

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

VALIDACE METODY STANOVENÍ AMIODARONU A JEHO METABOLITU
POMOCÍ HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové 2015

Bc. Marie Prudková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 5. 5. 2015

.....

Bc. Marie Prudková

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Marie Prudková

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Specialistka: PharmDr. Jana Maláková, Ph.D.

Název diplomové práce: Validace metody stanovení amiodaronu a jeho metabolitu pomocí HPLC

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá zavedením kvantitativního stanovení amiodaronu a jeho metabolitu desethylamiodaronu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s využitím vnitřního standardu dronedaronu a ověřením jejího použití při analýze vzorků pacientů. V teoretické části je řešena problematika amiodaronu a kapalinové chromatografie a možnosti stanovení této látky různými metodami. V experimentální části je popsán postup analýzy amiodaronu a desethylamiodaronu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a validace této metody, zahrnující parametry LOD, LOQ, linearitu, pracovní rozsah, preciznost a výtěžnost (recovery). Závěrem práce jsou srovnány dva způsoby hodnocení výsledků analýzy na souboru 41 pacientů. Validačními parametry byla ověřena spolehlivost analytického postupu.

Klíčová slova: amiodaron, desethylamiodaron, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, validace

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemicals Sciences

Candidate: Bc. Marie Prudková

Supervisor: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Specialist: PharmDr. Jana Maláková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Validation of the method the determination of amiodarone and its metabolite by HPLC

ABSTRACT

This thesis introduces a method of quantitative determination of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone by high performance liquid chromatography with UV detection using internal standard dronedarone and verification of its use in the analysis of patient samples. The theoretical part describes method of liquid chromatography, amiodarone substance and possibilities of its determination using selected methods. The experimental part of the thesis describes procedures for analysis of amiodarone and desethylamiodarone utilizing high performance liquid chromatography and also includes validation of such method, including the following parameters: LOD, LOQ, linearity, working range, precision and recovery. In the conclusion part, the thesis compares two methods of result evaluation, which were gained from a sample of 41 patients. Reliability of such analytical procedure was verified through validation parameters.

Key words: amiodarone, desethylamiodarone, high performance liquid chromatography, validation

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych chtěla touto cestou poděkovat paní PharmDr. Janě Malákové, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracování experimentální části a dále mému školiteli panu prof. MUDr. Jaroslavovi Dršatovi, CSc. za poskytnutí cenných rad a připomínek.

OBSAH

1	ÚVOD DO TÉMATU	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Amiodaron.....	9
2.1.1	Chemické a fyzikálně – chemické vlastnosti amiodaronu.....	9
2.1.2	Léková forma.....	10
2.1.3	Mechanismus účinku	10
2.1.4	Farmakokinetika	10
2.1.5	Nežádoucí účinky	11
2.1.6	Terapeutické použití	11
2.2	Chromatografie	12
2.2.1	Princip chromatografie	12
2.2.2	Dělení chromatografie podle principu separace	13
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
2.3.1	Princip separace	15
2.3.2	Systémy fází pro HPLC	17
2.3.3	Přístrojové uspořádání HPLC chromatografu.....	19
2.3.4	Vyhodnocování výsledků v HPLC	24
2.4	Validace analytického postupu	26
2.4.1	Parametry ověřované validací.....	27
2.5	Analytické metody pro stanovení amiodaronu a jeho metabolitu.....	30
3	CÍL PRÁCE	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Použité chemikálie, biologický materiál, pomůcky a přístroje	34
4.1.1	Chemikálie	34
4.1.2	Biologický materiál.....	34
4.1.3	Pomůcky	34
4.1.4	Přístroje.....	35
4.2	Pracovní postup.....	35
4.2.1	Příprava roztoků.....	35
4.2.2	Příprava kontrolních roztoků	35
4.2.3	Příprava kalibračního roztoku.....	36
4.2.4	Zpracování vzorků pacientů a kontrolních materiálů	36

4.3	Chromatografické podmínky	37
4.4	Testování validačních parametrů	38
4.4.1	Mez detekce (LOD)	38
4.4.2	Mez stanovitelnosti (LOQ)	38
4.4.3	Linearita a pracovní rozsah	38
4.4.4	Preciznost	39
4.4.5	Výtěžnost (recovery) a relativní bias (accuracy)	40
5	VÝSLEDKY	41
5.1	Chromatografické záznamy	41
5.2	Validační parametry	47
5.2.1	Mez detekce (LOD)	47
5.2.2	Mez stanovitelnosti (LOQ)	49
5.2.3	Linearita a pracovní rozsah	50
5.2.4	Parametry preciznosti, výtěžnosti (recovery) a vychýlení (bias)	53
5.3	Porovnání výsledků analýzy amiodaronu a jeho metabolitu v séru	54
5.3.1	Passing-Bablokova neparametrická regrese	54
5.3.2	Bland-Altmanův rozdílový diagram	60
5.3.3	Párový t-test	61
5.3.4	Korelace	63
5.4	Chromatografické záznamy analýzy vzorků pacientů	65
6	DISKUSE	67
7	ZÁVĚR	69
8	SEZNAM ZKRATEK	70
9	LITERATURA	71
	PŘÍLOHY	75

1 ÚVOD DO TÉMATU

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je dnes široce používaná analytická metoda, která je dostatečně citlivá, rychlá a podléhá neustálé modernizaci. Proto se často používá pro stanovení hladin léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu.

K léčivům, u kterých je vhodné monitorovat plazmatickou hladinu, se řadí i amiodaron. Amiodaron spadá do skupiny antiarytmik III. generace a je nejúčinnější a velmi rozšířený v léčbě síňových a komorových arytmií. Vzhledem k velké interindividuální biologické variabilitě nelze z dávkování předvídat dosažené koncentrace u daného jedince. Má dlouhý poločas eliminace a závažné nežádoucí účinky, které narůstají se zvyšující se plazmatickou koncentrací léku.

Analýzou amiodaronu a jeho metabolitu v biologickém materiálu se zabývá množství prací. Některé popisují stanovení těchto analytů metodami imunochemickými, jiné metodami chromatografickými, z nichž dominuje vysokoučinná kapalinová chromatografie.

K tomu, aby mohla být analytická metoda zavedena do praxe, je nutná validace. Problematikou validace bioanalytických metod se zabývá například Česká skupina klinické biochemie, společnost FDA a EMEA. K parametrům ověřovaných validací se řadí mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, pracovní rozsah, preciznost a výtěžnost (recovery) nebo vychýlení (bias).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Amiodaron

Amiodaron je jodovaný derivát benzofuranu. Chemický název je 2-butyl-3-[3,5-diiodo-4-(β-diethylaminoethoxy)-benzoyl]benzofuran. Řadí se mezi antiarytmika III. třídy podle Vaughn-Williamse. Působí přes Na⁺, K⁺, Ca²⁺ kanály a má alfa i betalytické účinky. Je indikován např. při síňové fibrilaci a síňovém flutteru a těžkých ventrikulárních arytmiích.

Má významné nežádoucí účinky a neobvyklou farmakokinetiku. V klinické praxi se využívá již od roku 1962. [8,11,14,17,23]

2.1.1 Chemické a fyzikálně – chemické vlastnosti amiodaronu

Amiodaron je bílý nebo téměř bílý jemný krystalický prášek. Velmi těžce se rozpouští ve vodě, snadno v dichlormethanu, dobře rozpustný v metanolu, velmi těžce rozpustný v hexanu. [23]

Amiodarone hydrochloride

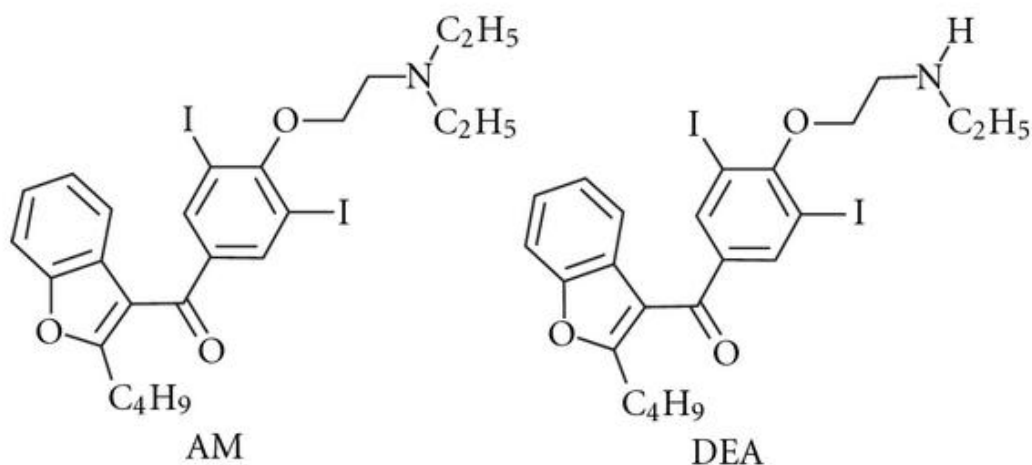
C₂₅ H₂₉ I₂ NO₃, HCl

Molekulová hmotnost: 681,82 [8]

Desethylamiodarone hydrochloride

C₂₃ H₂₅ I₂ NO₃, HCl

Molekulová hmotnost: 653,77 [8]



Obr. 1 Chemické struktury amiodaronu (AM) a jeho metabolitu desethylamiodaronu (DEA)

Převzato z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/428560/fig1/>. [Online]. Citováno dne:

15.10.2014

2.1.2 Léková forma

Bílé až téměř bílé kulaté bikonvexní tablety obsahující 100 mg a 200 mg amiodaronu hydrochloridu (Cordarone ® 100 a 200, Sanofi Labaz).^[8]

2.1.3 Mechanismus účinku

Amiodaron blokuje K^+ , Na^+ a Ca^{2+} - kanály. Prodlužuje depolarizační fázi inhibicí výstupu K^+ z buňky. Také zpomaluje diastolickou depolarizaci buněk pacemakeru a snižuje tím frekvenci sinusového uzlu. Refrakterní fáze všech úseků srdce se prodlužuje. Základem jeho účinku při tachykardiích je tedy prodloužení akčního potenciálu i při rychlých srdečních frekvencích. Je též silným inhibitorem abnormální automacie. Amiodaron má i antianginózní účinky, které jsou důsledkem jeho schopnosti nekompetitivně blokovat α - a β -adrenergní receptory a rovněž blokovat vstup vápníku do buněk hladkého svalstva cév. Amiodaron je biotransformován v játrech a jeho metabolit N-desethylamiodaron je účinný blokátor Na^+ kanálu. Podle experimentů je zodpovědný za 70 % antiarytmického působení amiodaronu. Amiodaron zlepšuje vztah mezi dodávkou kyslíku a spotřebou kyslíku v myokardu. Je to tím, že vede k relaxaci hladkého svalstva cév a tím zvyšuje koronární průtok a snižuje celkovou periferní rezistenci.^[11,14,17,30]

2.1.4 Farmakokinetika

Farmakokinetické vlastnosti souvisí se strukturou amiodaronu, tj. přítomností aromatického kruhu, vysokým obsahem jódu a přítomností alifatického řetězce s nízkou polaritou.

