

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Stanovení albendazolu a jeho metabolitů pro studium rezistence
helmintů vůči benzimidazolovým anthelmintikům

Rigorózní práce

Determination of Albendazole and Its Metabolites for Study of
Anthelmintic Resistance

Rigorous Thesis

Monika Belešová

Konzultant:

Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2013

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Monika Belešová

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název rigorózní práce: Stanovení albendazolu a jeho metabolitů pro studium rezistence helmintů vůči benzimidazolovým anthelmintikům

V této rigorózní práci je popsána HPLC metoda analýzy albendazolu a jeho dvou metabolitů, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu, v biologických vzorcích.

Cílem práce bylo nalézt novou izokratickou metodu pro separaci a stanovení těchto látek na koloně Kinetex PFP, což je kolona plněná core-shell částicemi s pentafluorofenylovou stacionární fází. Na základě předchozích experimentů byla použita mobilní fáze acetonitril+ fosfátový pufr (pH = 7,0). Oxibendazol byl ověřen v roli vnitřního standardu. Detekce všech analytů a vnitřního standardu byla fluorimetrická. V práci bylo optimalizováno složení mobilní fáze a následně provedena validace vyvinuté metody.

Výsledky validace dokumentují použitelnost této metody při analýzách biologických vzorků během studia rezistence střevních parazitů vůči albendazolu. Metoda byla úspěšně použita při analýzách reálných vzorků.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Monika Belešová

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of Thesis: Determination of Albendazole and Its Metabolites for Study of Anthelmintic Resistance

An HPLC method suited for analysis of albendazole and two metabolites, i. e. albendazole sulfoxide and albendazole sulfone, in biological samples is described in this rigorous thesis.

The aim of this work was to develop a new isocratic method for separation and determination of these substances using a core shell Kinetex PFP column equipped with pentafluorophenyl stationary phase. Based on preliminary experiments a mobile phase of acetonitrile+phosphate buffer (pH = 7.0) was used. Oxibendazole was exploited in the role of internal standard. The analytes and the internal standard were detected by means of a fluorescence detector. In the frame of the work the composition of the mobile phase was optimised and validation of the developed method was carried out.

The validation results show the method to be applicable for the analyses of biological samples during intestinal parasite resistance against albendazole. The method was successfully applied to analyse real biological samples.

Prohlašuji tímto, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

datum

podpis kandidáta

Děkuji zejména svému školiteli Ing.Vladimíru Kubičkovi, CSc. za podnětné rady, připomínky i podkladové materiály k této práci. Jeho vřelého přístupu a konzultací, které mi poskytl při vypracování této práce, si nesmírně vážím. Dále děkuji svému manželovi, s nímž si navzájem vytváříme prostor pro realizaci svých plánů, za jeho obětavou podporu v mých činnostech.

Seznam zkratek použitých v této práci:

ABZ- Albendazol

ABZSO- Albendazol sulfoxid

ABZSO₂- Albendazol sulfon

ACN – acetonitril

DAD- Diode Array Detector

DMSO - dimethylsulfoxid

ELISA- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EU- Evropská Unie

FDA- Food and Drug Administration

GC- Gas Chromatography

HILIC- Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

LC- Liquid Chromatography

LLE- Liquid- liquid extraction

logK_{ow} – dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda

MBZ- Mebendazol

MeOH – metanol

MRL- maximální reziduální limit

MS- Mass Spectrometry

MS-ESI- Mass Spectrometry Electrospray Ionisation

OXI- Oxibendazol

PEEK- Polyether ether ketone

PFP- Pentafluorofenyl

RPM- revolutions per minute (otáčky za minutu)

SLM- Supported Liquid Membrane

TLC- Thin Layer Chromatography

UHPLC- Ultra High Performance Liquid Chromatography

UPLC- Ultra Performance Liquid Chromatography

UV- ultraviolet; ultrafialové záření

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	12
2.1.1 Historie chromatografie	12
2.1.2 Princip chromatografie.....	13
2.1.3 Hlavní charakteristiky chromatografického děje	14
2.2 Kapalinový chromatograf s fluorimetrickým detektorem.....	19
2.3 Core- shell kolony	23
2.4 Farmaceutické využití benzimidazolů.....	25
2.5 Albendazol	29
2.6 Práce publikované v poslední době o HPLC albendazolu a jeho metabolitů.....	31
3. PRAKTICKÁ ČÁST.....	32
3.1 Chemikálie	33
3.1.1 Sledovaná léčiva a vnitřní standard.....	33
3.1.2 Další chemikálie.....	35
3.1.3 Příprava roztoků	35
3.2 Použité přístroje	36
3.3 Podmínky chromatografické analýzy.....	37
3.4 Příprava fosfátového pufu.....	37
3.5 Příprava vzorku metodou LLE.....	38
3.6 Příprava kalibračních vzorků	38
4. VÝSLEDKY	39
4.1 Volba stacionární fáze.....	40
4.2 Volba mobilní fáze.....	43
4.3 Optimalizace detekčních podmínek	46
4.4 Validace metody stanovení ABZSO, ABZSO ₂ a ABZ v homogenátu <i>Haemonchus contortus</i>	47
4.4.1 Selektivita.....	47
4.4.2 Přesnost, správnost, výtěžnost.....	48
4.4.3 Kalibrační křivka, detekční limit, kvantitativní limit.....	49
4.5 Praktické využití vyvinuté metody.....	51

5. DISKUZE.....	52
6. ZÁVĚR.....	56
Použitá literatura a zdroje.....	58

1. ÚVOD

Ve skupině anthelmintik nedošlo již velmi dlouhou dobu k zavedení zcela nového léčiva. To znamená, že jsou používány stále tytéž látky, proti nimž se u příslušných parazitů vyvíjí rezistence. Studium rezistence střevních parazitů proti benzimidazolovým anthelmintikům se zabývá i výzkumná skupina složená z pracovníků tří kateder Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Nezbytnou součástí takového výzkumu jsou vhodné analytické techniky pro stanovení nízkých koncentrací sledovaných látek v biologickém materiálu. HPLC je patrně nejvýznamnější technikou používanou k tomuto účelu.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat izokratickou HPLC metodu stanovení albendazolu a jeho dvou metabolitů. Jak vyplývá z literární rešerše, dosud publikované metody nejsou zcela vyhovující, proto bylo přikročeno k vývoji nové metodiky.

V gerontofarmacii má studium rezistence význam pro dávkování léčiv a jejich účinnost. Je žádoucí, aby účinnost léčiva podávaného staršímu organismu nebyla snižována rezistencí parazitů, aby následně dávka mohla být co nejnižší a docházelo tak k minimální zátěži organismu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je fyzikálně- chemická analytická separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.¹⁾ Pomocí této rozdělovací metody lze tudíž zjistit složení směsi a zároveň stanovit koncentraci jednotlivých složek. Vyznačuje se vysokou selektivitou, rychlostí analýzy a citlivostí stanovení, závislou na použitém detektoru. Pro analýzu postačuje velmi malé množství vzorku a celou metodu lze plně automatizovat s využitím automatického dávkovače.²⁾

2.1.1 Historie chromatografie

Název chromatografie pochází ze spojení řeckých slov χρώμα (barva), γραφειν (psát). Objev chromatografie se odbornou veřejností datuje roku 1903, kdy poprvé uspořádání kapalina- adsorbent použil botanik Michail Semjonovič Cvět k dělení a izolaci listových barviv.³⁾ Cvět se zabýval studiem barviv chloroplastů a jeho cílem byla izolace chlorofylu, který by si zachoval vlastnosti barviva v přírodním stavu.⁴⁾ K rozdělení směsi chemicky podobných listových pigmentů nejdříve použil filtrační papír. Xantofyly a karotenoidy extrahoval z listů nepolárními rozpouštědly, chlorofyly pak polárními. Pro ověření aplikoval rozpuštěné pigmenty na filtrační papír, rozpouštědlo nechal odpařit a získal tak jednotlivá listová barviva. Tento princip je předchůdcem papírové chromatografie. Cvět inovoval extrakci filtračním papírem na metodu kolonové separace. Na koloně obsahující uhličitan vápenatý rozdělil rostlinné pigmenty extrahované do rozpouštědla. Jednotlivé pigmenty se zachytily na částicích uhličitanu vápenatého různou silou a vytvořily tak paletu barev, kterou Cvět označil jako chromatogram. Zjistil, že efektivita dělení vzrůstá s jemnějším zrněním náplně kolony, což dovolilo pracovat při větším průtoku rozpouštědla (mobilní fáze). Tento průtok nebyl zprostředkován pouze gravitační silou, Cvět překonával odpor kolony zvýšením tlaku na vstupu nebo odsáváním na konci kolony.⁴⁾ Jeho postup byl mnohem později využit při vývoji soudobé HPLC, metodě vysokotlaké i vysokorychlostní.

2.1.2 Princip chromatografie

Chromatografie je založena na separaci molekul na základě rozdílů v jejich struktuře a složení. Celý chromatografický systém je složen z mobilní (pohyblivé) fáze, složky vzorku a stacionární (nepohyblivé) fáze. Mobilní fází je plyn či kapalina, stacionární fáze pak může mít rozdílnou formu (pevné částice, vrstva kapaliny na pevných částicích apod.). Mobilní fáze unáší složky vzorku přes prostor se stacionární fází. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Jednotlivé molekuly interagují se stacionární fází, na které se zdržují, což vede k rozdělení podobných molekul. Pevnější interakce molekul se stacionární fází vede k pomalejšímu pohybu molekul kolonou než molekuly vyznačující se slabší vazbou. Dle uspořádání stacionární fáze se rozdělují chromatografické metody na kolonové (sloupcové), a na plošné, tj. metody papírové chromatografie a na metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Dle mobilní fáze lze metody rozdělit na chromatografii plynovou (GC), fluidní a kapalinovou (LC, HPLC). HPLC se dále rozděluje dle povahy stacionární fáze na adsorpční, afinitní, iontovou, gelovou a rozdělovací chromatografii. Nejčastěji využívaná metoda je HPLC s kapalinou jako mobilní fází a pevnou látkou jako stacionární fází. Teorie adsorpční chromatografie je založena na různé schopnosti látek adsorbovat se na povrchu pevné polární stacionární fáze. K rozdělení dochází v důsledku rozdílné afinity složek k sorbentu, která je dána polárními silami působícími mezi povrchem sorbentu a mobilní fází.

Principem rozdělovací chromatografie je dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelná nebo omezeně mísitelná rozpouštědla.⁵⁾ O separaci pak rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku v mobilní a stacionární fází. Stacionární fází bývá kapalina zakotvená na pevný inertní nosič. Dle afinity se váže vodná fáze na hydrofilní nosič, na hydrofóbní nosič pak nevodná fáze. Jako polární sorbenty se nejčastěji používají silikagel a oxid hlinitý, jedná se o normální stacionární fází. Daleko častěji se v HPLC využívají chemicky vázané stacionární fáze. Může se jednat o dlouhý uhlovodíkový řetězec vázaný vhodnou chemickou reakcí na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrn. Těmto nepolárním chemicky vázaným fázím se říká fáze reverzní čili obrácené, neboť dle historie bývala v začátcích HPLC stacionární fáze polárnější než mobilní, dnes je tomu právě naopak. Chemicky vázané stacionární fáze se vyrábějí v širokém sortimentu, od nepolárních ke středně polárním. K iontově výměnné chromatografii jsou potřeba jako sorbenty

vhodné ionexy, k analýze enantiomerů léčiv jsou pak dostupné chirální stacionární fáze. K optimalizaci chromatografických podmínek patří i složení mobilní fáze. Isokratická eluce je používána nejčastěji, probíhá za konstantního složení a polarity mobilní fáze. Realizuje-li se průběh analýzy s proměnným složením mobilní fáze, jedná se o gradientovou eluci.

