti bylo využívání prováděno podle UV detekce, hmotnostní detekce sloužila pro potvrzení analytů. Úkolem bylo sledovat časový průběh koncentrace 6-MNA a nabumetonu po jednorázovém podání 1 tablety nabumetonu (500 mg) a po opakování podání po čtrnáctidenní pauze. Studie zahrnovala 24 zdravých dobrovolníků.

Na obrázku 5.18 je zobrazena charakteristická koncentrační křivka 6-MNA v krevní plasmě po jednorázovém podání nabumetonu.



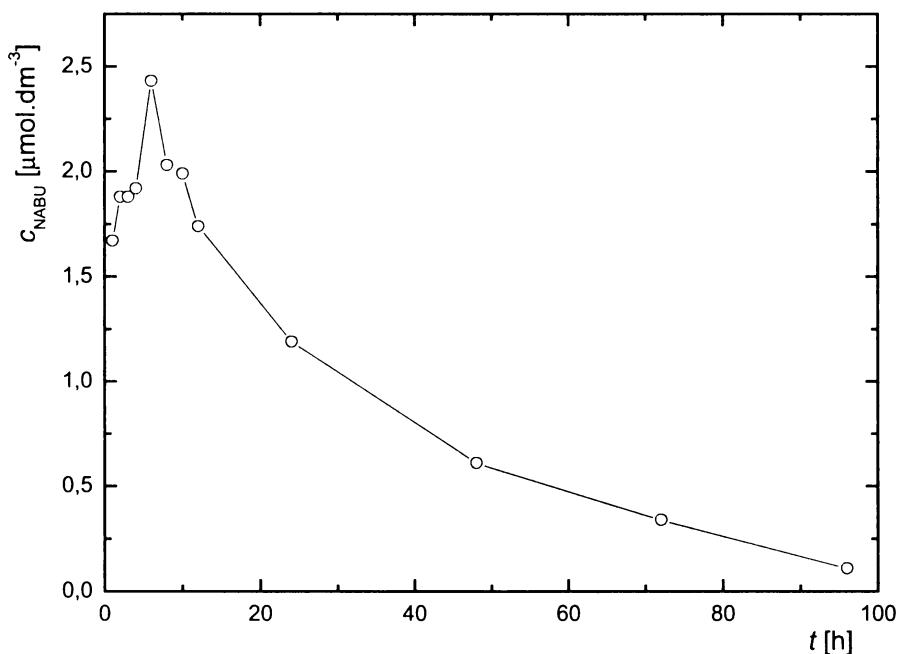
Obr. 5.18 Časová závislost koncentrace 6-MNA v krevní plasmě po podání 500 mg nabumetonu.

(0,5 ml vzorek, pH 2, eluce: 2ml methanol; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 μm ; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v) $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; nástřik 30 μl ; UV 230 nm)

Čas, ve kterém bylo dosaženo maximální plasmatické koncentrace, byl proměnlivý, jak už pozorovali jiní autoři [4–7]. Hodnota se pohybovala v intervalu 2–24 h. Z obrázku 5.18 je zřejmé, že se na koncentrační křivce 6-MNA vyskytuje dvě maxima. Tento jev byl pozorován u většiny vyšetřovaných dobrovolníků a obdobné

křivky publikoval i *De Jager et al.* [5]. Čas těchto maxim byl opět velmi variabilní, pohyboval se ve výše uvedeném rozmezí.

Na obrázku 5.19 je zobrazen průběh koncentrace nezmetabolizovaného nabumetonu v krevní plasmě po jeho perorálním podání. Farmakokinetický profil nabumetonu zveřejnila *Kobylińska et al.* [27]. Čas dosažení maximální plasmatické koncentrace nabumetonu uvádí v rozmezí 0,5–12 h. Tento interval se shoduje s naměřenými daty, kdy maximální koncentrace bylo dosaženo v intervalu 2–12 h.



Obr. 5.19 Časová závislost koncentrace nabumetonu v krevní plasmě po jeho 500 mg podání.
(0,5 ml vzorek, pH 2, eluce: 2ml rozpouštědla; kolona *Supelcosil LC-18* 15 cm x 4,6 mm 5 µm; ACN:0,1% TFA 50:50 (v/v) 0,3 ml·min⁻¹; nástřik 30 µl; UV 230 nm)

Vyhodnocení údajů o koncentracích 6-MNA a nabumetonu a jejich interpretace bude provedena pracovníky Farmakologického ústavu 1. LF UK, proto zde nejsou blíže uvedeny. Výsledky klinické studie budou pravděpodobně publikovány později v některém z odborných časopisů.

6 ZÁVĚR

Podařilo se nalézt optimální podmínky pro stanovení nabumetonu a jeho metabolitu (6-MNA) v krevní plasmě metodou SPE–HPLC/UV/MS.

Vypracovaná metoda je spolehlivá, přesná a byla úspěšně validována. Následně byly tímto postupem zpracovány a analyzovány reálné vzorky z klinické studie.

Tato diplomová práce je součástí projektu Farmakologického ústavu 1. LF UK. Informace o koncentracích nabumetonu a 6-MNA ve vzorcích analyzovaných postupem prezentovaným v této práci přispějí k objasnění problematiky vlivu genetických predispozic na farmakokinetiku nabumetonu.