Amiodaron se velmi špatně rozpouští ve vodě. Z 96 % se váže na bílkoviny krevní plazmy. Eliminační poločas je v rozsahu 30-50 dní. Účinná plazmatická koncentrace je asi 1-2 $\mu\text{g/ml}$, v srdeční tkáni je přibližně 30krát vyšší. Amiodaron se z trávicího ústrojí resorbuje velmi pomalu a nedokonale. Distribuuje se do tkání, hlavně tukové a svalové, a proto je hladina v krvi při léčbě nízká. Kumulace léku v tkáních, velmi pomalá eliminace a velký distribuční objem má důležité klinické důsledky – opožděný antiarytmický účinek a prodlouženou dobu účinku po jeho vynechání. Dávka amiodaronu se nemusí snižovat u selhání ledvin, protože je jen minimálně (1 %) vylučován ledvinami.^[14,17,28,30]

2.1.5 Nežádoucí účinky

Při užívání amiodaronu se vyskytují četné nežádoucí účinky. U nemocných s poruchou sinusového nebo atrioventrikulárního uzlu může amiodaron způsobit symptomatickou bradykardii nebo srdeční blokádu. U citlivých pacientů může dojít i k srdečnímu selhání.

Amiodaron se ukládá v tkáních a můžeme ho nalézt ve všech orgánech těla, zvláště v rohovce, kde se objevují žlutohnědé mikrokrystaly. Tato depozita jen vzácně způsobují poruchy zraku. Depozita v kůži vedou k fotodermatitidě, takto postižení nemocní se musí vyhýbat slunci. Může vzniknout i modrošedé zbarvení kůže. Běžné jsou také neurologické nežádoucí účinky projevující se parestézií, třesem, ataxií a bolestí hlavy. Rovněž může dojít k fibróze plic.

Z vysokého obsahu jódu v molekule vyplývá, že amiodaron ovlivňuje i funkce štítné žlázy. Dochází k hypo- nebo hypertyreoidismu. Amiodaron inhibuje 5'-monodeiodinázu typu I, která odstraňuje jód z tyroxinu (T₄), aby došlo ke konverzi na trijódtyronin (T₃). Výsledkem je zvýšení plazmatické koncentrace volného tyroxinu (fT₄) a současné snížení volného trijódtyroninu (fT₃).

Časté jsou poruchy zažívacího traktu (nauzea, zvracení, bolesti břicha). Asi u 30 % pacientů vznikají hepatopatie, které histologicky odpovídají alkoholické hepatitidě.

Tento lék snižuje clearance warfarinu, teofylinu, chinidinu, prokainamidu a dalších látek. Inhibuje isoformy 3A4, 2C9 a 2D6 cytochromu P450, což je důležité při různých lékových interakcích. ^[11,14,28,29]

2.1.6 Terapeutické použití

Amiodaron je účinný při supraventrikulárních i ventrikulárních arytmiích a také při paroxysmální síňové fibrilaci. Intravenózní užití amiodaronu se indikuje u nemocných s opakovanými komorovými tachykardiemi nebo fibrilací. Je vhodný při léčbě a profylaxi arytmií u nemocných s chronickou ischemickou chorobou srdeční a u nemocných po infarktu myokardu. Amiodaron by se měl indikovat až poté, kdy selhala běžně používaná antiarytmika. ^[17,30]

2.2 Chromatografie

Chromatografie je separační a zároveň analytická metoda poskytující kvalitativní a kvantitativní informace o analyzovaném vzorku. Základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. [2]

Dělení chromatografie

- a) Podle povahy mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC)
- b) Podle způsobu provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- c) Podle principu separace: rozdělovací, iontově výměnná, adsorpční, gelová, afinitní
- d) Podle účelu použití: analytická, preparativní [2]

2.2.1 Princip chromatografie

Všechny chromatografické metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze. Jedna fáze je mobilní a druhá stacionární. Stacionární fáze je nepohyblivá a má schopnost do různé míry zadržovat jednotlivé součásti směsi. Mobilní fáze vymývá jednotlivé části směsi ze stacionární fáze a nese je různou rychlostí ve směru toku, čímž dojde k dělení. Mobilní fáze může být kapalina nebo plyn. Stacionární fáze je tuhá látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči. Při dělení látek směsi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Distribuci složek mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční neboli rozdělovací konstantou K_D :

$$K_D = c_s / c_m$$

c_s ... koncentrace látky ve stacionární fázi, c_m ... koncentrace látky v mobilní fázi

Čím vyšší je hodnota K_D pro určitou látku, tím delší dobu setrvají její molekuly ve stacionární fázi, a tím větší je její retence. Vlastní dělení látek závisí na retenci, která působí selektivně. To znamená, že některá látka je zadržována více a jiná méně. Čím pevněji je látka sorbována na stacionární fázi, tím pomaleji postupuje chromatografickým systémem.

Vymývání látek z kolony může být prováděno isokratickou nebo gradientovou elucí. Isokratická eluce znamená, že mobilní fáze má konstantní složení a stejnou eluční sílu. Při gradientové eluci má mobilní fáze zvyšující se eluční sílu.

Separované zóny látek vycházející z kolony jsou zaznamenávány při průchodu detektorem a signál je poté převeden do chromatografického záznamu neboli chromatogramu. ^[13,21]

Kapalinová chromatografie může být prováděna v plošném nebo kolonovém uspořádání. Plošné uspořádání se využívá u tenkovrstvé chromatografie (TLC) a dříve se využívalo u papírové chromatografie. Kolonové uspořádání se dnes nejvíce využívá u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). ^[21]

2.2.2 Dělení chromatografie podle principu separace: ^[4,13]

Rozdělovací chromatografie

Látky jsou děleny na základě jejich rozdělovacích koeficientů. Chromatografický sloupec je naplněn inertním nosičem (např. silikagel) na jehož povrchu je ukotvena účinná stacionární kapalná fáze. Při průchodu mobilní fáze (organické rozpouštědlo) dochází k opakovanému rozdělování součástí analyzované směsi mezi obě kapalně fáze.

Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fází jsou iontoměniče (anexy a katexy), pomocí kterých můžeme dělit elektrolyty schopné existovat v iontové formě.

Adsorpční chromatografie

Dělení látek se děje na základě různé adsorpce z mobilní fáze na povrch absorbentu. Adsorbentem je nejčastěji oxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel, prášková celuloza, aktivní uhlí. Mobilní fází jsou buď čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady nebo směsi rozpouštědel.

Gelová chromatografie

Stacionární fází tvoří nabobtnalý gel (př. Sephadex), pomocí kterého jsou látky děleny podle velikosti molekul na základě molekulového síťového efektu gelu.

Afinitní chromatografie

Využívá specifické interakce mezi molekulami. Interakce mohou být biologické povahy (např. enzym – substrát, antigen – protilátka, receptor – hormon) nebo biologickou interakci napodobují (např. protein – triazinové barvivo). Ligand je pevně ukotven na nosiči, kterým je naplněna kolona. V dělené směsi je přítomna řada molekul, z nichž jen některé mají afinitu k ligandu. Tyto molekuly se naváží na ligand a ostatní složky se vymyjí. Po promytí kolony se změní složení mobilní fáze, aby se oslabila vazba ligand – navázaná molekula a takto se z kolony uvolní.

2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separační účinnost vysokoučinné kapalinové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím jsou částice menší a stejnoměrnější, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. U klasické kapalinové chromatografie protéká mobilní fáze samospádem, avšak u HPLC musí být průtok mobilní fáze dostatečně rychlý a tudíž je potřeba ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem.

Vývoj vysokoučinné kapalinové chromatografie začal v již 70. letech 20. století a v nedávné době vedl až k vývoji „Ultra high performance liquid chromatography“ (UHPLC), která umožňuje práci za mnohem větších tlaků, čímž zkrátí dobu analýzy. Další výhodou UHPLC je nižší spotřeba rozpouštědel, čímž jsou nižší i finanční náklady. Rychlejší separace látek je dána díky velikosti částic kolony a výkonnému čerpadlu, které pracuje za vysokých tlaků s možností použití vyšších rychlostí průtoku mobilní fáze.

2.3.1 Princip separace

K dělení látek lze u této techniky využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů, tj. adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu. Je tedy možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi většiny organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. Tato technika umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek.

Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku přes injektor do kolony a následně k detektoru. Vzorek rozpuštěný v mobilní fázi nebo podobném rozpouštědle, se vstříkuje do tekoucí mobilní fáze, která ho unáší na kolonu. Dělení nastává v koloně a je specifické pro daný typ kolony. Separované analyty se dostávají do detektoru, kde působí změnu odezvy signálu. Výsledkem je chromatogram se separovanými analyty ve formě píků. ^[13,18]

Ukazatelem kvality chromatografické separace je účinnost chromatografické kolony. Charakterizuje, jak moc se rozšiřují eluční zóny dělené na koloně. Mírou účinnosti kolony je:

a) počet teoretických pater n :

$$n = 16 \cdot (t_{r,j} / w_j)^2$$

w_j ... šířka píku j -tého analytu při základně, $t_{R,j}$... retenční čas j -tého analytu

b) výškový ekvivalent teoretického patra H (mm):

$$H = L / n = L / 16 \cdot (w_j / t_{r,j})^2$$

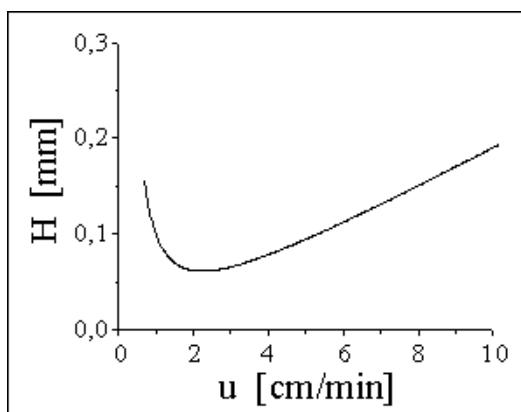
L ... délka kolony

Maximální účinnost dané kolony je při minimálních hodnotách H , tedy při maximálním počtu teoretických pater kolony.