Chromatografii lze dnes dělit z mnoha hledisek, dle povahy mobilní fáze, způsobu provedení, principu separace apod. Tato dnes již intenzivně používaná analytická metoda umožňuje dělení, identifikaci a hodnocení organických i anorganických látek, iontů, enantiomerů, biopolymerů apod. V analýze složitějších struktur se může jednat o kombinaci dvou a více separačních procesů. Metoda je charakterizována jednotlivými parametry a veličinami, které lze odečíst a vypočítat z chromatogramu.

2.1.3 Hlavní charakteristiky chromatografického děje

Během chromatografického dělení se složky směsi opakovaně rovnovážně distribuují mezi dvě fáze, do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Chromatografický systém se může natolik přiblížit rovnováze, že rozdělení složky A lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D :

$$K_D = \frac{[A]_S}{[A]_m} = \frac{(n_A)_S}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_S}$$

kde je:

$[A]_S$ rovnovážná koncentrace analytu ve stacionární fázi

$[A]_m$ rovnovážná koncentrace analytu v mobilní fázi

$(n_A)_S$ látkové množství složky A ve stacionární fázi

$(n_A)_m$ látkové množství složky A v mobilní fázi

V_S objem stacionární fáze

V_m objem mobilní fáze

Distribuční konstanta je rozdílná pro jednotlivé složky směsi a liší se u jednotlivých systémů rozpouštědel. Volbou složení těchto systémů lze ovlivnit

účinnost rozdělení složek směsi.⁵⁾ Čím je hodnota distribuční konstanty vyšší, tím déle setrvají její molekuly ve stacionární fázi a tím větší je její retence.⁶⁾ Podle interakce jednotlivých složek směsi se stacionární fázi má každá složka jiný retenční čas, což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení eluční křivky. Každému retenčnímu času přísluší retenční (eluční) objem. Retenční objem V_R se vyjadřuje jako součin retenčního času t_R a objemového průtoku mobilní fáze F_m . Pokud nemá látka ke stacionární fázi žádnou afinitu a po celou dobu je rozpuštěna jen v mobilní fázi, přísluší jí mrtvý retenční čas a mrtvý retenční objem totožný s objemem mobilní fáze v koloně V_m .⁵⁾ Důležitým požadavkem je minimální mrtvý objem měřicího systému. Retenční čas je pak vyjadřován vztahem:

$$t_R = t_M(1 + k)$$

kde je:

t_R retenční čas složky směsi

t_M mrtvý retenční čas

k kapacitní faktor (bezrozměrné číslo)

Odečteme-li od retenčního parametru příslušný mrtvý parametr, získáme redukovaný retenční parametr. Redukovaný retenční čas je doba strávená interakcemi mezi analytem a stacionární fází. Redukovaný retenční objem je pak skutečný eluční objem. Tyto redukované charakteristiky jsou potřebné k výpočtu kapacitního faktoru, který je rozhodující pro rychlost postupu látky kolonou.

Kapacitní faktor k je definován jako míra zpoždění látek (míra retence) zadržovaných stacionární fází. Lze o něm hovořit jako o kapacitním poměru, neboť udává poměr látkového množství solutu ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství v mobilní fázi. Čím větší je hodnota k , tím více je solut v koloně zadržován a je eluován později.⁶⁾ Znamená tedy poměr doby, kterou molekula stráví ve stacionární fázi k době strávené v mobilní fázi. Hodnotu kapacitního poměru lze ovlivnit výběrem mobilní fáze, měla by však být konstantní pro danou kolonu a pro danou složku. Při změně experimentálních podmínek, což může být právě změna

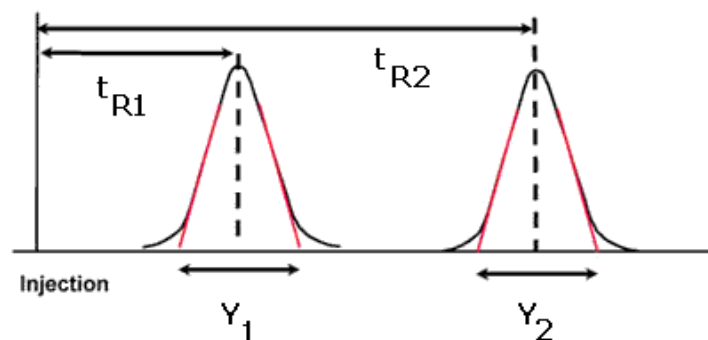
mobilní fáze, slouží k porovnávání chromatogramů. Kapacitní faktor lze vypočítat jednoduše ze známých hodnot retenčního času t_R a mrtvého času t_M :

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Hlavním úkolem chromatografie je dosažení co nejlepšího rozdělení složek analyzovaného vzorku v přijatelném čase.⁶⁾ Stupeň rozdělení je vhodné kvantitativně vyjádřit. Parametry popisující separaci na chromatografické koloně jsou především účinnost, rozlišení a separační (diskriminační) faktor.

Stupeň rozdělení dvou sousedících píků lze kvantitativně vyjádřit pomocí parametru rozlišení R . Je to bezrozměrná veličina a větší hodnota R vyjadřuje lepší separaci.

Obr. 1: Grafické vyjádření rozlišení



Rozlišení jednotlivých složek analyzované směsi $R_{1,2}$ lze obecně vyjádřit vztahem:

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(Y_1 + Y_2)} = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{0,5(Y_1 + Y_2)}$$

kde je:

$t_{R1,R2}$ retenční časy složek 1,2

$Y_{1,2}$ šířky píků na úrovni nulové linie (při základně)

Ve vztahu k parametrům kolony je však rozlišení vyjádřeno třemi faktory. Kinetickým faktorem (účinnost) se vyjadřuje, že rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině z počtu pater kolony. Čím větší je počet pater, tím je kolona účinnější. Vzájemnou retenci dvou analytů charakterizuje druhý člen, aneb faktor termodynamický (selektivita) udávající, že rozlišení je přímo úměrné kapacitnímu poměru a blíží se k nule, když se kapacitní poměr blíží k jedné. A třetí kapacitní faktor (retence) udává, že rozlišení roste s rostoucí hodnotou kapacitního poměru a blíží se k nule, když se kapacitní poměr blíží k nule.⁶⁾ Rozlišení lze přesněji definovat vztahem:

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot (\alpha_{2,1} - 1) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)$$

kde je:

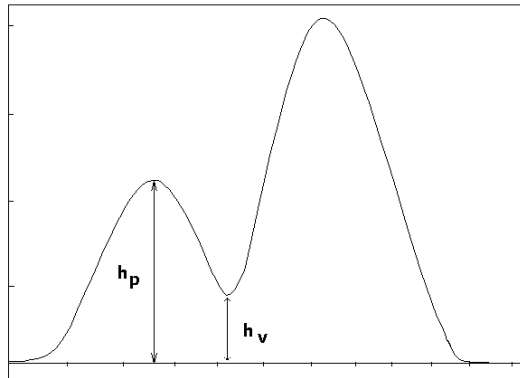
n účinnost kolony (počet teoretických pater kolony)

$\alpha_{2,1}$ separační faktor (vyjádřen poměrem k_2/k_1)

k_1 kapacitní faktor složky 1

Při nízkých hodnotách rozlišení $R_{1,2}$ dvou látek 1 a 2 dochází k částečnému překrývání píků. Pokud rozlišení $R_{1,2}$ je rovné jedné, pak separace látek je dostatečných 95%. Pro dosažení 99,7% separaci látek musí být rozlišení na základní linii a nabývat hodnoty 1,5. Parametr rozlišení však není závislý na výšce píku. Selektivitu a retenci lze ovlivnit volbou mobilní a stacionární fáze, či teplotou. Délkou kolony, velikostí částic a průtokem je pak možno ovlivnit účinnost separace. Obecně lepším parametrem kvality separace dvou píků je separační faktor (diskriminační faktor) α , který lze odečíst z každého chromatogramu. Tento faktor je vyjadřován poměrem distribučních konstant jednotlivých složek analytu, popř. poměrem kapacitních poměrů příslušných složek ($\alpha = k_2/k_1$). Lze ho také odečíst z chromatogramu z výšky píku a údolí, viz. obr.2.

Obr. 2: Chromatogram s vyznačenou výškou píku a výškou údolí



Míra separace pomocí tohoto koeficientu je dána jako $(h_p - h_v) / h_p$, čili jako poměr výšky píku menšího z dvojice sousedních píků ponížený o výšku údolí k celkové výšce píku.⁷⁾ Blíží-li se separační koeficient jedné, dochází k separaci na základní linii.

Základní kvalitativní charakteristiky v chromatografii jsou eluční parametry, retenční čas a retenční objem. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu za stejných podmínek.¹⁾ Kvantitativní charakteristikou je pak plocha chromatografického píku. Plocha vymezená píkem nad základní linií je úměrná koncentraci příslušné analyzované látky.

2.2 Kapalinový chromatograf s fluorimetrickým detektorem

Chromatograf pro HPLC analýzu je složitým a cenově nákladným zařízením skládajícím se z několika částí. První významnou částí přístroje je vysokotlaké čerpadlo, které čerpá mobilní fázi nastaveného složení ze zásobníku mobilní fáze a pohání ji přes kolonu k detektoru konstantní průtokovou rychlostí. V současnosti jsou moderní HPLC čerpadla schopná vyvinout tlaky až 120 MPa. Použitý tlak je ovšem limitován rovněž hodnotou, kterou snese náplň chromatografické kolony. Vysokotlaká čerpadla jsou vybavena programovací jednotkou, mohou mít i více zásobníků mobilní fáze, díky čemuž lze uskutečnit gradientovou eluci. Moderní přístroje mohou mít dvě pulzní pístová čerpadla, díky jejichž fázově posunuté činnosti se minimalizuje pulzace toku mobilní fáze.

Při přípravě mobilní fáze je důležité její odplynění. Díky odplynění lze reprodukovat retenční časy a objem nástřiku, stabilizuje se průtok mobilní fáze, zajistí se nízký šum základní linie a vysoká citlivost detektorů. K odplynění se používají metody jako vakuová filtrace a sonifikace, probublávání mobilní fáze heliem, nebo vakuový degasér.

Další částí přístroje je dávkovací zařízení, které umožňuje nadávkovat roztok vzorku na kolonu. V případě nízkotlaké verze kapalinové chromatografie lze použít přímý nástřik vzorku na kolonu přes elastickou membránu. Vysokotlaké varianty vyžadují dávkovací ventily umožňující dávkování při vysokých tlacích. Speciální ventil nadávkuje roztok z vnitřního prostoru ventilu, případně lze využít ventil s dávkovací smyčkou s různým objemem od 0,2 μl do 2000 μl . K dispozici jsou i vícecestné ventily umožňující nástřik vzorku do smyčky a současně jinou cestou průtok mobilní fáze ze zásobníku do kolony. Po přepnutí ventilu se roztok vzorku vytlačí mobilní fází ze smyčky na kolonu. Modernější přístroje jsou vybaveny automatickými dávkovači neboli autosamplery. Dávkovače opatřené injekčním zařízením jsou spojeny se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky uzavřené zátkou. Prostor pro vzorky je většinou temperován a chráněn před světlem.⁶⁾ Autosamplery dovolují rychlé, automatické dávkování několika různých vzorků uložených v zásobníku a zajišťují tak více analýz za sebou během krátké doby bez zásahu lidské ruky.