SEZNAM LITERATURY

- [1] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Ziegler, A.; Bieger, D.: *Color Atlas of Pharmacology*. New York , Thimene Stuttgart 2000.
- [2] *Pharmindex kompendium*. Praha, MediMedia Information 2001.
- [3] Hedner, T.; Samuelsson, O.; Währborg, P.; Wadenvik, H.; Ung, K.; Ekbom, A.: *Drugs* **64**, 2315 (2004).
- [4] Nobilis, M.; Kopecký, J.; Květina, J.; Svoboda, Z.; Pour, M.; Kuneš, J.; Holčapek, M.; Kolářová, L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 641 (2003).
- [5] De Jager, A. D.; Hundt, H. K. L.; Hundt, A. F.; Swart, K. J.; Knight, M.; Roberts, J.: *J. Chromatogr. B* **740**, 247 (2000).
- [6] Patel, B. N.; Sharma, N.; Sanyal, M.; Prasad, A.; Shrivastav, P. S.: *Biomed. Chromatogr.* **22**, 1213 (2008).
- [7] Kendall, M. J.; Chellingsworth, M. C.; Jubb, R.; Thawley, A. R.; Undre, N. A.; Kill, D. C.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **36**, 299 (1989).
- [8] Nobilis, M.; Holčapek, M.; Kolářová, L.; Kopecký, J.; Kuneš, M.; Svoboda, Z.; Květina, J.: *J. Chromatogr. A* **1031**, 229 (2004).
- [9] De Broe, M. E.; Porter, G. A.; Bennett, W. M.; Verpoeten, G. A. (Eds.): *Clinical Nephrotoxins*. 2. vyd., Norwell, Kluwer Academic Publishers 2003.
- [10] Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxikol.* **38**, 97 (1998).
- [11] Knijff-Dutmer, E. A. J.; Kalsbeek-Batenburg, E. M.; Koerts, J.; Laar, M. A. F. J.: *Rheumatology* **41**, 458 (2002).
- [12] Klein, T.; Nüsing, R. M.; Pfeilschifter, J.; Ullrich, V.: *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1605 (1994).
- [13] Griswold, E.; Adams, J. L.: *Med. Res. Rev.* **16**, 181 (1996).
- [14] Kerola, M.; Vuolteenaho, K.; Kosonen, O.; Kankaanranta, H.; Sarna, S.; Moilanen, E.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **104**, 17 (2008).
- [15] Kawai, S.: *Inflamm. Res.* **47**, S102 (1998).
- [16] Cummings, D. M.; Amadio, P.: *Am. Fam. Physician* **49**, 1197 (1994).
- [17] Helin-Salmivaara, A.; Huttunen, T.; Grönroos, J. M.; Klaukka, T.; Huupponen, R.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **63**, 403 (2007).
- [18] Osiri, M.; Moreland, L. W.: *Arthritis Care Res.* **12**, 351 (1999).
- [19] Breitner, J. S. C.: *Annu. Rev. Med.* **47**, 401 (1996).
- [20] Harris, R. E. (Ed.): *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*. New York, Springer 2007.
- [21] Wolff, J. C.; Nawtin, P. N.; Monté, S.; Balogh, M.; Jones, T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 265 (2001).
- [22] Altun, Y.; Dogan, B.; Ozkan, S. A.; Uslu, B.: *Acta Chim. Slov.* **54**, 287 (2007).

- [23] Rao, R. N.; Meena, S.; Nagaraju, D.; Rao, A. R. R.: *Biomed. Chromatogr.* **19**, 362 (2005).
- [24] Mikami, E.; Goto, T.; Ohno, T.; Matsumoto, H.; Nishida, M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 917 (2000).
- [25] Sheen, J. F.; Her, G. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 891 (2004).
- [26] Pulgarín, J. A. M.; Molina, A. A.; Robles, I. S.F.: *Anal. Chim. Acta* **554**, 37 (2005).
- [27] Kobylińska, K.; Barlińska, M.; Kobylińska, M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 323 (2003).
- [28] Český lékopis 2005, Doplněk 2006 [CD-ROM], Praha, Grada Publishing 2006
- [29] Product information Relafen. Dostupné z URL:
www.fda.gov/Medwatch/safety/2005/aug_PI/Relafen_PI.pdf [cit. 9.9.2008].
- [30] Souhrn údajů o přípravku Relifex, SPC67370. Dostupné z URL:
<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC67370.doc> [cit. 1.12.2008].
- [31] Somasundaram, S.; Rafi, S.; Hayllar, J.; Sigthorsson, G.; Jacob, M.; Price, A. B.; Macpherson, A.; Mahmod, T.; Scott, D.; Wrigglesworth, Bjarnason, I.: *Gut* **41**, 344 (1997).
- [32] Product information 6-MNA. Dostupné z URL:
<http://www.mpbio.com/includes/msds/eu/en/159968-en-eu.pdf> [cit. 1.12.2008].
- [33] Chan, C. C.; Lam, H.; Lee, Y. C.; Zhang, X. M. (Eds.): *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. New Jersey, Wiley-Interscience 2004.
- [34] Gros, M.; Petrović, M.; Barceló, D.: *Talanta* **70**, 678 (2006).
- [35] Slanař, O.: *Farmakoterapie* **3**, 296 (2005).
- [36] Bultas J. *Současná klinická praxe* **3**, 6 (2004).
- [37] Martíková, J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha, Grada Publishing 2007.
- [38] Daly, A. K.: *Fundam. Clin. Pharmacol.* **17**, 27 (2003).
- [39] Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E.: *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737 (2001).
- [40] Nebert, D. W.: *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 265 (1997).
- [41] Evaluating System Suitability, Agilent Technologies 2000. Dostupné z URL:
<http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a10424.pdf> [cit.3.3.2009]
- [42] Pacáková, V.; Štulík, K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1986.
- [43] Guidance for Industry - Bioanalytical method validation. CDER and CVM 2001. Dostupné u URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm> [cit.13.11.2008]
- [44] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004.