Výškový ekvivalent teoretického patra (H) je závislý na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u). Závislost se vyjadřuje pomocí Van Deemterovy rovnice:

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

A vyjadřuje vířivou difúzi, B vyjadřuje podélnou molekulární difúzi, C vyjadřuje odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi a mobilní fázi. [4]

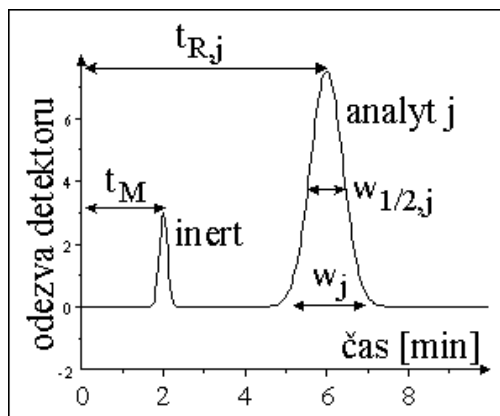


Obr. 2 Grafické znázornění Van Deemterovy rovnice

Převzato z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online]. Citováno dne: 22.11.2014

Minimum křivky odpovídá rychlosti průtoku, při které kolona vykazuje největší účinnost, a tudíž rozšiřuje zóny analytů jen minimálně. [2]

Každá analyzovaná látka je charakteristická svým retenčním časem t_R , což je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku). Plocha pod píkem nebo výška píku (h) odpovídá množství analyzované látky. Retenční čas je tedy kvalitativní ukazatel a plocha nebo výška píku pak kvantitativní ukazatel. [2,4]



Obr. 3 Chromatografický pík

Převzato z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online]. Citováno dne: 22.11.2014

$t_{r,j}$ je retenční čas j -tého analytu, t_M je mrtvý čas kolony neboli retenční čas nezadržovaného analytu, $w_{1/2,j}$ je šířka píku j -tého analytu v polovině výšky, w_j je šířka píku j -tého analytu při základně.

2.3.2 Systémy fází pro HPLC

Rozdělení systémů fází:

- a) Chromatografie s normální fází (NP) – mobilní fáze je nepolární a stacionární fáze je polární
- b) Chromatografie s reverzní fází (RP) – mobilní fáze je polární a stacionární fáze je nepolární

Stacionární fáze

U HPLC jsou nejčastěji využívány chemicky vázané stacionární fáze (viz Tab. 1). Na hydroxylové skupiny silikagelu jsou silylací navázané různé skupiny. Nejpoužívanější je tzv. C18 fáze (na částicích silikagelu jsou navázané oktadecylové skupiny). Dále jsou využívány stacionární fáze tvořeny grafitizovaným uhlíkem nebo smíšeným kopolymerem, na kterých jsou navázány skupiny C4, C8, C18 nebo iontové skupiny. Tyto fáze jsou odolnější v širším rozmezí pH (2 - 13). Výše popsané fáze jsou nepolární a využívají se pro RP.


Pro HPLC s normální fází se využívají funkční skupiny silanol-, amino- nebo nitrilové a dále pak nemodifikovaný silikagel a oxid hlinitý.

Pro detekci optických izomerů jsou vyráběny chirální stacionární fáze a slouží např. k analýze enantiomerů léčiv.

Restricted-access stacionární fáze umožňují přímo analyzovat biologické vzorky s vysokým obsahem bílkovin. Vnější povrch částic náplně je opatřen hydrofilní vrstvou, kterou pronikají menší molekuly do pórů částice. Póry jsou potaženy hydrofobní stacionární fází, na které je uskutečňováno vlastní dělení. Velké molekuly bílkovin nepronikají do vnitřních pórů a obcházejí částice náplně.

Existují i monolitické stacionární fáze, které jsou tvořeny polymerem o definované pórovitosti organického původu (např. styren-divinylbenzen, metakrylát) nebo anorganického původu (např. na bázi silikagelu).^[4]

Tab. 1 Chemicky modifikované stacionární fáze – přehled vázaných fází dle polarity^[13]

Název	Vázaná skupina	Označení	Charakteristika
Oktadecyl	$C_{18}H_{37}$	$C_{18};RP-18;$	<i>Nepolární</i>  <i>Polární</i>
Oktyl	C_8H_{17}	<i>ODS</i>	
Ethyl	C_2H_5	$C_8;RP-8$	
Amino	$(CH_2)_3NH_2$	$C_2;RP-2$	
Cyano	$(CH_2)_3CN$		
Diol	$(CH_2)_3-OCH_2CH(OH)-CH_2(OH)$		

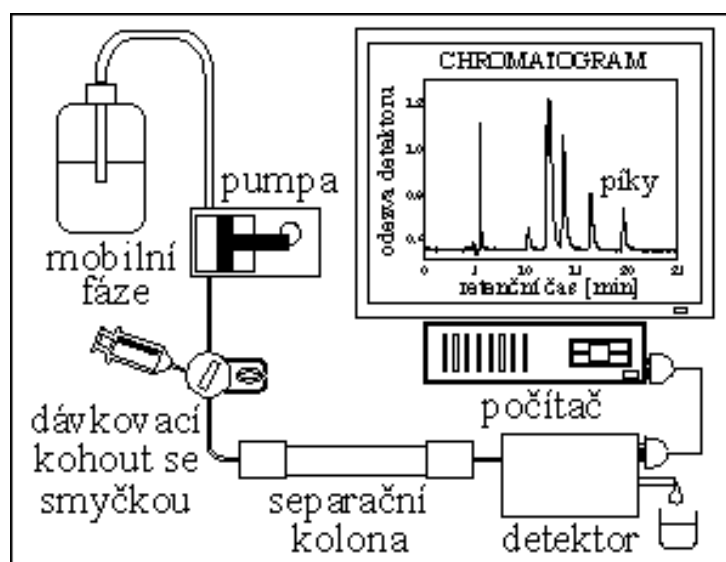
Mobilní fáze

Pro HPLC analýzu musí být mobilní fáze velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů. Plyny lze odstranit probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. Nejčastěji se však k odplynění mobilní fáze používá on-line vakuový degaser. K odstranění nečistot je nutné mobilní fázi přefiltrovat. Rozpouštědla jsou seřazeny do eluotropní řady podle rostoucí eluční síly. Eluotropní řada je pro chromatografii s normálními fázemi heptan < cyklohexan < tetrachlormethan < toluen < ether < chloroform < aceton < acetonitril < etanol < metanol < kyselina octová < voda. Rozpouštědla se musí používat vždy co nejvyšší čistoty (HPLC grade). Pro nastavení a udržení určitého pH mobilní fáze jsou využívány různé typy pufrů, např. fosfátový.

Jako mobilní fáze se při chromatografii na normálních fázích používá chloroform, heptan a jiné směsi. Pro chromatografii na reverzních fázích se používá směs polárních rozpouštědel: voda:metanol, voda:acetonitril, voda:izopropylalkohol atd.^[6,13,15]

2.3.3 Přístrojové uspořádání HPLC chromatografu

Kaplinový chromatograf se skládá z kolony pro separaci analytů, zásobníků rozpouštědel, modulu na odvzdušnění mobilní fáze, čerpadla pro průtok mobilní fáze systémem, dávkovače pro nanesení vzorku na kolony, on-line detektoru pro detekci separovaných analytů, PC pro kontrolu systému, sběr a vyhodnocení dat (viz Obr. 4).^[4]



Obr. 4 Schéma HPLC

Převzato z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [Online]. Citováno dne: 24.11.2014

Čerpadla

Čerpadla slouží pro reprodukovatelný konstantní a bezpulzní tok mobilní fáze chromatografickým systémem s malou rychlostí (0,1 – 10 ml/min). Čerpadla dosahují tlaku až 40 MPa.^[2,4]

Modul na odvzdušnění mobilní fáze

Na odvzdušnění mobilní fáze se používá on-line degaser, který obsahuje PTFE membránu, přes kterou probíhá vlastní odvzdušnění. Další možností odvzdušnění je pomocí zařízení pro přívod helia do zásobníků mobilní fáze, anebo pomocí ultrazvukové lázně, kdy dochází k rozptýlení submikro-bublinek plynu, které se shlukují v solventu.^[6]

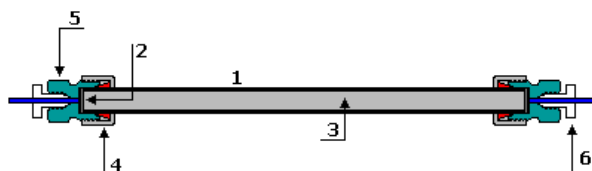
Dávkovací zařízení

K dávkování vzorku se využívají automatické dávkovače, které jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (tzv. vialky). Vialky jsou uzavřené pryžovým septem nebo zátkou z polypropylenu

Nejpoužívanější dávkování je pomocí šesticestného ventilu s vyměnitelnou smyčkou. ^[4,6]

Kolony

Kolony pro HPLC jsou ocelové, skleněné nebo plastové. HPLC kolony (viz Obr. 5) se skládají z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2). Frita zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a zároveň umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Konce kolony jsou ukončeny převlečeným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5). V kovové hlavici je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6). Jsou dlouhé 5-30 cm s vnitřním průměrem 2-8 mm. Náplň musí být homogenní a rovnoměrná. Používají se náplňové i kapilární kolony. Náplňové kolony obsahují částice o průměru 1,8-10 μm a čím jsou menší, tím větší je separační účinnost kolony. Kapilární kolony jsou kapiláry z křemičitého skla s vnějším povrchem potaženým polyamidem a tenkou vrstvou stacionární fáze na vnitřním povrchu. ^[4,6]



Obr. 5 Chromatografická kolona

Převzato z: <http://www.hplc.cz/>. [Online]. Citováno dne: 3.12.2014

Detektory

Pro HPLC se využívají různé typy detektorů. Každý detektor je vybaven průtokovou celou, kterou prochází eluát z kolony. Separované analyty, které jsou obsažené v eluátu, jsou zde detekovány a vygenerovaný elektrický signál je zaznamenán ve formě chromatogramu.

Na detektory jsou kladeny vysoké požadavky. Jedná se o vysokou citlivost, jelikož látky obsažené v roztoku jsou detekovány v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$, dále o

reprodukovatelnost a linearitu odezvy a univerzálnost, protože musí detekovat všechny oddělené složky vzorku. ^[4,13]

Detektory na principu fotometrie a spektrofotometrie

Tyto detektory měří absorpenci UV a VIS záření látkami, které vychází z kolony chromatografu. Jsou často využívány, protože většina organických látek absorbuje UV záření. Měří v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm.