Z dávkovacího zařízení se vzorek přesune na chromatografickou kolonu, kde dojde k rozdělení směsi na jednotlivé složky.¹⁾ Kolony jsou speciálně konstruované trubice rovnoměrně naplněné či pokryté stacionární fází. Plášť kolony musí být chemicky inertní, musí odolávat vysokým tlakům, a vnitřní povrch pláště musí být dostatečně hladký.⁶⁾ Požadavky na konstrukční materiál jsou tedy vysoké, splnit je dokáže nerezová ocel, organický polymerní termoplast (PEEK) nebo sklo. Plášť kolony je uzavřen porézní kovovou fritou zabraňující úniku stacionární fáze a zároveň umožňující plynulý průtok mobilní fáze.⁶⁾ V koncové hlavici je pak navrtán vstup pro kapiláru a upevnění celé kapiláry pomocí šroubu v rámci přístroje. Kolony lze ve speciálním termostatu provozovat při určité teplotě. Rychlost pohybu mobilní fáze kolonou se vyjadřuje jako objemová rychlost toku F_m (cm³/s), nebo lineární rychlost toku u (cm/s) nezávislá na průřezu kolony. Kolonu lze hypoteticky rozdělit na množství tzv. pater, na kterých dochází k okamžitému ustavení rovnováhy. Podle počtu teoretických pater se vyjadřuje účinnost kolony, která je obrovská a dosahuje několika set tisíc teoretických pater. Počet teoretických pater n je bezrozměrná veličina a vypočítá se z šířky píku v chromatogramu. Eluční křivky mohou mít různé tvary, avšak pro vysoký počet pater ho lze nahradit Gaussovou křivkou. Délka kolony připadající na jedno patro se vyjadřuje jako výškový ekvivalent teoretického patra H . Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti mobilní fáze u vyjadřuje Van Deemterova rovnice. Podle ní k celkovému výškovému ekvivalentu teoretického patra přispívá vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi H_F , axiální difúze v mobilní fázi H_L , odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi H_M , a odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi H_S . Jako vířivá difúze se označuje efekt, kdy důsledkem nepravidelností ve stacionární fázi proudí některými jejími kanálky mobilní fáze s analytem rychleji než ostatními. Podélná neboli axiální difúze nastane, pokud molekuly analytu putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci v důsledku koncentračních gradientů po stranách zóny. Odpozem proti přenosu hmoty ve stacionární fázi je nazýván efekt, kdy různé molekuly analytu difundují různě hluboko do stacionární fáze. A odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi nastane při průchodu mobilní fáze kanálkem stacionární fáze, kde částice analytu uprostřed mají mnohem větší rychlost než u stěny. Životnost chromatografické kolony se odvíjí od více faktorů. Závisí na typu a druhu vzorku separovaném na

koloně, zda jsou ve vzorku kontaminanty, mechanické a koloidní částice. Je nutné se soustředit na samotnou přípravu vzorku, na extrakci, filtraci, odstředění, použití předkolony apod. K odstranění silně adsorbujících nečistot se používají různé promývací programy.⁶⁾ K životnosti kolony přispívá i mechanická odolnost sorbentu, která může být porušena během výroby, transportu či špatným zacházením v laboratoři. Kolonu může porušit i práce při extrémních hodnotách pH. K mobilním fázím se často přidávají aditiva v podobě pufrů, které slouží k úpravě pH. U běžných typů kolon se rozmezí přípustných hodnot pH pohybuje od 2 do 8. Při použití např. fosfátových pufrů pH 8 v kombinaci s vyšší teplotou dochází k rozpouštění silikagelu, a vlivem zvýšení mrtvého objemu kolony dochází ke snížení účinnosti. Naopak při extrémně nízkých pH hodnotách dochází k hydrolyze silikagelu, snížení retenčního času a životnosti kolony. Rozpustnost silikagelu při vyšším pH mobilní fáze vedlo k vývoji alternativních kolon na bázi oxidů kovů, oxidu titaničitého, oxidu hlinitého a oxidu zirkoničitého nebo speciálních pryskyřic.⁶⁾

Na výstupu z kolony je připojen detektor, na který jednotlivé složky vzorku dospějí v různých retenčních časech. Na použitém detektoru závisí citlivost a selektivita chromatografické analýzy. Používány mohou být detektory spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, refraktometrické či detektor hmotnostně spektrometrický. Pro potřeby této práce byl využit fluorimetrický detektor. Tento detektor je založen na principu fluorescence a měření sekundárního záření emitovaného látkou po předchozí absorpci primárního záření (světla). Molekuly analyzované látky se po vystavení elektromagnetickému záření dostanou ze základního singletového elektronového stavu do excitovaného stavu a následně při přechodu na stabilnější hladinu o nižší energii uvolňují energii ve formě emise záření. Emitované záření má v důsledku vibrační relaxace energii menší nebo rovnou energii excitačního záření a tedy vlnovou délku větší nebo rovnou než má vlnová délka primárního záření. Toto pravidlo vyjadřuje Stokesův zákon ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). Látka emituje světlo, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci fluoreskující sloučeniny. Křivka závislosti fluorescence na koncentraci látky je však lineární pouze v nízkých oblastech koncentrace fluoreskující látky. Fluorescence je pozorovatelná jen v průběhu působení primárního záření na látku, poté velmi rychle zaniká. Doba dohasínání je u fluorescence obvykle v rozmezí 10^{-6} až 10^{-9} s. Fluorimetrické

detektory jsou s výhodou použitelné v případech, kdy analyzovaná látka vykazuje fluorescenci.¹⁾ Pokud látka nevykazuje nativní fluorescenci, je možno ji v řadě případů pomocí derivatizačního činidla převést na fluoreskující látku. První částí fluorimetrického detektoru je zdroj polychromatického světla (xenonová nebo rtuťová výbojka), který poskytne excitační foton, a excitační monochromátor upravující světlo na monochromatické záření. Moderní detektory umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru, současně lze vlnové délky programovat i během eluce pro dosažení maximální citlivosti jednotlivých separovaných látek. Při měření emisního spektra je excitační monochromátor nastaven na konstantní vlnovou délku, obvykle odpovídající maximu absorpčního spektra. Naopak pro měření excitačního spektra se monochromátor nastaví na vlnovou délku emisního maxima, a emisní monochromátor projede zvolenou oblast vlnových délek. Intenzitu excitačního záření lze regulovat prostřednictvím šířky štěrbinu excitačního monochromátoru. Monochromatické záření tedy prochází štěrbinou přes průtokovou celu se vzorkem a dále je vedeno pod úhlem 90° ke zpracování na emisní monochromátor, aby pomocí fotonásobiče (detekčního zařízení) byla zjištěna intenzita emitovaného světla. Detektor přenáší signál do řídicího počítače, který ho zpracuje. Konstrukce detektoru umožňuje zachycení maximálního množství fluorescenčního záření vznikajícího v cele detektoru násobičem, přičemž toto čidlo musí být chráněno před dopadem excitačního záření.⁶⁾ Fluorimetrické detektory jsou sice méně univerzální než např. UV detektory, ale jsou mnohem citlivější a selektivnější. Fluorimetrické detektory jsou stále více rozšířené a používané, osvědčují se při analýze v biofyzikálním, biochemickém, lékařském výzkumu, v klinické chemii a dalších oborech při separaci a stanovení nízkých koncentrací fluoreskujících látek v roztocích.

2.3 Core- shell kolony

Chromatografické kolony jsou velice důležité součásti chromatografického systému, neboť na nich probíhá vlastní separace látek, a proto jsou na ně kladeny určité požadavky. Kolony jsou trubice o délce 10 až 25 cm s vnitřním průměrem 3 až 4,6 mm. Vnitřek kolony rovnoměrně vyplňují částice stacionární fáze. Struktura a velikost částic má vliv na celkovou výkonnost kolony. Velice malá velikost částic sorbentu do 5 μm umožňuje podstatně účinnější dělení. Plně pórovitá struktura částic omezuje rychlost toku mobilní fáze kolonou, proto kvůli požadavkům na vyšší chromatografickou účinnost a vyšší produktivitu dochází k inovaci náplně a využívají se tzv. core- shell kolony.

Na rozdíl od tradičních plně porézních částic stacionární fáze tyto kolony obsahují částice s povrchově pórovitou mikropartikulární náplní. Během výrobního nanotechnologického procesu dochází ke zpracování koloidního roztoku, přičemž se vytváří odolný homogenní pórovitý plášť na pevném jádře silikagelu. Jednotlivá částice sorbentu o velikosti 2,6 μm má pevné jádro o průměru 1,9 μm , kolem něhož je porézní obal o tloušťce 0,35 μm .¹⁴⁾ Takto upravené malé částice mají vysoký specifický povrch. Výsledkem rovnoměrně distribuovaných částic je kolona s extrémně vysokým počtem teoretických pater.

K optimalizaci analýzy je potřeba dosáhnout co nejlepšího rozdělení látek na koloně, tj. co nejmenšího rozšiřování zón separovaných látek. K rozšiřování zón přispívají děje popsané Van Deemterovou rovnicí. Díky omezeně porézním částicím se snižuje přenos hmoty stacionární fází. Analyty stráví méně času difúzí do pórů částic a zpět, a díky pevnému jádru neproniknou hluboko do částice. Krátká vzdálenost difúze umožňuje rychlejší přenos hmoty kolonou a výsledkem je nižší rozmývání píků. Redukovaný vliv vířivé difúze je dosažen jednotnou velikostí částic, které jsou téměř monodisperzní a vzdálenosti mezi jednotlivými částicemi jsou konstantní. Tato extrémně úzká distribuce částic vede k vysoké účinnosti a reprodukovatelnosti kolon. Výsledkem snížení vířivé difúze a rychlejšího transportu hmoty dochází k tvorbě nižšího protitlaku pod 400 bar, což dovoluje tyto kolony použít u většiny běžných HPLC systémů.¹⁴⁾

Core-shell kolona vykazuje nižší výškový ekvivalent teoretického patra při rozšířeném rozsahu lineárních rychlostí, čímž zajišťuje vysokou citlivost a vyšší

rozlišení. Core-shell kolona proto bývá kratší, s délkou 150 mm, zkrátí dobu analýzy až o 40% a zachová separaci všech analytů na základní linii.¹⁴⁾ Kolona díky vysoké účinnosti dovoluje zvýšení kapacity vzorků, což se projeví výrazným zkrácením retenčních časů při zachování rozlišení nejbližších píků. Vyšší účinnost vede k užším a vyšším píkům, čímž se zvyšuje citlivost a lze detekovat i minimální koncentrace a nízké úrovně nečistot. Vzhledem k vysokému výkonu této chromatografické kolony se výrazně snižuje spotřeba rozpouštědel, kterou lze dále snížit zmenšením průměru kolony. Takto lze dosáhnout významnou úsporu rozpouštědel v laboratoři.

Nejdůležitějším parametrem kvality separace je selektivita. Jedná se o významnější člen v rovnici rozlišení než je účinnost. Významným se proto stává výběr kolony se správnou stacionární fází k analyzování sloučenin od polárních po hydrofóbní, aromatické a izomery. Na trhu je k dispozici široká nabídka core-shell kolon, například s fázemi C18 pro hydrofóbní interakce, PFP pro interakce dipól-dipól, aromatické pí- pí, hydrofóbní a vodíkové vazby a HILIC pro hydrofilní interakce, což zajišťuje možnost analýzy různých druhů vzorků a široké použití v mnoha aplikacích.¹⁴⁾

Použitím core-shell kolony lze změnit výkon běžného HPLC systému na přístroj poskytující UHPLC výsledky, lze proto vyvíjet metody s vysokým rozlišením na jakémkoliv přístroji. Tyto kolony kromě rozlišení zlepšují kapacitu, citlivost a rychlost analýzy při snížené spotřebě rozpouštědel. Mají prodlouženou životnost, jejich výkonnost nekolísá a měření jsou reprodukovatelná. Z těchto důvodů byla použita spolehlivá core-shell kolona i v této práci.