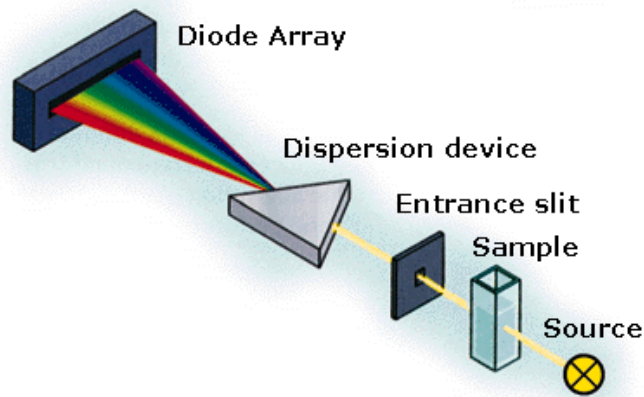
Pro detekci v UV-VIS oblasti je nutné, aby molekula analytu obsahovala tzv. chromofor. Chromofor je část molekuly charakteristická určitým uskupením atomů a vazeb. Absorpci v UV-VIS oblasti způsobuje přítomnost konjugovaných násobných vazeb, dvojných vazeb u aromatických či heterocyklických sloučenin nebo přítomnost atomů O, S, N s nevazebným elektronovým párem u nearomatických sloučenin.

Mobilní fáze použitá při UV detekci musí dobře propouštět vybranou vlnovou délku. Pokud by rozpouštědlo absorbovalo při dané vlnové délce, docházelo by ke zvýšení šumu v chromatografickém záznamu a ke snížení citlivosti detekce analytů. Rovněž se musí volit taková aditiva mobilních fází, které neabsorbují v dané vlnové délce. ^[3,4,22]

a) Detektory s fixní vlnovou délkou. Jsou velice citlivé. Využívají intenzivní linii rtuťové výbojky o vlnové délce 254 nm, kadmiové o vlnové délce 229 nm nebo zinkové o vlnové délce 214 nm. Pro získání monochromatického záření se využívají filtry. ^[3,4]

b) Detektory s variabilní vlnovou délkou. Tento typ detektorů může měřit při zvolené vlnové délce v rozmezí od 190 nm do 400 nm. ^[4]

c) Detektory vybavené diodovým polem. Detektory tohoto typu mohou měřit v celé oblasti 190 – 800 nm. Průtokovou kvyetou prochází polychromatické světlo (zdrojem je deuteriová nebo wolframová lampa), které je za kvyetou rozděleno difrakční mřížkou a nasměrováno na diodové pole (křemíková destička s množstvím fotodiod), které zachycuje intenzitu světla všech vlnových délek (viz Obr. 6). Spektrální rozlišení udává počet diod na poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diod. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram, který popisuje závislost absorpance na vlnové délce a na čase. Z chromatogramu se identifikují eluované látky a lze posoudit i jejich čistotu. ^[4,6,13]



Obr. 6 Detektor vybavený diodovým polem

Převzato z: <http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/HP8452.html>. [Online]. Citováno dne:

25.11.2014

Detektory na principu fluorimetrie

Fluorimetry se využívají pro detekci fluorescenčních látek. V některých případech je často nutná před- nebo postkolonová derivatizace analytů, aby vznikly fluorescenční sloučeniny. Fluorimetry měří sekundární neboli emisní záření, jež látka vyzáří po absorpci primárního neboli excitačního elektromagnetického záření. Vlnová délka emitovaného záření je větší než excitačního záření. Tyto detektory jsou citlivé a selektivní. Jako zdroj excitačního záření se používají deuteriové nebo xenonové lampy nebo lasery. ^[3,4]

Elektrochemické detektory

a) Amperometrické elektrochemické detektory. Elektroaktivní analyt je oxidován nebo redukován na povrchu elektrody s konstantním potenciálem a zaznamenáván je elektrický proud. Používají se například pro analýzu katecholaminů v moči.

b) Coulometrické detektory. Tyto detektory pracují podobně jako amperometrické, měří se však vzniklý elektrický náboj. Využívají se například pro stanovení metanefrinů v moči. ^[4]

Refraktometrické detektory

Detektory tohoto typu měří změny indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci analytu. ^[4]

Hmotnostně-spektrometrické detektory (MS) pro LC nebo HPLC

Tyto detektory zaznamenávají ionty, které vznikají ionizací analytů. Nejdříve probíhá převod analytů rozpuštěných v mobilní fázi na ionty v plynné fázi. Poté se ionty analyzují, tzn., že se určí poměr hmotnosti k náboji (m/z). Jedná se o univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor. Analyty se identifikují na základě jejich hmotnostních spekter. Skládají se z iontového zdroje, iontového analyzátoru a detektoru. ^[3,4]

Iontové zdroje pro MS:

- a) **Elektrosprej ionizace (ESI)** - na kapiláru, kterou prochází eluát, je vloženo vysoké napětí. Z kapiláry se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček a následným odpařením rozpouštědla vznikají ionty. ESI probíhá za atmosférického tlaku. ESI je měkká ionizační technika. ^[3,4]
- b) **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)** – vzorek je přiveden do vyhřívané části iontového zdroje, kde je společně s rozpouštědlem odpařen. Ionizace probíhá v koronovém výboji pomocí jehly, na niž je vloženo vysoké napětí. Analyt je ionizován prostřednictvím ionizace nosného plynu. ^[4]
- c) **Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)** - primární ionty vznikají fotoionizací (zdrojem UV záření je kryptonová výbojka) z reakčního plynu (toluen) a ty poté ion-molekulárními interakcemi ionizují molekuly analytu. ^[4]

Analyzátor pro MS:

- a) **Kvadrupól** – analyzátor je tvořen 4 tyčemi kruhového průřezu, na které je vloženo napětí. Ionty, které vstupují do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat. Při vhodném napětí projdou kvadrupólem pouze ionty s určitým poměrem m/z . Změnou vkládaného napětí je možné nechat projít postupně ionty v celém rozsahu m/z . ^[3,4]

- b) **Lineární iontová past** – má podobné uspořádání jako kvadrupól, ale na oba konce elektrod je vloženo elektrostatické pole, které zabraňuje opustit iontům vnitřní prostor. ^[4]
- c) **Průletový analyzátor („Time of flight“ - TOF)** – zaznamenává hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí. Rychlost letu závisí na hodnotě m/z . ^[4]
- d) **Iontová cyklotronová rezonance** – jedná se o celu umístěnou ve vakuu uprostřed silného magnetického pole. V magnetickém poli se iont pohybuje po kruhové trajektorii a frekvence rotace jsou úměrné hodnotě m/z . Pomocí Fourierovy transformace jsou převedeny na hmotnostní spektrum. ^[3]

Detektory pro MS:

- a) **Elektronový násobič** – obsahuje sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Iont narazí na první dynodu a tím dojde k emisi elektronů. Po dopadu na další dynodu dojde k vícenásobné emisi. Kaskádovitým efektem vzniká velké množství elektronů, které jsou následně detekovány. ^[3,4]
- b) **Fotonásobič** – na fosforovou destičku, která je umístěna před vlastním fotonásobičem, dopadají částice z konverzní dynody a tím dochází k emisi fotonů. Fotony pak dopadají na fotokatodu a fotoelektrickým jevem dochází k emisi elektronů. Elektrony jsou zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči. ^[4]

2.3.4 Vyhodnocování výsledků v HPLC

Kvalitativní analýza

K určení látek se využívá hodnot retenčních časů t_R . Retenční čas je čas, který uplyne od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku.

Kvantitativní analýza

Základem pro kvantitativní hodnocení je určení plochy nebo výšky píků. Plochy píků se vyhodnocují pomocí digitálních integrátorů nebo pomocí softwaru pro vyhodnocení chromatografických dat. Ke stanovení množství analyzované látky se využívají následující způsoby:

- a) **Metoda kalibrační křivky** – analyzuje se série standardů o známé, ale různé koncentraci a hledá se závislost kalibrační funkce.
- b) **Metoda vnitřního standardu** – vzorek se naředí vzorkem standardu, koncentrace standardu musí být známá. Při výpočtu koncentrace se počítá s poměry ploch píku a vnitřního standardu nebo se využívá kalibrační křivky.
- c) **Metoda standardního přídávku** – porovnává se analytický signál vzorku se signálem, získaným po přidání známých přídávků standardů stejného druhu jako je stanovovaná látka. Při prvním nástřiku se dává přesné množství vzorku, při druhém, přesné množství směsi vzorku s přídávkem určitého objemu standardního roztoku analytu.
- d) **Metoda vnitřní normalizace** – výsledkem této metody je jen relativní zastoupení jednotlivých složek směsi udávaný v %.^[6]

2.4 Validace analytického postupu

Před zavedením nové analytické metody do rutinní laboratorní praxe je nutné prověřit, zda její charakteristiky splňují požadavky, které jsou na ní kladené a validovat ji. Výrobky s CE značkou jsou validovány výrobcem testovacích souprav a diagnostik. Metody, které jsou však vyvinuty v laboratoři, je třeba validovat přímo v laboratoři.

Validace je proces ujištění, že analytická metoda nebo postup jsou vhodné pro zamýšlené použití. Prověření analytické metody má laboratoři zaručit, že údaje o jednotlivých znacích validované metody byly ověřeny a že jsou pravdivé a vhodné pro zamýšlený účel. Vlastnost, jež je předmětem validace, se nazývá validovaná vlastnost.

Validací si laboratoř zaručuje kvalitu dat při rutinním provozu. Zjišťují se jí důležitá data pro odhad nejistoty měření. Klinická laboratoř musí používat pouze validované metody. ^[6,7,19]

Rozlišuje se validace úplná nebo částečná. Úplná validace se provádí pro nové bioanalytické metody a částečná pro již validované metody, v jejichž metodice byly provedeny změny.

Validace se provádí v následujících případech ^[7] :

1. před zavedením nové metody,
2. před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře,
3. před zavedením nového (jiného) diagnostického kitu,
4. pokud se rozšíří stávající metoda o další účel,
5. ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém,
6. při převzetí metody z jiné laboratoře nebo z publikace,
7. pokud je významná změna instrumentace

Rozsah validace musí odpovídat potřebě získat dostatek údajů k rozhodnutí, zda je metoda vhodná pro zamýšlené použití. Validace je vždy daná charakterem validované metody. Validace kvalitativní metody nevyžaduje takové úsilí, jako validace kvantitativní metody. ^[7]

Informace pro validaci bioanalytických metod poskytuje společnost U. S. Food and Drug Administration (FDA) v dokumentu „Guidance for industry – Bioanalytical Method Validation“, dále dokument společnosti European Medicines Agency (EMA) s názvem „Guideline on bioanalytical method validation“. Doporučení pro validace vydává také Česká skupina klinické biochemie (ČSKB). ^[7,9,20]

2.4.1 Parametry ověřované validací ^[6,7,9,19,20]

Validační parametry analytického postupu jsou preciznost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost), výtěžnost (recovery) a relativní bias (accuracy), pracovní rozsah a linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti a případně další (matricové interference, srovnání s jinou metodou, srovnání pomocí výsledků EHK, robustnost,...).

1. Preciznost (precision) je těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky, získanými za předem definovaných podmínek. Cílem je zjistit náhodnou chybu. Hodnotí se průměr, směrodatná odchylka opakovatelnosti v sérii a mezilehlé preciznosti mezi sériemi. Z těchto parametrů se vypočítá variační koeficient (CV). Podle FDA a EMEA by měla být hodnota CV na každé hladině do 15 %, kromě meze stanovitelnosti dolní i horní, kde je tolerance do 20 %.

a) Opakovatelnost - definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (takových podmínek, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, stejným pracovníkem, stejnými přístroji a zařízeními, během krátkého časového rozmezí). Stanovují se referenční materiály s referenčními hodnotami analytů. Optimální je použití dvou referenčních materiálů o různých hodnotách analytů. Doporučuje se deset měření. Cílem je kvantifikace náhodné chyby měření. Stanovuje se hodnota průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu.

b) Mezilehlá preciznost – preciznost měření za souboru podmínek mezilehlé preciznosti měření. Podmínka mezilehlé preciznosti zahrnuje stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejném nebo podobném objektu v rozšířeném časovém úseku, ale může obsahovat další podmínky zahrnující změny. Změny mohou zahrnovat nové kalibrace, kalibrátory, změnu testovací soupravy, obsluhy a měřicího systému. Stanovuje se hodnota směrodatné odchylky mezilehlé preciznosti.

- 2. Výtěžnost (recovery) a relativní bias (accuracy)** – odhaduje systematickou chybu měření pomocí referenčního nebo kontrolního materiálu. Vzorky se měří za podmínek opakovatelnosti a vypočítá se aritmetický průměr, směrodatná odchylka, CV a bias (vychýlení) nebo výtěžnost metody.

Relativní bias se počítá podle vzorce:

$$bias = (n_{II} - n_I) / n_I \cdot 100 (\%)$$

A výtěžnost (recovery) se zjistí podle vzorce:

$$R = n_{II} / n_I \cdot 100 (\%)$$

n_{II} ... koncentrace naměřená, n_I ... koncentrace referenční

FDA požaduje výtěžnost v rozmezí 80 – 120 %.

- 3. Pracovní rozsah** – vymezuje interval, v němž lze s jistotou očekávat, že platí výrobcem/laboratoří deklarované a validačními experimenty ověřené hodnoty preciznosti a vychýlení metody. Měří se pět vzorků v tripletech. Podle FDA je spodní hranice tvořena mezí stanovitelnosti a horní limit nejvyšším kalibračním bodem – upper limit of quantification (ULOQ). Metodou nejmenších čtverců se proloží regresní závislost $y = kx + q$, kde y je poměr výšek (ploch) pík analytu a vnitřního standardu a x je poměr jejich koncentrací. Hodnotí se směrnice k , úsek q a korelační koeficient.
- 4. Linearita** – je schopnost analytického postupu získat v daném rozsahu výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Jde o přímkovou závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými. Používají se navážky referenční látky nebo daným způsobem naředěný roztok referenční látky. Obvykle se linearita stanovuje minimálně na pěti různých koncentračních hladinách. Získané výsledky se statisticky vyhodnotí, spočítá se korelační koeficient a rovnice přímky pomocí lineární regrese. FDA a EMEA doporučují přesnost pro nejnižší a nejvyšší kalibrační bod $CV \pm 20 \%$ a pro body mezi nejnižším a nejvyšším kalibračním bodem $CV \pm 15 \%$.

5. Mez detekce (LOD) – odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Detekční limit tedy udává skutečnou úroveň signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace. U spektrofotometrických metod, u kterých je k dispozici slepý pokus, se změří se deset vzorků blanku v sérii, následně se vypočítá hodnota směrodatné odchylky (SD_{blank}). Vzorec pro výpočet LOD:

$$LOD = 3 \cdot (SD_{blank} / S)$$

S ... směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci analytu,
 SD_{blank} ... směrodatná odchylka šumu základní linie

6. Mez stanovitelnosti (LOQ) – je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s definovanou precizností a výtěžností. Experimentálně lze LOQ stanovit měřením silně naředěných vzorků a určením nejnižší koncentrace, při které je ještě dosaženo žádané hodnoty CV (CV do 20 %, R 80-120%, viz FDA). U spektrofotometrických metod, u kterých je k dispozici slepý pokus, se opakovanou analýzou určí směrodatná odchylka a kvantitativní limit se vypočítá podle vzorce:

$$LOQ = 10 \cdot (SD_{blank} / S)$$

Teoretickou hodnotu meze stanovitelnosti lze vypočítat podle vztahu:

$$LOQ = 3 \cdot LOD$$

2.5 Analytické metody pro stanovení amiodaronu a jeho metabolitu

Pro stanovení amiodaronu a jeho metabolitu desethylamiodaronu v biologickém materiálu se používají především metody chromatografické (LC/MS, HPLC) a imunochemické (ELISA). Imunochemickými metodami nemůžeme však detekovat metabolity.

Příkladem je stanovení amiodaronu v lidské plazmě pomocí LC/MS (liquid chromatography with mass spektrofotometry). Tato metoda využívá kolonu se stacionární fází Capcell Pak C₁₈ (50 × 2.0 mm, 5 μm). Mobilní fáze pak protéká na základě gradientové eluce a je tvořena rozpouštědlem A, které obsahuje 0,02% kyselinu mravenčí v acetonitrilu a rozpouštědlem B, které obsahuje 0,02% kyselinu mravenčí ve vodě. ^[31]

Dále je možné amiodaron stanovit pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Amiodaron je tímto způsobem stanovovaný v séru. V této metodě je využívána protilátka IgG anti-amiodaronu a fluorogenní substrát methylumbelliferyl-β-D-galaktopyranosid. Detekce se provádí pomocí spektrofotometru při excitační vlnové délce 355 nm a emisní 460 nm. ^[31]

Nevýhodou imunoanalytických metod v detekci léčiv je výskyt nespecifických reakcí a nemožnost stanovit jejich metabolity. Z tohoto důvodu je pro hodnocení sérových hladin amiodaronu a jeho metabolitu výhodnější použít metodu chromatografickou. HPLC metoda je dostatečně citlivá a specifická, není příliš náročná na úpravu vzorku a k analýze potřebujeme pouze malé množství vzorku.

Tab. 2 uvádí vybrané HPLC metody a jejich charakteristiky, jako je úprava vzorku před analýzou, použitou mobilní a stacionární fází, průtok mobilní fáze, vnitřní standard a způsob detekce.

Na základě provedené literární rešerše a znalosti HPLC metody stanovení amiodaronu a jeho metabolitu v séru bez použití vnitřního standardu, která byla dříve využívána ke stanovení sérových hladin pacientů na Úseku klinické farmakologie (ÚKBD), jsme se rozhodli tuto HPLC metodu doplnit o vnitřní standard dronedaron a provést částečnou validaci metody.

Pro volbu HPLC metody jsou výchozím bodem fyzikálně-chemické vlastnosti analyzované látky. Zdrojem ke zjištění těchto informací jsou fyzikálně-chemické tabulky nebo vědecké databáze jako je např. PubChem, ChemSpider, Chemicalize.

Důležité jsou informace o struktuře látky a funkčních skupinách, polaritě (hodnota $\log P$), molekulové hmotnosti (MW), rozpustnosti v daných rozpouštědlech, acidobazických vlastnostech (hodnota pK_a), stabilitě analytu. ^[22]

Amiodaron hydrochlorid je malá ($MW = 681,77 \text{ g/mol}$), nepolární látka ($\log P = 7,64$) z čehož vyplývá, že lze využít HPLC na reverzních fázích, tedy nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Nejčastěji používaná nepolární stacionární fáze je na silikagelu navázaná skupina C18. Amiodaron je dobře rozpustný v metanolu a dichlormethanu, avšak těžce rozpustný ve vodě a hexanu. Jako mobilní fázi lze použít acetonitril nebo metanol. Acetonitril má oproti metanolu větší eluční sílu a získáme tak ostřejší tvar píků. Další výhodou acetonitrilu je kratší doba analýzy. ^[1,10]

Molekula amiodaronu obsahuje systém konjugovaných dvojných vazeb, který tvoří tzv. chromofor. Chromofor je důležitý pro to, aby látka absorbovala záření v UV nebo viditelné oblasti spektra. Z tohoto důvodu lze pro detekci využít detektor vybavený diodovým polem. Tento detektor se vyznačuje relativně velkou selektivitou a citlivostí.

K hodnocení výsledků analýz je vhodný vnitřní standard dronedaron, který je svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobný amiodaronu, ale je detekovaný v jiném retenčním čase. Současně je výhodný jako kontrola při přípravě vzorku.

Tab. 2 Metody stanovení amiodaronu a desethylamiodaronu pomocí HPLC uváděné v literatuře

<i>Citace</i>	<i>Materiál</i>	<i>Úprava vzorku</i>	<i>Detekce</i>	<i>MF</i>	<i>SF</i>	<i>Kolona</i>	<i>Průtok MF (ml/min)</i>	<i>Vnitřní standard</i>
[25]	Lidská plazma	Precipitace acetonitrilem	UV detekce (242 a 247 nm)	Acetonitril/octan amonný (pH 3,5) (60:40)	5 μm C18	250 × 4,6 mm	1	etoricoxib
[24]	Lidské sérum	Extrakce na pevné fázi	UV detekce (254 nm)	Acetonitril/fosfátový pufr (pH 3,5) (62:38)	5 μm C18	150 × 3,2 mm	0,9	L8040*
[12]	Lidská plazma nebo sérum	Extrakce methyl-t-butyl-etherem	UV detekce (242 nm)	Acetonitril/metanol/octan amonný (40:56:3)	a) 3 μm Phenosphere Cyano b) 3 μm Plantinum Cyano	a) 50 × 4,6 mm b) 33 × 7,0 mm	a) 0,9 b) 3	L8040*
[26]	Kryší plazma a tkáň	Extrakce kapalina-kapalina	UV detekce (254 nm)	Fosfátový pufr s kyselinou mravenčí/metanol/acetonitril (pH 3,1) (45:5:50)	3 μm C18	55 × 4 mm	1,2	tamoxifen

* [2-ethyl-3-(3,5-dibromo-4-di-n-propylaminopropoxybenzoyl)benzothiophene

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je zavedení kvantitativního stanovení amiodaronu a jeho metabolitu desethylamiodaronu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s využitím vnitřního standardu dronedaronu a ověřit její použití při analýze vzorků pacientů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, biologický materiál, pomůcky a přístroje

4.1.1 Chemikálie

amiodarone hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA), čistota 98 %
dronedarone hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA), čistota 98 %
dihydrogenfosforečnan draselný (Merck Darmstadt, Německo), p.a.
kyselina fosforečná 83% (Merck Darmstadt, Německo), p.a.
síran zinečnatý (Merck Darmstadt, Německo), p.a.
acetonitril pro HPLC
destilovaná voda
ultračistá voda