2.4 Farmaceutické využití benzimidazolů

Léčiva odvozená od chemické struktury benzimidazolů mají velice široké spektrum účinku. Využívány jsou nejčastěji ve veterinárním lékařství k terapii endoparazitóz. Benzimidazoly patří do skupiny anthelmitik, účinky mají antinematodní, částečně antitrepatodní, ve vyšších dávkách anticestodní, a vykazují též antimykotickou aktivitu. Používají se látky s účinky místními i systémovými, které ničí různá vývojová stadia červů ve tkáních. Látky působí helmintocidně nebo helmintostaticky. Jde o velmi důležité látky léčící infekce především v méně vyspělých zemích, ale i u nás díky rozvoji cestování. Některé benzimidazolové sloučeniny (benomyl jako prekurzor carbendazimu) se používají také jako fungicidní ochrana plodin používaných ke krmení užitkových zvířat. Jiné látky (thiabendazol) jsou využívány převážně jako antimykotika k ošetření nepotravinových zvířat.⁸⁾

Benzimidazoly se dělí na látky vlastní (např. albendazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, thiabendazol) a na probenzimidazoly, které jsou v organismu metabolizovány na anthelminticky účinné benzimidazoly (např. febantel, netobimin). Tato proléčiva se vyznačují vyšší rozpustností ve vodě, lepší absorpcí a zvýšenou biodostupností. Chemoterapie parazitárních nemocí benzimidazoly využívá biochemické pochody přítomné u parazita i u hostitele, odlišující se však farmakologickými vlastnostmi.⁹⁾ Dlouhým odlišným evolučním vývojem se vyvinuly u hostitele i parazita enzymy, receptory či buněčné složky, které jsou nepostradatelné pouze u parazita, což umožnilo vývoj léčiv zaměřených na tyto cíle.

Benzimidazolové deriváty působí na mikrotubulární systém parazitů, přičemž mikrotubuly buněk hostitele ovlivněny nejsou. Mikrotubuly jsou spjaty s mnoha buněčnými funkcemi; tvorba mitotického vřetenka při buněčném dělení, udržování buněčného tvaru, motility a sekrece, absorpce nutrientů a vnitrobuněčného transportu.¹⁰⁾ Mechanismus účinku těchto látek je založen na inhibici β -tubulinových subjednotek cytoplazmatických mikrotubulů, následkem čehož tyto vymizí ze stěvní stěny parazita. Zmíněný efekt způsobí blokádu transportu sekrečních molekul, utilizaci glukózy, pohyb buněčných organel. Výsledkem je narušení látkové výměny a příjmu živin helminta, jejich energetické vyčerpání, ztráta motility, postupné odumření a odstranění z gastrointestinálního traktu hostitele. Benzimidazoly se působením na mikrotubuly velmi podobají látkám s antimitotickou aktivitou (např.

kolchicin). Vazba léčiv na tubuliny parazitů je 250-400krát silnější než jejich kompetitivní vazba na mozkové tubuliny hostitele (savce).⁹⁾ Vzhledem k těmto rozdílům v afinitě a velké toleranci se nepředpokládá předávkování léčivem. Další účinek těchto léčiv spočívá v inhibici specifického enzymu fumarát- reduktázy ve fázi přeměny fumarátu na koncový sukcinát. Jedná se o cyklus dikarboxylových kyselin, který probíhá u anaerobních parazitů a to v opačném směru než Krebsův cyklus u aerobních organismů. Tato enzymová blokáda na úrovni fumarátu nedovolí parazitům metabolizovat glykogen, zbaví je tak zdroje energie a vede k energetickému kolapsu a odumírání vyčerpáním.

K léčivům celé skupiny benzimidazolů může vzniknout i anthelmintická rezistence. Ta může být zprostředkována farmakodynamicky změnami receptorových molekul. Z větší části pak farmakokineticky sníženým příjmem léčiva, zvýšenou inaktivací léčiva či zvýšeným efluxem léčiva buňkami helminta. Následně se léčivo minimálně váže na cílové receptory, mnohem méně se tak kumuluje v buňkách parazita a není tak zajištěna stoprocentní účinnost. Vznikne-li rezistence parazita na benzimidazoly, vzniká i na jejich proléčiva. Jsou proto vhodné kombinace těchto léčiv s ostatními anthelmintiky.

Účinnost benzimidazolů kolísá v závislosti na průchodu gastrointestinálním traktem, na jejich absorpci a přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách, na intenzitě infekce, ale také na lékové formě. U monogastričních zvířat je třeba opakovaného podání léčiva k dosažení požadované účinnosti, u polygastričních zvířat lze benzimidazoly podávat i jednorázově.⁸⁾

Jednotlivé benzimidazoly se od sebe liší především farmakokinetikou. Mají systémový účinek, musejí se tudíž nejdříve rozpustit ve střevních tekutinách k usnadnění vstřebávání molekul sliznicí gastrointestinálního traktu.¹⁰⁾ Dosahují maximálních plazmatických koncentrací v závislosti na rychlosti absorpce a váží se na albumin. Čím rychleji látky dosáhnou maximálních plazmatických koncentrací, tím rychleji se budou metabolizovat a následně vylučovat z těla. Látky s delší biologickou aktivitou vykazují tedy větší anthelmintický potenciál. Záleží proto na rozpustnosti jednotlivých látek ve vodě. Z benzimidazolů se nejlépe rozpouští ve vodě thiabendazol a cambendazol, jsou tedy rychle absorbovány a dosahují maximálních plazmatických koncentrací již za 4 hodiny po podání. Novější

sloučeniny vykazují horší rozpustnost ve vodě (např. sulfidy), je proto vhodné je podat spolu s tučným jídlem. Vhodnějším řešením je proto proléčivo netobimin, které má vyšší biodostupnost a v organismu je následně transformován na účinný albendazol (ABZ). Podobně je na tom proléčivo fenbendazolu febantel s vyšší rozpustností a absorpcí. Samotný metabolit fenbendazol poté dosahuje maximálních plazmatických koncentrací až za 24 hodin, působí dlouho ve tkáních a zažívacím traktu, a v moči se objevuje mnohem později než srovnávaný thiabendazol, u kterého je díky vyšší rozpustnosti i vyšší eliminace z organismu. Což poukazuje na vyšší anthelmintický potenciál fenbendazolu. Podobně nízká absorpce je pozorována i u mebendazolu, kdy jsou rezidua patrná v organismu ještě 15 až 30 dní po podání léčiva.¹⁰⁾ Distribuce léčiva závisí na lipofilitě, molekulové hmotnosti, a také na vazbě na plazmatické bílkoviny, na které se ovšem váže méně než polovina benzimidazolových sloučenin. Triclabendazol se naopak silně váže na albumin a tím zvyšuje svůj biologický poločas.¹⁰⁾ Tyto efekty hrají významnou roli v dávkování jednotlivých léčiv. Farmakokinetika látek je dále závislá na bakteriální střevní mikroflóře, druhu zvířete a změnách pH při různých modifikacích stravy. Biotransformace benzimidazolů je značná. Potvrzen bývá jeden i více hlavních metabolitů ze zvířecích tkání či z mléka a z vajec. Je proto nutné dbát na dodržení ochranné lhůty u chovných zvířat léčených těmito látkami.

Monitorování benzimidazolových derivátů v tkáních, tělních tekutinách, mléce a potravinách je složité v existenci značného množství těchto reziduí, jejichž sledování nelze pokrýt jednou analytickou metodou. Vhodnou alternativou je proto identifikace rezidua nejvíce zastoupeného v tkáních. Následuje extrakce metabolitu z tkáně či tělní tekutiny, a vyvinutí analytické metodiky pro jeho stanovení. Problémem může být i existence nevyhovujících či nepředpokládaných metabolitů v tkáni, pokud bylo léčivo podáno ve větší dávce než je doporučena, jinému druhu zvířete, než pro jaké je určeno, nebo po konzumaci kontaminované potravy zvířetem. Metodou měření benzimidazolů může být biologická zkouška ke zhodnocení anthelmintického potenciálu, spektrofotometrická detekce zvláště vysokých hladin reziduí v potravinách, imunochemické metody pro stanovení z biologických tekutin a tkání, radioimunologické zkoušky (ELISA), či cenově dostupná TLC. Vhodnou metodou se však ukázaly chromatografické metody. Jedná se o metody vysoce citlivé

s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení reziduí benzimidazolů již v minimálním množství. V posledních letech se farmakokinetika metabolitů benzimidazolů často zkoumá metodou LC-MS/MS.¹⁰⁾ Tato metoda, která spojuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií, splňuje požadavky rychlé separace a citlivé detekce metabolitů benzimidazolů v tkáních a živočišných produktech chovných zvířat.

Ze všech analytických postupů jsou chromatografické metody v současné době upřednostňovány pro svou automatizaci a vysokou přesnost stanovení benzimidazolů a jejich metabolitů v analyzované směsi.

2.5 Albendazol

Z benzimidazolových derivátů je ABZ hojně využívaná sloučenina především pro své anthelmintické účinky. Ve veterinární medicíně a antiparazitární terapii má významné postavení jako širokospektré léčivo účinné na všechna vývojová stadia helminta. ABZ má nejčastěji uplatnění v léčbě enterobiózy, askariózy, trichuriózy, trichinelózy, strongyloidózy a při terapii neurocysticerkózy, kterou způsobuje larva *Taenia solium*.¹²⁾ Další potenciální indikace účinné látky jsou experimentálně zkoumány, ať už ABZ jako samotného léčiva proti jiným závažným parazitům nebo v kombinaci s jinými léčivy.

ABZ je chemicky 5-thiopropyl-benzimidazol-2-methylkarbamát s molekulovou hmotností 265,34. Je to bílý až bezbarvý prášek, rozpustný v dimethylsulfoxidu, silných kyselinách a zásadách. Mírně rozpustný je v methanolu, chloroformu a acetonitrilu. Ve vodě je prakticky nerozpustný.

ABZ se jako léčivo nejčastěji podává perorálně. Jeho absorpci z trávicího ústrojí zvyšuje současné podání tučné potravy a případné zvýšení žlučových solí. Vstřebávání léčiva je ovlivněno i druhem příjemce, u lidí se přijatý ABZ vstřebá z 1%, u myši či krysy z 20-30% a u dobytka z 50%. Léčivo prochází v játrech rapidním first-pass efektem, proto jsou plazmatické hladiny nezměněného ABZ velice málo patrné. Prvotní metabolickou reakcí je oxidace sulfidové části molekuly na sulfoxid a sulfon, následována deacetylací karbamátové části molekuly za tvorby aminu. Za hlavní plazmatická rezidua jsou tedy považována sulfoxid, sulfon a 2-aminosulfon albendazolu.