4.1.2 Biologický materiál

Směsné sérum získané od zdravých dobrovolníků uchovávané při teplotě -20 °C, vzorky sér pacientů užívajících amiodaron, kontrolní lyofilizovaná plasma ClinCheck Controls (Recipe, Německo) level 1 a level 2, Serum Calibration Standard Amiodarone/Desethylamiodarone (Chromsystems, Německo)

4.1.3 Pomůcky

laboratorní sklo
- odměrné baňky, zkumavky, kádinky, nálevka
automatické pipety (Thermo Scientific, USA)
parafilm
vialky
membrána typu HA (Merck Millipore, Německo)
GHP membrána (47 mm, 0,45 μm, Gelman Sciences, USA)
zkumavky (Eppendorf, Německo)

4.1.4 Přístroje

kapalinový chromatograf UHPLC Nexera (Shimadzu, Japonsko) - moduly viz kap. 4.3

ultrazvuková lázeň (ECOSON Ultrasonic Engineering)

analytické váhy (RADWAG XA 82/220/Y)

filtrační zařízení (CHROMSERVIS, Vacc-space 50)

laboratorní třepačka VXR basic Vibrax (IKA, Německo)

pH-metr sensION+ MM374 (Hach Company, USA)

centrifuga CENTRIFUGE 5424 R (Eppendorf, Německo)

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava roztoků

1. Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu dronedaronu: 1 mg dronedaronu hydrochloridu byl rozpuštěn v 2 ml metanolu. (897 $\mu\text{mol/l}$)
Zásobní roztok vnitřního standardu dronedaronu má stabilitu 6 měsíců při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu dronedaronu: 100 μl zásobního roztoku vnitřního standardu dronedaronu bylo naředěno 20 ml metanolu. (4,46 $\mu\text{mol/l}$)
Naředěný roztok vnitřního standardu v metanolu má stabilitu 3 měsíce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Příprava roztoku 10% síranu zinečnatého: 1g síranu zinečnatého byl rozpuštěn v 10 ml H_2O . Doba uchování je maximálně 1 měsíc při teplotě $4 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Příprava kontrolních roztoků

K přípravě kontrolních roztoků byl použit kontrolní materiál ClinCheck Controls (Recipe), což je lyofilizovaná kontrolní plazma s deklarovaným obsahem amiodaronu a desethylamiodaronu. K lyofilizátu byly pipetovány 3 ml destilované vody a za občasného míchání se nechal 30 minut rozpouštět, až byl vzorek čirý.

Lyofilizát byl uchováván při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ za nepřístupu světla do doby expirace a rozpuštěný lyofilizát při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 měsíců.

4.2.3 Příprava kalibračního roztoku

Ke kalibraci byl využit sérový kalibrační standard (Serum Calibration Standard Amiodarone/Desethylamiodarone, Chromsystems). K lyofilizovanému séru byl přidán 1 ml destilované vody, poté se nechal v temnu rozpustit, dokud nebyl homogenní. Kalibrátor byl následně ředěn tak, že ke 250 μ l kalibrátoru bylo přidáno 250 μ l blankového séra.

Lyofilizát je stabilní při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby expirace. Rozpuštěný je stabilní 3 měsíce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Zpracování vzorků pacientů a kontrolních materiálů

Do zkumavek bylo pipetováno 500 μ l séra a 20 μ l 10% roztoku síranu zinečnatého. Síran zinečnatý se přidává z důvodu zlepšení precipitace proteinů ze séra, které by se jinak vysrážely na koloně chromatografu díky použité mobilní fázi - acetonitrilu. Po přidání síranu zinečnatého byly vzorky mírně zamíchány na třepače a poté bylo přidáno 1000 μ l roztoku acetonitrilu (gradient grade) s vnitřním standardem dronedaronem. Vzorky nesmí dlouho stát, protože pak dochází k sorpci na precipitát a k odpařování.

Následně byly zkumavky uzavřeny a nechány třepat 5 minut intenzivně na třepače. Po řádném protřepání byly vzorky vloženy do centrifugy na 10 minut, centrifugace probíhala při 15000 otáčkách/minutu a teplotě $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci bylo dávkováno 150 μ l supernatantu do insertu pro nástřík na kolonu.

4.3 Chromatografické podmínky

Kapalinový chromatograf:

UHPLC NEXERA, Shimadzu (Japonsko) je tvořen chlazeným dávkovačem (typ SIL-30AC), vysokotlakými pumpami (typ LC-30AD) s degaséry (typ DGU-20A), detektorem s diodovým polem (typ SPD-M30A), kolonou umístěnou v termostátovém kolonovém prostoru (CTO-20A) a softwarem LabSolutions. Viz příloha 1a.

Kolona:

Byla použita kolona SYMMETRY C18 150 × 4,6 mm, 5 μm (WATERS, USA) s předkolonou SYMMETRY C18 20 × 3,9 mm (WATERS, USA).

Mobilní fáze:

Mobilní fáze byla tvořena roztokem fosfátového pufru o pH 3,1 a koncentraci 50 mM a acetonitrilem v poměru 1:1.

Příprava pufru pro mobilní fázi: 3,2 g KH_2PO_4 (Merck, p.a.) a 200 μl 83% H_3PO_4 (Merck, p.a.) bylo rozpuštěno v 1000 ml H_2O v odměrné baňce. Po promíchání roztoku bylo změřeno pH (kolem 3,1). Pokud bylo pH vyšší, byla nutná korekce po 20 μl H_3PO_4 . Následně byla provedena filtrace na membráně typu HA (MILLIPORE) a odvzdušnění pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut. Pufř byl uchováván maximálně 3 dny při teplotě 4 – 8 °C.

Fosfátový pufř byl následně smíchán s acetonitrilem v poměru 1:1 a byla provedena filtrace přes GPH membránu (47 mm; 0,45 μm, GELMAN SCIENCES). Poté byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně na 15 minut z důvodu odvzdušnění.

Další HPLC podmínky:

Na kolonu se dávkovačem aplikovalo 40 μl vzorku.

Separace probíhala za isokratického průtoku 1,4 ml/min. při teplotě 45 °C.

Detektor:

K detekci byl použit detektor vybavený diodovým polem (DAD), který umožňuje snímání spekter v rozsahu 200 – 600 nm s rozlišením 1,2 nm.

Amiodaron byl kvantifikován při vlnové délce 242 nm.

Podmínky kvantifikace:

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí jednobodové kalibrace s využitím vnitřního standardu a odečtu z výšky píků programem LabSolutions.

4.4 Testování validačních parametrů

4.4.1 Mez detekce (LOD)

Mez detekce byla zjištěna ze šumu základní linie na detektoru při analýze 10 slepých vzorků. U každého vzorku byl změřen šum základní linie v oblasti retenčního času amiodaronu a desethylamiodaronu a vypočtena mez detekce podle vzorce. Mez detekce byla vypočtena jako průměr z jednotlivých naměřených hodnot LOD.

Jako slepý vzorek bylo použito sérum od dárců z transfuzní služby. Séra byla zpracována stejným způsobem jako vzorky pacientů.

Vzorec pro výpočet detekčního limitu:

$$LOD = 3 \cdot (SD / S)$$

SD ... směrodatná odchylka šumu základní linie

S ... směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci analytu

4.4.2 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Pro zjištění meze stanovitelnosti lze použít dva způsoby. První způsob vychází ze stanovení 10 vzorků lyofilizované kontrolní plasmy level 1 (ClinCheck Controls, Recipe) s obsahem amiodaronu 1,20 $\mu\text{mol/l}$ a desethylamiodaronu 1,33 $\mu\text{mol/l}$, které byly ředěny 10 \times blankovým sérem a dále zpracovány jako vzorky pacientů. Po naředění byla tedy koncentrace amiodaronu 0,12 $\mu\text{mol/l}$ a desethylamiodaronu 0,133 $\mu\text{mol/l}$. Z naměřených hodnot byl spočítán průměr, variační koeficient a výtěžnost.

Druhý způsob zjištění meze stanovitelnosti vychází z následující rovnice:

$$LOQ = 3 \cdot LOD$$

4.4.3 Linearita a pracovní rozsah

Pro určení linearity a pracovního rozsahu byl připraven zásobní roztok standardu amiodaronu, jehož následným ředěním bylo získáno 5 kalibračních roztoků o koncentracích 0,39 $\mu\text{mol/l}$, 2,58 $\mu\text{mol/l}$, 3,88 $\mu\text{mol/l}$, 5,17 $\mu\text{mol/l}$, 7,75 $\mu\text{mol/l}$. Kalibrační roztoky byly následně zpracovány jako vzorky pacientů.

Metodou nejmenších čtverců byla provedena lineární regrese v rozsahu koncentrací 0,39 – 7,75 $\mu\text{mol/l}$. Ke zpracování dat byl použit software LabSolutions.

Z důvodu nedostupnosti standardu desethylamiodaronu od společnosti Sanofi byly hodnoty linearity pro desethylamiodaron získány z dříve provedené validace metody stanovení amiodaronu a jeho metabolitu pomocí HPLC.

K určení linearity metody pro desethylamiodaron byl připraven zásobní roztok, jehož následným ředěním bylo získáno 5 kalibračních roztoků o koncentracích 0,52 μmol/l, 1,3 μmol/l, 2,6 μmol/l, 5,2 μmol/l, 7,79 μmol/l. Lineární regrese byla vypočtena v rozsahu koncentrací 0,52 – 7,79 μmol/l metodou nejmenších čtverců pomocí software LabSolutions.

K hodnocení linearity se využívá korelační koeficient r , jehož hodnota by neměla klesnout pod 0,98.

Pracovní rozsah je dán mezi stanovitelnosti (LOQ) a nejvyšším kalibračním bodem.

4.4.4 Preciznost

Preciznost byla zjišťována jako opakovatelnost (v sérii) a mezilehlá preciznost (mezi sériemi) a hodnocena jako variační koeficient (CV). Variační koeficient by neměl přesáhnout 15 %, kromě LOQ, kde je povoleno 20 % (viz doporučení FDA).

Výpočet variačního koeficientu:

$$CV = (SD / x) \cdot 100 (\%)$$

Opakovatelnost byla stanovena pomocí kontrolních materiálů ClinCheck Controls (Recipe) level 1 s deklarovanou hodnotou pro amiodaron 1,20 μmol/l a desethylamiodaron 1,33 μmol/l a level 2 s deklarovanou hodnotou pro amiodaron 4,97 μmol/l a desethylamiodaron 5,45 μmol/l. Pro každou hladinu bylo připraveno 10 vzorků, které byly následně zpracovány jako vzorky pacientů.

Mezilehlá preciznost byla zjištěna z vyhodnocených analýz kontrolních materiálů ClinCheck Controls (Recipe) level 1 a level 2 za období 3 měsíců.

4.4.5 Výtěžnost (recovery) a relativní bias (accuracy)

Výtěžnost a relativní bias byly určeny pomocí stejného kontrolního materiálu jako preciznost, tedy pomocí ClinCheck Controls (Recipe) level 1 a 2. Kontrolní materiál byl zpracován stejně jako vzorky pacientů. Jako přijatá referenční hodnota byla uvažována střední hodnota uvedená výrobcem (viz. Odst. 4.4.4).

Výpočet bias:

$$bias = (x - x_D) / x_D \cdot 100 (\%)$$

Výpočet výtěžnosti R :

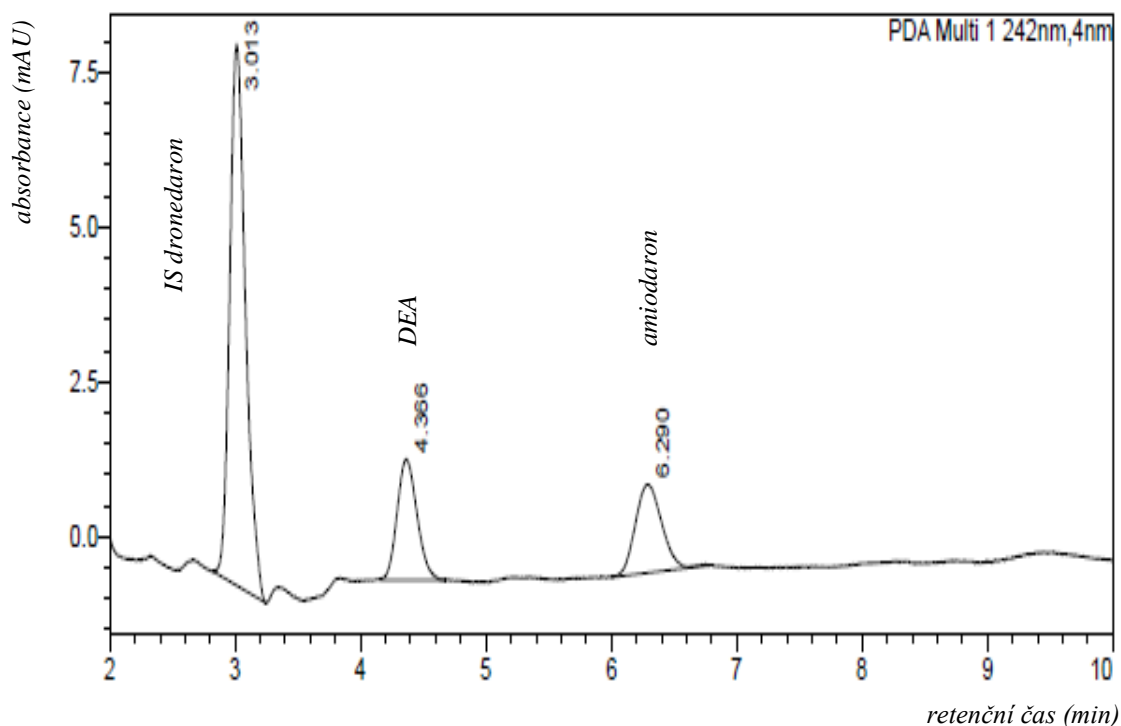
$$R = x / x_D \cdot 100 (\%)$$

x ... nalezená průměrná koncentrace látky ve vzorku

x_D ... koncentrace látky udaná výrobcem

5 VÝSLEDKY

5.1 Chromatografické záznamy

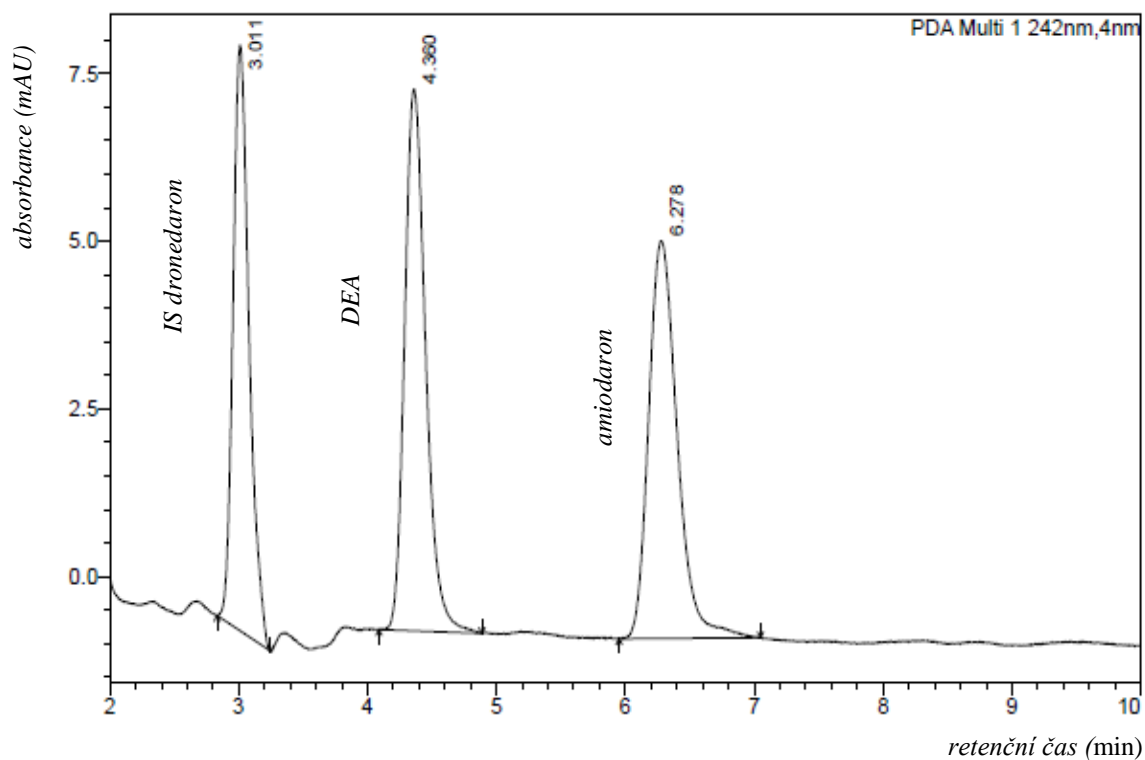


Obr. 7 Chromatogram kontrolní plasmy level 1

Na Obr. 7 je znázorněn chromatografický záznam extraktu kontrolní plasmy ClinCheck Controls level 1 s obsahem amiodaronu (1,185 $\mu\text{mol/l}$), desethylamiodaronu (1,259 $\mu\text{mol/l}$) a vnitřního standardu dronedaronu (4,46 $\mu\text{mol/l}$).

Na kolonu bylo dávkováno 40 μl vzorku a analýza probíhala při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,4 ml/min a vlnové délce 242 nm.

Retenční čas amiodaronu je 6.290 min, desethylamiodaronu 4.366 min a vnitřního standardu dronedaronu 3.013 min.

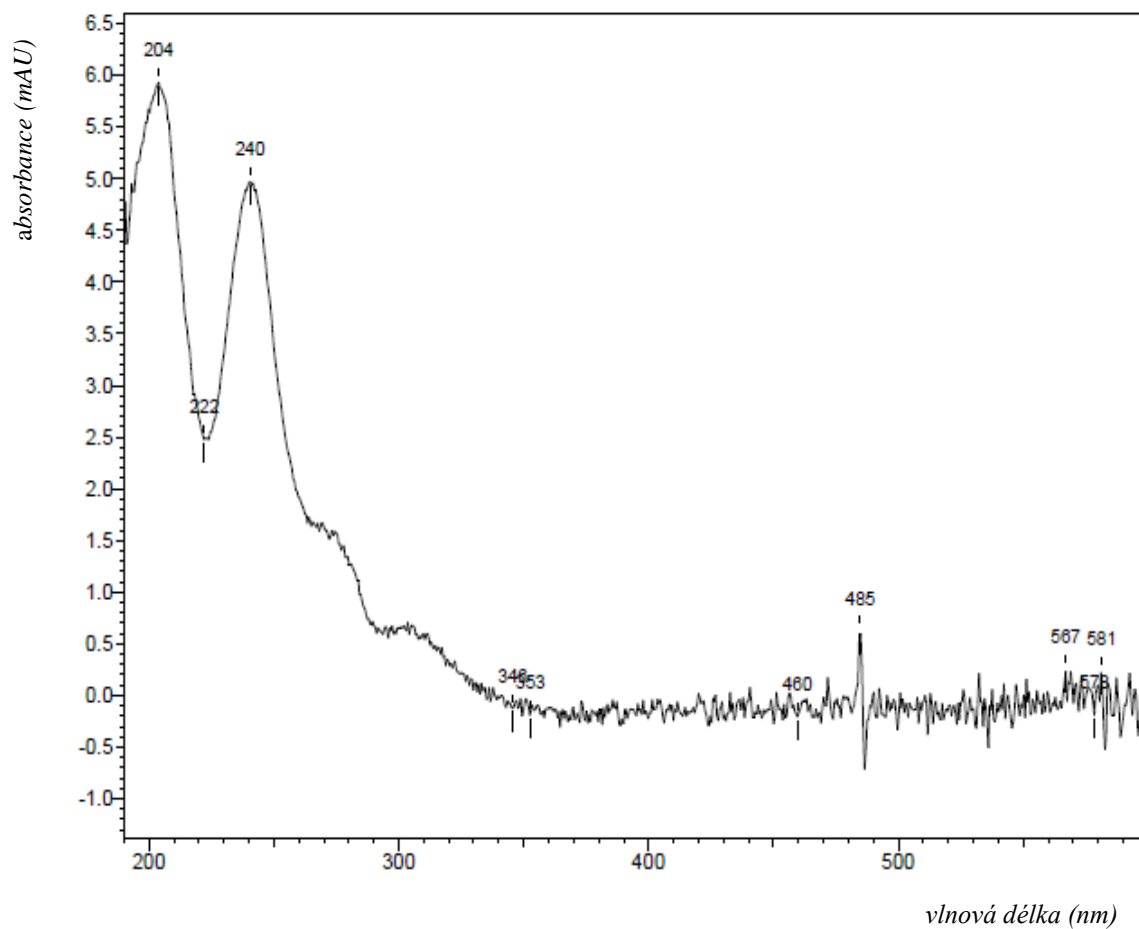


Obr. 8 Chromatogram kontrolní plasmy level 2

Na Obr. 8 je znázorněn chromatografický záznam extraktu kontrolní plasmy ClinCheck Controls level 2 s obsahem amiodaronu (4,955 $\mu\text{mol/l}$), desethylamiodaronu (5,228 $\mu\text{mol/l}$) a vnitřního standardu dronedaronu (4,46 $\mu\text{mol/l}$).