Anthelminticky aktivní metabolit ABZSO je ze 70% vázán na plazmatické bílkoviny. Má velice variabilní eliminační poločas, v plazmě přetrvává 4-15 hodin. V organismu se dobře distribuuje do různých tkání napadených parazitem, dostává se do likvoru a do nitra cyst. Sulfoxid tvoří enantiomery, z čehož (+) enantiomer dosahuje u lidí mnohonásobně vyšších plazmatických koncentrací a tudíž je pomaleji vylučován než (-) enantiomer. Ve formaci (+) enantiomeru hraje větší roli jaterní flavoprotein monooxygenáza, u (-) enantiomeru pak cytochrom P450. Oba deriváty jsou dále oxidovány na farmakologicky inaktivní sulfon, který již není chirální.¹³⁾ Vylučování metabolitů probíhá převážně žlučí, pouze malá část se vylučuje močí. Interakce s ostatními léčivy vyplývají především z částečné metabolizace ABZ na

cytochromu P450, nutno proto brát zřetel na inhibitory a induktory tohoto enzymu a přizpůsobit tomu dávkování léčiv.

Mechanismus účinku ABZ je stejný jako u celé skupiny benzimidazolů. Váže se na tubulin primárně v absorpčních buňkách parazitů, nepůsobí však toxicky na buňky hostitele. Výsledkem inhibice polymerace tubulinu je neschopnost absorpce živin, redukce glykogenu a vyhladovění parazita.

Z nežádoucích účinků se mohou vyskytnout stejně jako při léčbě ostatními benzimidazoly především zažívací potíže, často bolest žaludku, břicha, nevolnost, zvracení, průjem. Při přecitlivělosti na léčivo se vyskytuje vyrážka, kopřivka a pocit svědění. Ojedinele se pak objevuje bolest hlavy, závratě, zánětlivá kožní onemocnění a dočasné vypadávání vlasů, zvýšení jaterních enzymů. U zvířat nejsou nežádoucí účinky známy.

Pokusy na potkanech a králících prokázaly teratogenní a embryotoxický účinek ABZ. Mutagenní účinek prokázán nebyl. Před započítím užívání u fertlních žen se musí vyloučit gravidita, v časných stadiích těhotenství pak nesmí docházet k užívání léčiva. To samé platí u zvířat, ABZ nesmí být používán během připouštění a 1 měsíc po připouštění. Dále nesmí být použit u zvířat (např. u ovcí), jejichž mléko je určeno pro lidský konzum.

Ochranná lhůta u potravinových zvířat je podle zákona o veterinární péči časové období od ukončení podávání léčivé látky, po kterou může být nepříznivě ovlivněna nezávadnost živočišných produktů (maso, vejce, mléko). Dále existuje nařízení komise (EU) č. 37/ 2010 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu. Dle tohoto nařízení je ABZ určen pro použití u všech přežvýkavců jako vnitřní antiparazitikum. Jeho MRL jsou ve svalovině, tuku a mléce 100 µg / kg, v játrech 1000 µg / kg, v ledvinách pak 500 µg / kg. S ohledem na tyto limity je mnoho důvodů ochrany člověka před rezidui léčiv v surovinách živočišného původu. Proto je nezbytné se zaměřit na efektivní monitorování těchto reziduí obecně v biologických materiálech, aby bylo toto stanovení co možná nejrychlejší, selektivní, zautomatizované a vysoce citlivé. Těmto požadavkům odpovídá HPLC metoda, na kterou jsem se v této práci zaměřila.

2.6 Práce publikované v poslední době o HPLC albendazolu a jeho metabolitů

Doposud byla publikována řada HPLC metod k separaci a kvantifikaci ABZ a jeho metabolitů. Kitzmann¹⁵⁾ publikoval stanovení HPLC metodou s UV detekcí využívající kolonu plněnou fenyllovou stacionární fází. Wu et al.¹⁶⁾ stanovili uvedené analyty v plazmě ovcí. Použili stacionární fází C18 a UV detekci s oxfendazolem jako vnitřním standardem. S těžkostmi optimalizovali třísložkovou mobilní fází obsahující acetonitril, methanol a fosfátový pufr, kterou použili k eluci. Tuto optimalizaci popsali jako únavnou práci. Mirfazaelian et al.¹⁷⁾ oddělili ABZ a jeho metabolity na koloně se stacionární fází C8 a analyty kvantifikovali kombinací UV a fluorimetrické detekce za použití MBZ jako vnitřního standardu. To je zajímavé vzhledem k tomu, že MBZ není fluoreskující benzimidazol. Sarin et al.¹⁸⁾ provedli separaci ABZ a jeho metabolitů na koloně Discovery RP Amide s fází C16 a UV detekcí za využití mebendazolu jako vnitřního standardu. Autoři článku¹⁹⁾ dělili analyty na koloně s fází C18 s fluorimetrickou detekcí a aplikovali metodu vnějšího standardu.

Články¹⁵⁾⁻¹⁹⁾ popisují isokratické achirální HPLC separace. Chirální separace ABZSO je popsána Zongdem et al.²⁰⁾ na chirální stacionární fází založené na tris-(3,5-dimethylfenylkarbamát)-amylóze. Msagati a Nindi uveřejnili metodu gradientové eluce na koloně Cyano-Grom-Sil ke stanovení benzimidazolových reziduí v mléce.²¹⁾ Vzorky byly připraveny extrakcí SLM a analyty byly detekovány pomocí DAD a MS-ESI. UPLC gradientové metody pro analýzu benzimidazolových anthelmintik byly publikovány nedávno.²²⁾⁻²⁵⁾ V UPLC metodách byly aplikovány stacionární fáze C18 a detekce byla uskutečněna pomocí MS.

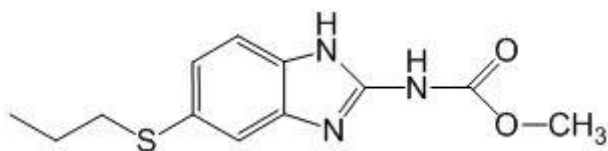
3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Chemikálie

3.1.1 Sledovaná léčiva a vnitřní standard

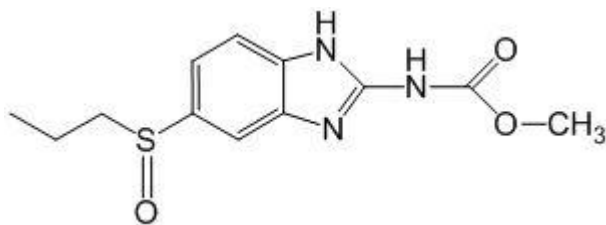
Obr. 3: Vzorec ABZ

(Sigma)

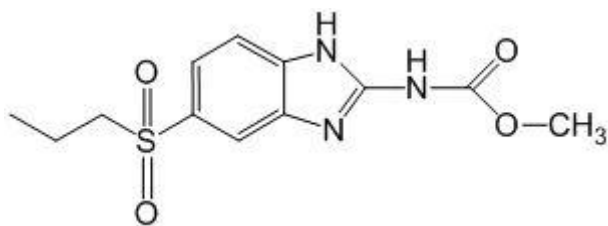


Obr. 4: Vzorec ABZSO

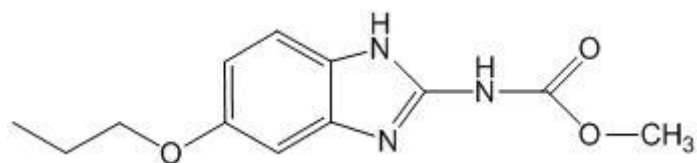
(Toronto Research Chemicals)



Obr. 5: Vzorec ABZSO₂
(Toronto Research Chemicals)



Obr. 6: Vzorec OXI (vnitřní standard)
(Sigma)



3.1.2 Další chemikálie

Acetonitril gradient grade pro HPLC – *Aldrich*

Hydrogenfosforečnan sodný dekahydrát p. a. – *LachNer*

Dimethylsulfoxid p. a. – *Fluka*

Kyselina fosforečná 85 % p. a. – *Lachema Brno*

Amoniak 25 % p. a. - *Lachema Brno*

Ethylacetát p. a. – *Aldrich*

Deionizovaná voda – *připravovaná na FaF*

3.1.3 Příprava roztoků

Základní roztoky ABZ, obou metabolitů a OXI byly připravovány navážením příslušného množství látky, jeho rozpuštěním v malém množství DMSO (cca 1 ml) a doplněním v odměrné baňce mobilní fáze na příslušný objem. Takto byly získány základní roztoky, jejichž přesné koncentrace se pohybovaly kolem 1 mmol/l. Roztoky nižších koncentrací byly připravovány patřičným ředěním základních roztoků mobilní fáze.

3.2 Použité přístroje

K analýzám byl použit chromatograf Agilent Technologies 1200 SL sestávající z:

- vakuového mikrodegaséru
- binárního čerpadla 1200 SL
- autosampleru 1200 SL plus
- kolonového termostatu TCC Infinity 1290
- diode- array detektoru 1200 SL
- fluorescenčního detektoru 1200

Tento chromatograf byl ovládán chromatografickým software Agilent ChemStation, verze B.04.02, zahrnujícím spektrální modul.

Látky byly navažovány na laboratorních analytických vahách Sartorius.

pH pufrů bylo nastavováno pomocí pH-metru inoLab 720 (WTW) s pH elektrodou Sentix 61 (WTW). Ke kalibraci tohoto pH-metru byly používány TEP pufrů pH = 7.00 a pH = 10.01 (WTW).

LLE byla prováděna pomocí Minishakeru MS2 (IKA), centrifugy 5415D (Eppendorf) a koncentrátoru 5301 AG (Eppendorf).

Sonifikace byla prováděna ultrazvukovou lázní Sonopuls (Bandelin, Germany).

3.3 Podmínky chromatografické analýzy

Byla používána kolona Kinetex PFP 100 x 4,6 mm; 2,6 μm (*Phenomenex*). Isokratická mobilní fáze (acetonitril+fosfátový pufr (pH = 7,0; 0,015 mol/l) v poměru 3:7) měla průtok 1,0 ml/min. Teplota kolony byla 25 °C, nastříkováno bylo 20 μl vzorku. Detekce byla prováděna fluorescenčním detektorem při $\lambda_{\text{ex}} = 292 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 322 \text{ nm}$ nebo $\lambda_{\text{em}} = 349 \text{ nm}$. Druhá z těchto vlnových délek byla používána pro detekci ABZ nebo tehdy, pokud bylo třeba nižší citlivosti detekce ABZSO₂.

3.4 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH = 7,0) byl připravován rozpuštěním 5,37 g dekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného p. a. v 995 ml neionizované vody. pH takto vzniklého roztoku bylo nastaveno na 7,0 kyselinou fosforečnou 85 % p. a. na kalibrovaném pH-metru. Roztok byl v odměrné baňce doplněn na 1 000 ml a zfiltrován přes nylonový filtr (Nylon 66 0.45 μm ; *Supelco*) na filtračním zařízení Supelco. Pufr byl připravován denně čerstvý.

3.5 Příprava vzorku metodou LLE

Homogenizace biologického materiálu (*Haemonchus contortus*) byla provedena sonifikací po dobu cca 20 s pomocí ultrazvukové lázně. Homogenát byl extrahován ethylacetátem metodou LLE. 1 ml homogenátu byl smíchán s 10 μ l zásobního roztoku vnitřního standardu (OXI 10 μ mol/l), se 100 μ l roztoku amoniaku (25%) a s 2 ml ethylacetátu ve vhodné zkumavce (*Eppendorf*). Směs byla 2 minuty protřepávána, odstředěna centrifugou při 5 rpm a organická vrstva byla přenesena do 2 ml zkumavky (*Eppendorf*). Rozpouštědlo (ethylacetát) bylo odpařeno při 45°C (30-60 minut) a vzorek byl rekonstituován ve 300 μ l mobilní fáze v ultrazvukové lázni.

3.6 Příprava kalibračních vzorků

K 1 ml homogenátu ve 2 ml zkumavce (*Eppendorf*), který byl prostý stanovovaných látek, bylo přidáno takové množství základních roztoků ABZ a jeho metabolitů, aby bylo dosaženo požadované kalibrační koncentrace. Tato směs byla protřepána na minishakeru (cca 1 min) a sonifikována (cca 20 s). Takto připravené kalibrační vzorky byly dále zpracovány postupem podle odstavce 3.5.

4. VÝSLEDKY

4.1 Volba stacionární fáze

Z publikovaných prací, které se zabývají HPLC ABZ a jeho metabolitů plyne, že separace těchto látek a vyhledání vhodného vnitřního standardu na klasických C18 stacionárních fázích je problematické. To je způsobeno velkým rozdílem v lipofilitě ABZ na jedné straně a jeho metabolitů a látek přicházejících v úvahu jako vnitřní standard na straně druhé. Porovnání lipofilit OXI, ABZ a jeho metabolitů bylo provedeno pomocí hodnot $\log K_{ow}$, které byly vypočítány příspěvkovou metodou na webovém kalkulátoru²⁶⁾. Vypočítané hodnoty jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Hodnoty $\log K_{ow}$ ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI vypočítané příspěvkovou metodou

<i>látka</i>	<i>logKow</i>
ABZSO	1,15
ABZSO ₂	1,18
ABZ	2,75
OXI	2,37

Z Tab. 1 je zřejmé, že lipofilita obou metabolitů je v porovnání s lipofilitou ABZ extrémně nízká. Proto byla hledána stacionární fáze, která by tuto diskrepanci v lipofilitách zohledňovala lépe než C18. K tomu bylo použito dat a výpočetního postupu podle Snydera²⁷⁾. Tento postup, označovaný jako hydrophobic-subtraction model, umožňuje porovnávat různé náplně kolon na základě parametrů, které charakterizují různé typy interakcí mezi analytem a stacionární fází. Základní rovnice, z níž tento model vychází, má tvar:

$$\log \alpha = \log \left(\frac{k}{k_{(ref)}} \right) = \eta' \mathbf{H} - \sigma' \mathbf{S}^* + \beta' \mathbf{A} + \alpha' \mathbf{B} + \kappa' \mathbf{C}$$

kde je:

α separační faktor

k kapacitní faktor analytu

$k_{(ref)}$ hodnota k pro nepolární referenční analyt

η' , σ' , β' , α' , κ' symboly charakterizující vlastnosti analytu, které jsou na eluci a teplotě závislé

\mathbf{H} , \mathbf{S}^* , \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{C} symboly kvantifikující vlastnosti náplně kolony, které jsou na eluci a teplotě nezávislé

Symboly \mathbf{H} , \mathbf{S}^* , \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{C} vyjadřují následující příspěvky kolony k retenci: hydrofobicitu \mathbf{H} , sterický odpor proti vniknutí objemné molekuly analytu do stacionární fáze \mathbf{S}^* , silanolovou aktivitu \mathbf{A} , kolonovou bazicitu \mathbf{B} a iontově výměnnou kapacitu \mathbf{C} . Pomocí těchto parametrů pro jednotlivé náplně kolon lze vzájemně porovnávat jejich selektivitu. K tomu Snyder navrhl kriterium F_s ²⁷⁾:

$$F_s = \{ [12,5(\mathbf{H}_2 - \mathbf{H}_1)]^2 + [100(\mathbf{S}_2^* - \mathbf{S}_1^*)]^2 + [30(\mathbf{A}_2 - \mathbf{A}_1)]^2 + [143(\mathbf{B}_2 - \mathbf{B}_1)]^2 + [83(\mathbf{C}_2 - \mathbf{C}_1)]^2 \}^{\frac{1}{2}}$$

Dolními indexy jsou v poslední rovnici značeny parametry pro porovnávané náplně kolon 1 a 2. Je-li hodnota $F_s \leq 3$, mají obě náplně kolon přibližně stejnou selektivitu. Čím je hodnota F_s větší než 3, tím jsou selektivity obou náplní od sebe vzdálenější. Tímto způsobem lze vyhledávat kolony se srovnatelnou selektivitou nebo naopak kolony se selektivitou rozdílnou (ortogonální).

Popsaným postupem byly porovnány tři stacionární fáze téhož výrobce (*Supelco*), aby byl eliminován vliv eventuálních rozdílných vlastností nosiče stacionární fáze (silikagelu). Stacionární fáze firmy *Supelco* byly vybrány proto, že

pro jejich porovnání byla v literatuře ²⁷⁾ dostupná dostatečná škála výchozích dat. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Vypočtené hodnoty kritéria F_S pro tři různé stacionární fáze

<i>Kolona</i>	F_S (pH = 2,8)	F_S (pH = 7,0)
Discovery C18	0	0
Discovery RP Amide C16	38,9	36,0
Discovery HS F5	48,9	68,5

Z tabulky je patrné, že porovnání bylo provedeno vzhledem ke stacionární fázi C18. Dále je zřejmé, že volba náplně RP Amide C16, u níž je povrch silikagelového nosiče chráněn amidovou skupinou, nebo náplně F5, což je pentafluorofenylová skupina vázaná na povrch silikagelu prostřednictvím propylových můstků, v roli stacionárních fází by měly přinést zásadní zvrát v separaci studovaných analytů. Při pH = 7,0 je rozdíl v selektivitě náplně C18 a F5 zvláště markantní. Zde je vhodné poznamenat, že hodnotou pH je při výpočtu F_S ovlivněn pouze parametr C .

Proto je v této práci použita kolona Kinetex PPF, produkt firmy Phenomenex, se stacionární fází, která byla v předchozím odstavci označována jako F5.

4.2 Volba mobilní fáze

Základním porovnáním čtyř mobilních fází pro separaci ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI se ve své diplomové práci zabývá Hrdý.²⁸⁾ Ten testoval u zvolených mobilních fází, kterými byly ACN+kyselina octová 0,01 mol/l, MeOH+ kyselina octová 0,01 mol/l, ACN+fosfátový pufr (0,015mol/l; pH = 7,0), MeOH+ fosfátový pufr (0,015mol/l; pH = 7,0), retenční časy analytů v závislosti na různých poměrech obou složek příslušné mobilní fáze.

V této práci byly při výchozích experimentech testovány retenční časy výše uvedených čtyř látek, jestliže byly použity směsi vody a ACN, resp. MeOH v roli mobilní fáze. Jako první byla testována směs voda/ACN ve třech objemových poměrech a zvolen průtok 0,8 ml/min. Zjištěné retenční časy uvádí tab. 3.

Tab. 3: Retenční časy (min) ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI s mobilní fází voda/ACN

<i>Poměr voda/ACN</i>	<i>60/40</i>	<i>50/50</i>	<i>40/60</i>
ABZSO	1,7	1,6	1,4
ABZSO ₂	1,9	1,6	1,4
ABZ	12,5	8,7	5,4
OXI	25,2	18,2	11,5

Dále byly testovány mobilní fáze, v nichž byl ACN nahrazen MeOH při zachování poměrů mísení uvedených v tab. 3. U těchto mobilních fází však nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Buď byl retenční čas OXI příliš dlouhý (> 70 min) nebo nedošlo k separaci ABZSO₂ a ABZSO. První případ nastal při poměru voda/MeOH = 60/40, druhý případ se objevil u zbylých dvou poměrů. Proto byla v následujících experimentech nahrazena voda fosfátovým pufrem (0,015 mol/l; pH = 7,0).

Úvodní pokus byl proveden se směsí fosfátový pufr (0,015 mol/l; pH = 7,0)/MeOH = 50/50. Byly zjištěny tyto retenční časy ABZSO 3,14 min, ABZSO₂ 3,89 min, ABZ 19,23 min a OXI 9,53 min. Retenční časy ABZ a OXI jsou poměrně dlouhé, proto byl v mobilní fázi opět použit ACN. Je však třeba poukázat na změnu pořadí eluce ABZ a OXI.

Při pokusech s mobilní fází složenou z fosfátového pufru (0,015 mol/l; pH = 7,0) a ACN byl nejprve za jinak nezměněných podmínek měněn poměr obou složek. Naměřené retenční časy jsou shrnuty v tab. 4.

Tab. 4: Retenční časy (min) ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI s mobilní fází fosfátový pufr (0,015 mol/l; pH = 7,0)/ACN

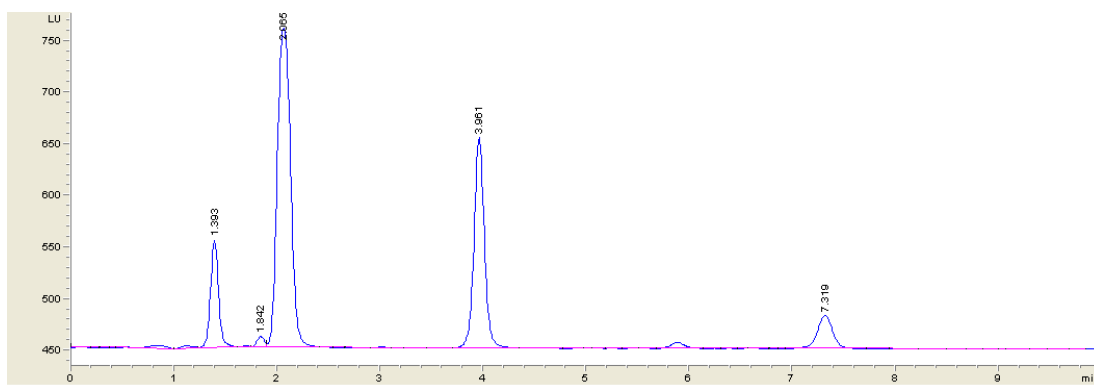
<i>Poměr pufr/ACN</i>	<i>30/70</i>	<i>50/50</i>	<i>60/40</i>	<i>65/35</i>	<i>70/30</i>	<i>75/25</i>
ABZSO	1,13	1,24	1,37	1,47	1,68	2,37
ABZSO ₂	1,23	1,43	1,72	2,01	2,61	4,12
ABZ	1,43	2,16	3,60	5,40	9,44	21,63
OXI	1,53	1,79	2,54	3,38	5,08	9,66

Z tab. 4 je vidět, že při poměru fosfátový pufr (0,015 mol/l; pH = 7,0)/ACN = 30/70 jsou retenční časy všech látek příliš blízko sebe, tudíž je tento poměr nevhodný. Zajímavé také je, že při tomto poměru se eluční pořadí ABZ a OXI opět změnilo a je stejné jako při použití vody místo pufru. To ovšem o ostatních testovaných poměrech obou složek mobilní fáze neplatí. Při poměru 50/50 se separace významně zlepšila, avšak v případě, kdy by bylo třeba použít vyšší rychlost průtoku mobilní fáze kolonou, by separace mohla být nedostatečnou. Při poměru

75/25 jsou naopak retenční časy ABZ a OXI natolik velké, že ani významné zvýšení průtoku by je uspokojivě nezkrátilo. To dokumentuje provedený pokus se zvýšením průtoku na dvojnásobek, tj. 1,6 ml/min, kdy bylo dosaženo následujících retenčních časů: ABZSO 1,25 min, ABZSO₂ 2,19 min, ABZ 11,74 min a OXI 5,20 min. Pro další zkoumání se jevily jako nadějně zbylé tři poměry: 64/40, 65/35 a 70/30. Vývoj metody pokračoval s poměrem 70/30.

Byla připravena směs všech čtyř látek smícháním stejných objemů jejich základních roztoků. Takto vzniklá směs byla 10x naředěna a byl pořízen chromatogram, který je uveden na obr. 7. Zároveň byl učiněn úspěšný pokus o zkrácení retenčních časů zvýšením průtoku.

Obr. 7: Chromatogram směsi ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI s mobilní fází fosfátový pufr (0,015 mol/l; pH = 7,0)/ACN = 70/30, průtok 1,0 ml/min, fluorescenční detekce $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 322 \text{ nm}$. Z chromatogramu jsou patrné retenční časy (RT) všech čtyř látek: RT (ABZSO) = 1,39 min; RT (ABZSO₂) = 2,07 min; RT (OXI) = 3,96 min; RT (ABZ) = 7,32 min.



Z obr. 7 je vidět, že separace látek je výborná i při průtoku zvýšeném na 1,0 ml/min.

4.3 Optimalizace detekčních podmínek

Vzhledem k požadavku vysoké citlivosti stanovení ABZ a jeho metabolitů byla zvolena fluorescenční detekce. Při hledání vhodných detekčních podmínek byly jako výchozí vlnové délky excitace a emise zvoleny hodnoty převzaté z diplomové práce Lukešové.²⁹⁾ Lukešová používala Brittonův-Robinsonův pufr o pH = 7,64 a měření prováděla ve směsi Brittonův-Robinsonův pufr (pH = 7,64)/ACN = 50/50. Za těchto podmínek našla absorpční maxima pro ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI podle pořadí 292 nm, 291 nm, 296 nm a 296 nm a emisní maxima ve stejném pořadí 321 nm, 319 nm, 343 nm a 327 nm. S ohledem na tato data a předchozí zkušenosti³⁰⁾ byly provedeny experimenty, z nichž vyplynula excitační vlnová délka 292 nm. Při hledání vhodné emisní vlnové délky byly nakonec nalezeny dvě hodnoty, 322 nm a 349 nm. Vhodnost jejich použití pro jednotlivé zkoumané látky je patrná z tab. 5.

Tab. 5: Porovnání ploch píků ABZSO, ABZSO₂, ABZ a OXI při excitační vlnové délce 292 nm a při emisních vlnových délkách 322 nm a 349 nm. Ostatní chromatografické podmínky jsou stejné jako u obr. 7.

λ_{em}	322 nm	349 nm
ABZSO	839	492
ABZSO ₂	3417	4806
ABZ	467	1321
OXI	1913	1766

Z tab. 5 je vidět, že emisní vlnová délka 322 nm je vhodná pro detekci ABZSO a OXI při ní dosahuje rovněž mírně větší odezvy. U ABZ je 349 nm jednoznačně lepší volbou. V případě ABZSO₂ jsou odezvy při obou vlnových délkách velmi vysoké. Při všech experimentech v této práci byla emisní vlnová délka 322 nm používána k detekci ABZSO a OXI. ABZ a ABZSO₂ byly vždy detekovány při 349 nm.

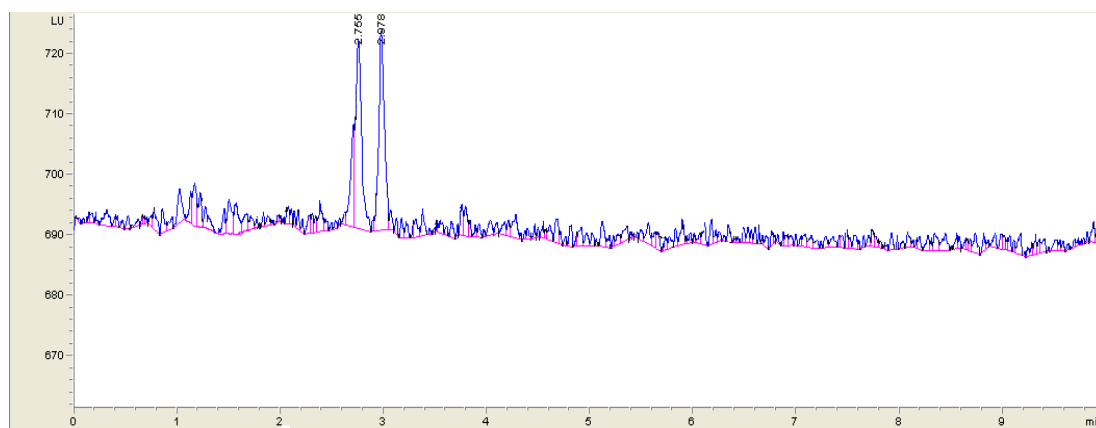
4.4 Validace metody stanovení ABZSO, ABZSO₂ a ABZ v homogenátu *Haemonchus contortus*

Při stanovení vybraných validačních parametrů metody bylo postupováno podle doporučení FDA.³¹⁾ Byly stanoveny tyto validační parametry: selektivita, přesnost, správnost, výtěžnost, kalibrační křivky, limit detekce a limit kvantifikace.

4.4.1 Selektivita

Selektivita je schopnost metody rozlišit a stanovit daný analyt v přítomnosti dalších složek vzorku. K tomuto účelu bylo připraveno šest slepých vzorků postupem popsaným v kapitole 3.5 bez přidání vnitřního standardu. Vzorky byly analyzovány a získané chromatogramy byly porovnány s chromatogramy reálných vzorků. Vzorový chromatogram slepého vzorku při $\lambda_{em} = 322$ nm je na obr. 8. Je zřejmé, že v retenčních časech stanovených látek a vnitřního standardu se nenacházejí žádné interferující píky. Chromatogramy při použití $\lambda_{em} = 349$ nm byly prakticky analogické.

Obr. 8: Chromatogram slepého vzorku: fosfátový pufr (0,015 mol/l; pH = 7,0)/ACN = 70/30, průtok 1,0 ml/min, fluorescenční detekce $\lambda_{ex} = 292$ nm, $\lambda_{em} = 322$ nm.



4.4.2 Přesnost, správnost, výtěžnost

Přesnost analytické metody udává, jak blízko k sobě přiléhají výsledky opakovaného měření na téže koncentrační hladině. Přesnost je vypočítána jako variační koeficient CV :

$$CV = \frac{SD \times 100}{c_{\text{naměřená}}}$$

kde je:

SD je směrodatná odchylka průměru

$c_{\text{naměřená}}$ značí průměr naměřených hodnot.

SD byla vypočítána pomocí programu Excel.

Správnost SP analytické metody ukazuje míru shody mezi nalezenou průměrnou hodnotou koncentrace na dané koncentrační hladině a skutečnou hodnotou koncentrace. Udává se jako relativní odchylka:

$$SP = \frac{100 \times (c_{\text{naměřená}} - c_{\text{skutečná}})}{c_{\text{skutečná}}}$$

Výtěžnost R vyjadřuje účinnost extrakce při zpracování vzorku a je počítána následovně:

$$R = \frac{100 \times c_{\text{naměřená}}}{c_{\text{skutečná}}}$$

Přesnost, správnost a výtěžnost byla zjištěna pro každou stanovovanou látku na třech koncentračních hladinách v rozsahu kalibrační křivky vždy ze šesti paralelních biologických vzorků, které byly připraveny podle odstavce 3.6.

4.4.3 Kalibrační křivka, detekční limit, kvantitativní limit

Kalibrační křivka je rovnice, která udává vztah mezi odezvou přístroje a koncentrací stanovované látky. Při použití vnitřního standardu jde o závislost poměru koncentrace stanovované látky a koncentrace vnitřního standardu na poměru ploch píků těchto dvou látek. Rozmezí koncentrací, v němž byla kalibračními vzorky ověřena linearita odezvy, se nazývá kalibrační rozsah. V této práci byla pro všechny tři stanovované látky kalibrační křivka stanovena na šesti koncentračních hladinách, přičemž na každé hladině byla provedena tři paralelní stanovení. Kalibrační vzorky byly opět připravovány postupem popsáním v odstavci 3.6.

Detekční limit *LOD* je nejnižší koncentrace, pro kterou lze na chromatogramu určit pík dané látky. *LOD* byl určen jako dvojnásobek hodnoty šumového signálu v retenčním čase stanovované látky.

Kvantitativní limit *LOQ* je nejnižší koncentrace stanovované látky, kterou je možno spolehlivě stanovit. Byl určen jako pětinasobek hodnoty šumového signálu v retenčním čase stanovované látky.

Dosažené hodnoty validačních parametrů jsou shrnuty v tab. 6 a 7. Kalibrační křivka byla stanovena ve tvaru:

$$\frac{c_L}{c_{OXI}} = k * \frac{P_L}{P_{OXI}} + q$$

kde je:

c_L je koncentrace stanovované látky

c_{OXI} je koncentrace vnitřního standardu (OXI)

P_L je plocha píku stanovované látky

P_{OXI} je plocha píku vnitřního standardu (OXI).

Tab. 6: Směrnice (k) a absolutní člen (q) kalibrační křivky, koeficient determinace (r^2), kalibrační rozsah a detekční limit ABZSO, ABZSO₂ a ABZ. Dolní mez kalibračního rozsahu je LOQ .

<i>Látka</i>	<i>k</i>	<i>q</i>	<i>r²</i>	<i>Kalibrační rozsah (nmol/l)</i>	<i>LOD (nmol/l)</i>
ABZSO	0,057	0,045	0,994	4,3 – 35,5	1,7
ABZSO ₂	0,004	-0,042	0,998	0,5 – 21,8	0,2
ABZ	0,024	0,010	0,993	3,3 – 135,7	1,3

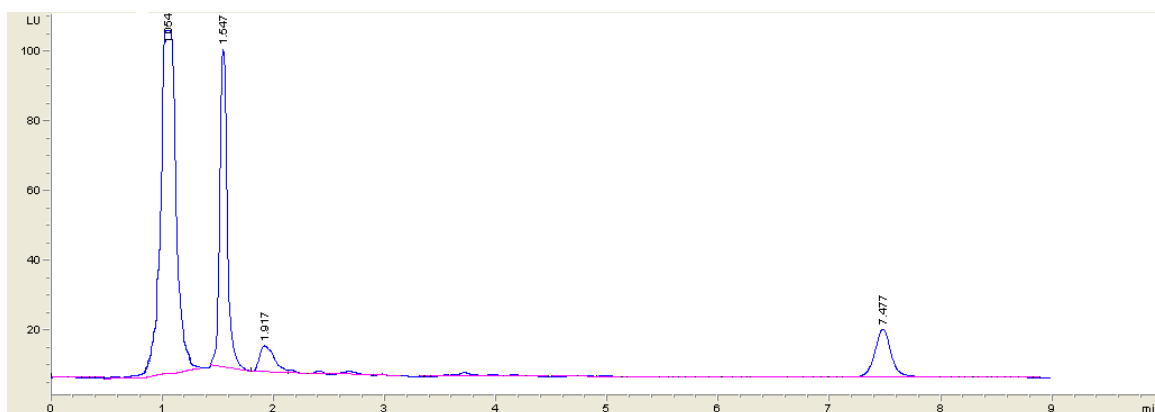
Tab. 7: Vyhodnocení přesnosti, správnosti a výtěžnosti stanovení ABZSO, ABZSO₂ a ABZ. Hodnoty ve třetím sloupci jsou průměrem ze šesti měření.

<i>Látka</i>	<i>C_{skutečná} (nmol/l)</i>	<i>C_{naměřená} (nmol/l)</i>	<i>Přesnost (CV, %)</i>	<i>Správnost (SP, %)</i>	<i>Výtěžnost (R, %)</i>
ABZSO	5,8	5,6	0,9	-3,4	96,7
	13,6	13,1	1,0	-3,7	96,3
	25,7	26,3	1,1	2,3	102,3
ABZSO ₂	1,1	1,2	1,3	9,0	109,1
	7,5	7,8	0,8	4,0	104,0
	16,1	16,0	1,1	-0,6	99,4
ABZ	4,9	4,7	1,5	-4,1	95,9
	20,7	20,1	2,5	-2,4	97,6
	96,3	91,2	1,8	-5,3	94,7

4.5 Praktické využití vyvinuté metody

Popsaná metoda byla použita ke stanovení ABZSO, ABZSO₂ a ABZ ve vzorcích homogenátu *Haemonchus contortus* při výzkumu rezistence tohoto parazita vůči benzimidazolovým anthelmintikům. Dále byla po revalidaci aplikována na stanovení těchto látek ve vzorcích rákosu. Vzorový chromatogram takového stanovení v reálném vzorku je na obr. 9.

Obr. 9: Stanovení směsi ABZSO, ABZSO₂ a ABZ ve vzorku rákosu bez vnitřního standardu.



5. DISKUZE

V této rigorózní práci je navržena a otestována nová HPLC metoda stanovení ABZ a jeho metabolitů. K odstranění potíží, do kterých se dostali autoři výše zmíněných prací, bylo možné postupovat dvěma směry. Buď použít stacionární fázi s odlišným separačním mechanismem v porovnání s fází C18 a nalézt vhodné izokratické podmínky, nebo zkusit gradientovou eluci. Zvolena byla izokratická eluce, protože jde o jednodušší řešení.

Ačkoli z výpočtů podle Snydera²⁷⁾ plyne, že slibná by mohla být kolona s náplní RP-Amide, byla zvolena kolona s náplní PFP (F5), tedy pentafluorofenylová, neboť skýtá větší pravděpodobnost odlišného separačního mechanismu od C18. Vzhledem k údajům v tab. 2 a také vzhledem k výsledkům Hrdého²⁸⁾ bylo testováno pH = 7,0 vodné složky mobilní fáze ve směsi s ACN. Nejprve šlo o čistou deionizovanou vodu, která se ovšem neosvědčila (viz tab. 3). Proto byl následně použit fosfátový pufr s poměrně nízkou koncentrací (0,015 mol/l) o pH = 7,0. Zatímco tento fosfátový pufr byl Hrdým²⁸⁾ testován, deionizovaná voda ne. Byly provedeny pokusy s různými poměry pufr/ACN. Již předem bylo otestováno, že pokud koncentrace pufru dosáhne ve směsi s ACN 80 % (obj.), dochází k vysrážení fosforečnanu. Proto byl zkoušen nejvýše poměr pufr/ACN = 75/25. Nakonec bylo pro separaci studovaných čtyř látek vybráno optimální složení mobilní fáze pufr/ACN = 70/30. Při tomto poměru a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min dochází k úplné separaci všech studovaných látek (ABZSO, ABZSO₂, OXI a ABZ) do 8 minut. Rozdíl retenčních časů ABZSO (1,39 min.) a ABZSO₂ (2,07 min) by se mohl na první pohled zdát malý. Chromatogram na obr. 7 ovšem dokazuje separaci obou píků až na základní linii. To je způsobeno třemi faktory. Jedním faktorem jsou vlastnosti core-shell kolon, tj. malá zrnitost náplně a úzká velikostní distribuce částic, díky nimž je výrazně omezeno rozmytí píků. Druhým faktorem je velmi nízký mrtvý objem použitého chromatografu, který minimalizuje mimokolonové příspěvky k rozmytí píků. Posledním faktorem je zřejmě mechanismus separace na pentafluorofenylové stacionární fázi. U běžně používaných tzv. alkylových fází, z nichž C18 je nejběžnější, je dominantním separačním mechanismem hydrofobní interakce mezi alkylovým řetězcem a stanovovanými látkami. Pokud se stanovované látky výrazně liší v lipofilitě, je často izokratická separace na alkylových fázích

neuskutečnitelná, v lepším případě obtížná. Naproti tomu pentafluorofenylová stacionární fáze může separovat na základě iontově výměnné interakce, interakce látky (funkční skupiny) s elektronově deficitním pentafluorofenylovým jádrem nebo tvarových odlišností molekul (tzv. shape selectivity). Pro separaci lipofilních parentních látek a jejich polárnějších metabolitů se proto jeví jako výhodná. V případě studované separace ABZSO, ABZSO₂, OXI a ABZ je třeba uvažovat všechny tyto mechanismy. Významné polární interakce zvyšují retenci metabolitů a zároveň snižují retenci ABZ. Schopnost použité stacionární fáze separovat na základě tvarových odlišností molekul (shape selectivity) napomáhá separaci metabolitů a OXI, která je na C18 fázích problematická³²⁾.

Detekce je s ohledem na požadavek vysoké citlivosti navržena fluorimetrická. Všechny čtyři látky (ABZSO, ABZSO₂, OXI a ABZ) vykazují přirozenou fluorescenci, avšak liší se její intenzitou. Nejlépe fluoreskuje ABZSO₂, nejnižší intenzitu fluorescence pozorujeme u ABZSO. Relativně horší intenzitu fluorescence u ABZSO lze vysvětlit kompeticí dvou přechodových momentů v molekule, které vedou k emisnímu spektru se dvěma výraznými pásy. Pravděpodobně však bude významnou roli hrát i nezářivá deaktivace části excitovaných molekul ABZSO²⁹⁾.

Validace prokázala schopnost navržené metody stanovit ABZSO, ABZSO₂ a ABZ v homogenátu *Haemonchus contortus* s OXI jako vnitřním standardem. Selektivita metody je prokázána chromatogramem slepého vzorku na obr. 8. Na tomto chromatogramu jsou dva výrazné píky, které ovšem do píků stanovovaných látek a vnitřního standardu nezasahují, neboť mají odlišné retenční časy. Patrně se jedná o píky endogenních látek, které nebyly při LLE zcela odstraněny.

Bylo dosaženo velmi dobré přesnosti stanovení všech tří látek na všech testovaných koncentračních hladinách. Je vždy velmi hluboko pod vyžadovaným limitem³¹⁾ CV = 15 %. Podobně správnost nedosahuje nikdy limitu SP = 15 %, který by neměl být u tohoto parametru překročen³¹⁾. Nejvyšší hodnota SP = 9 %, která je uvedena u ABZSO₂ na nejnižší koncentrační hladině, je způsobena nízkou hodnotou koncentrace samé a zvolenou přesností na jedno desetinné místo. Neznamená tedy žádnou extrémní chybu stanovení. Pro výtěžnost nejsou stanoveny žádné limity, ale její hodnota by se měla pohybovat kolem 100 %. To je v tab. 7 splněno.

Kalibrační přímky byly stanoveny v rozsahu vždy nejméně jednoho řádu a příslušné koeficienty determinace jsou více než uspokojivé. Validací byly stanoveny LOD a LOQ. Oba parametry jsou nejnižší pro ABZSO₂, jeho stanovení je navrženou metodou velmi citlivé. Další dvě stanovované látky vykazují tyto parametry poněkud horší, avšak citlivost jejich stanovení je stále velmi dobrá.

Navržená metoda byla úspěšně aplikována v praxi. Jednak je běžně používána na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové při studiu rezistence parazita *Haemonchus contortus* vůči ABZ, jednak byla využita ke stanovení ABZ a jeho metabolitů v rákosu pro externí spolupracující pracoviště. Retenční časy na obr. 9 se trochu odchyľují od retenčních časů na obr. 7. To je způsobeno použitím corte-shell kolony se stejnou stacionární fází, ale od jiného výrobce (Supelco). Také se zde projevila odlišná biologická matrice, neboť endogenní látky eluovaly ve velmi krátkém čase ještě před ABZSO. Schopnost metody dávat spolehlivé výsledky i po malých změnách se někdy nazývá robustnost. Tato vlastnost vyvinuté metody byla v praxi prokázána, neboť metoda je použitelná i pro jinou biologickou matrici a kolonu se stejnou náplní od jiného výrobce.

6. ZÁVĚR

V této práci byla vyvinuta izokratická HPLC metoda stanovení ABZ a jeho dvou metabolitů (ABZSO, ABZSO₂) v biologickém materiálu (homogenátu *Haemonchus contortus*) s OXI v roli vnitřního standardu na core-shell koloně s pentafluorofenylovou stacionární fází. Tato stacionární fáze je ortogonální vůči nejčastěji používané fázi C18, na níž bylo toto stanovení provázeno značnými problémy. Použitím pentafluorofenylové stacionární fáze byly tyto problémy překonány. Metoda byla úspěšně validována a je využívána ve výzkumné praxi.

Použitá literatura a zdroje:

1. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006, str. 33 - 44.
2. Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004, str. 73 - 82.
3. Gehrke Ch. W., Wixom R. L.: Chromatography: A Science of Discovery, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.
4. Smolkova – Keulemansova E.: 100th Anniversary of the Discovery of Chromatography, Chem.Listy 97 (2003), Issue 3 (march), str. 134 - 139.
5. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie, 1.vyd. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, Praha 2006, str. 18 - 22.
6. Teorie HPLC , webové stránky www.hplc.cz.
7. Fallah M. Z. El., Martin M.: Chromatographia, 24 (1987), 115.
8. Lamka J., Ducháček L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2006, str. 60 - 70.
9. Katzung B. G.: Základní a klinická farmakologie, H&H, 1994, kap. 53, str. 765 - 774.
10. Danaher M., De Ruyck H., Crooks S.R., Dowling G., O'Keeffe M.: J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 845 (2007), 1 - 37.
11. Kubíček V., Soukupová M., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Skálová L.: Chromatographia, 68 (2008), 865 - 867.
12. Lincová D., Farghali H. et al., Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, 2007, str. 536 - 541.
13. Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B., A.G. Gilman: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. New York, NY: McGraw - Hill, 2001, str. 1126.
14. Katalog Kinetex core - shell kolon, technologická brožura kolon Kinetex společnosti Phenomenex, dostupné z internetových stránek výrobce www.phenomenex.com
15. Kitzmann D., Cheng K., Fleckenstein L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002), 801-813.
16. Wu Z., Medlicott N.J., Razzak M., Tucker I.G.: J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005), 225-232.

17. Mirfazaelian A., Dadashzadeh S., Rouini M. R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002), 1249-1254.
18. Sarin R., Dash A.P., Dua V.K.: J. Chromatogr. B 799 (2004), 233-238.
19. Batzias G. C., Delis G.A.: J. Chromatogr. B 805 (2004), 267-274.
20. Zongde Z., Xingping L., Xiaomei W., Hong Z., Yanping S., Liren Ch., Yongmin L.: J. Biochem. Biophys. Methods 62 (2005), 69-79.
21. Msagati T. A. M., Nindi M. M.: J. Sep. Sci. 24 (2001), 606 – 614.
22. Xia X., Dong Y., Luo P., Wang X., Li X., Ding S., Shen J.: J. Chromatogr. B 878 (2010), 3174-3180.
23. French G., Aguilera Luis M. M., Vidal J.L.M., Romero-Gonzalez R.: Anal. Chim. Acta 661 (2010), 150-160.
24. Kinsella B., Whelan M., Cantwell H., McCormack M., Furey A., Lehotay S. J., Danaher M.: Talanta 83 (2010), 14-24.
25. Whelan M., Kinsella B., Furey A., Moloney M., Cantwell H., Lehotay S. J., Danaher M.: J. Chromatogr. A 1217 (2010), 4612-4622.
26. www.molinspiration.com/services
27. Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W.: J. Chromatogr. A 1060 (2004), 77-116.
28. Hrdý T.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, dosud neobhájeno.
29. Lukešová M.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2010.
30. Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběnová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L.: Vet. Parasitol. 151 (2008) 242 – 248.
31. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001; <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
32. Coufalová I.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2011.