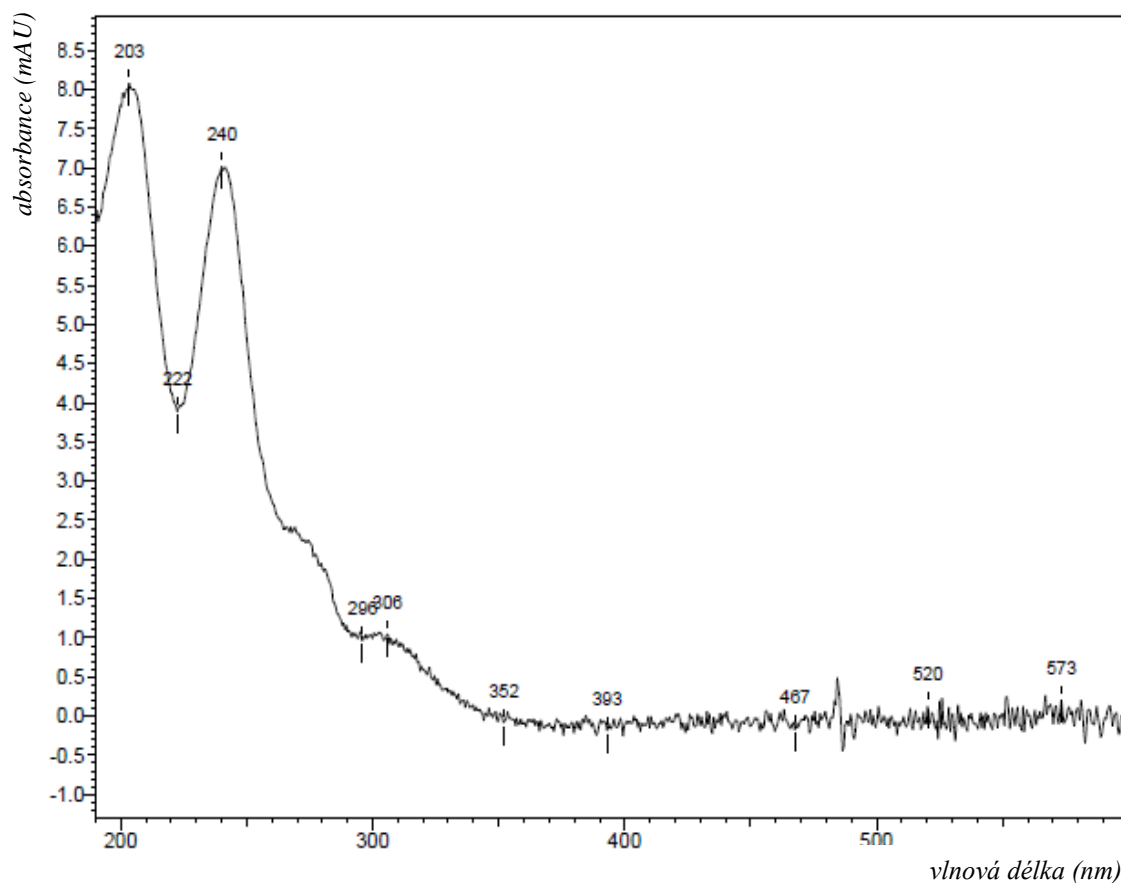
Na kolonu bylo dávkováno 40 μl vzorku a analýza probíhala při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,4 ml/min a vlnové délce 242 nm.

Retenční čas amiodaronu je 6.278 min, desethylamiodaronu 4.360 min a vnitřního standardu dronedaronu 3.011 min.



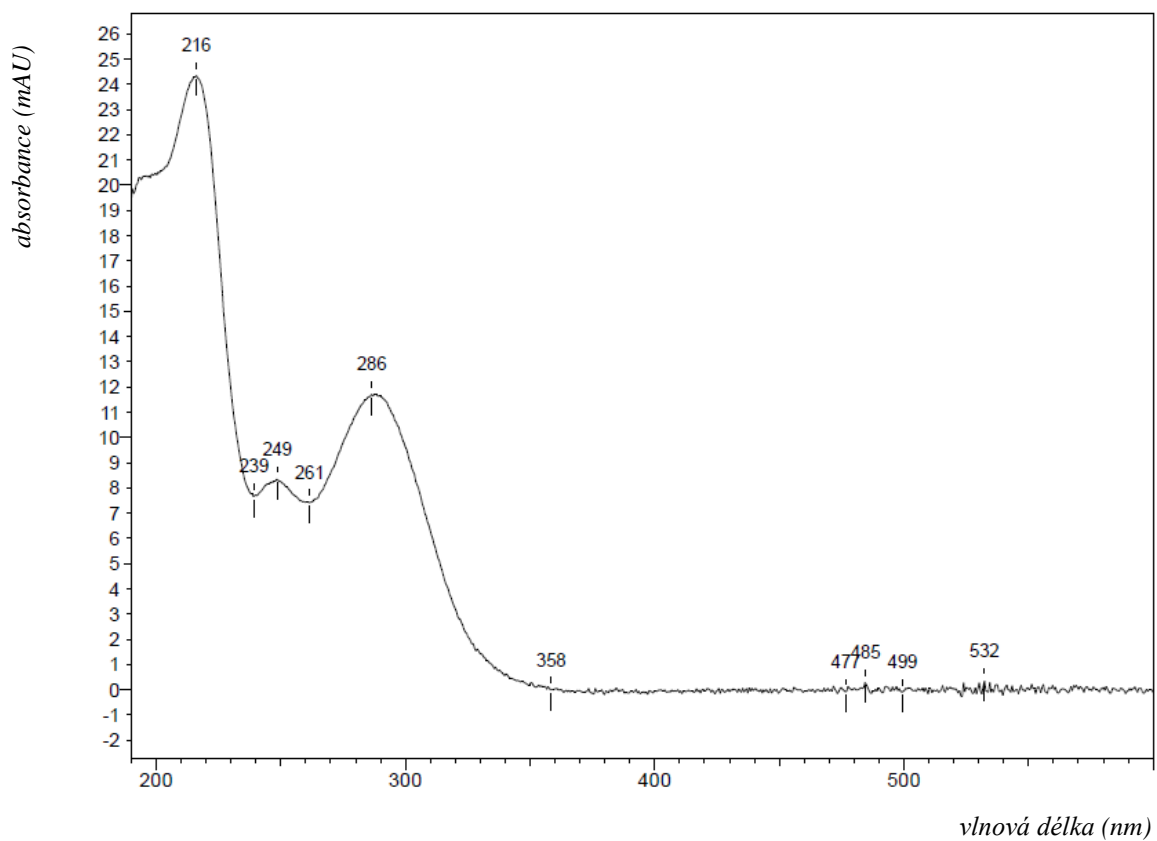
Obr. 9 Spektrum amiodaronu

Na Obr. 9 je vyobrazeno spektrum standardu amiodaronu o koncentraci 4,955 $\mu\text{mol/l}$. Spektrum bylo snímáno v rozsahu vlnových délek 200 - 600 nm s rozlišením 1,2 nm.



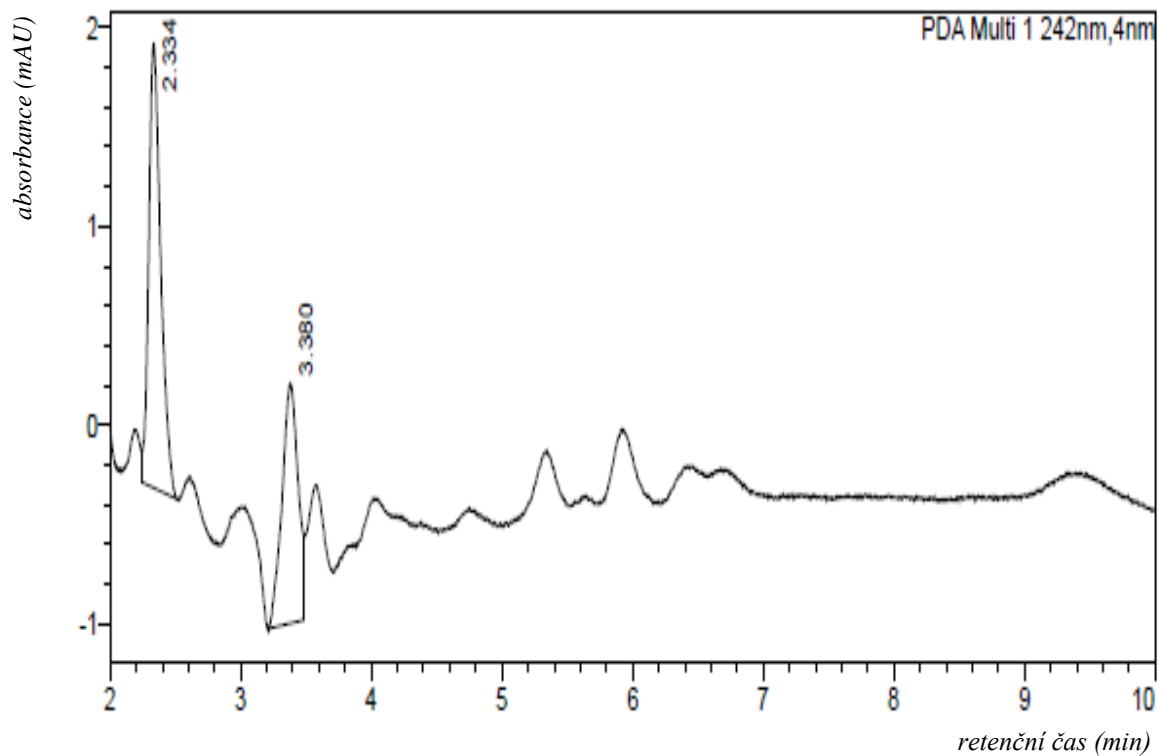
Obr. 10 Spektrum desethylamiodaronu

Na Obr. 10 je vyobrazeno spektrum standardu desethylamiodaronu o koncentraci 5,228 $\mu\text{mol/l}$. Spektrum bylo snímáno v rozsahu vlnových délek 200 - 600 nm s rozlišením 1,2 nm.



Obr. 11 Spektrum dronedaronu

Na Obr. 11 je vyobrazeno spektrum vnitřního standardu dronedaronu o koncentraci 4,46 $\mu\text{mol/l}$. Spektrum bylo snímáno v rozsahu vlnových délek 200-600 nm s rozlišením 1,2 nm.



Obr. 12 Chromatogram blanku bez IS

Na Obr. 12 je znázorněn chromatografický záznam extraktu blankové plasmy bez přítomnosti amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu dronedaronu.

Na kolonu bylo dávkováno 40 μl vzorku a analýza probíhala při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,4 ml/min a vlnové délce 242 nm.

Chromatogram dokládá nepřítomnost interferujících komponent v oblasti retenčních časů stanovovaných analytů.

5.2 Validační parametry

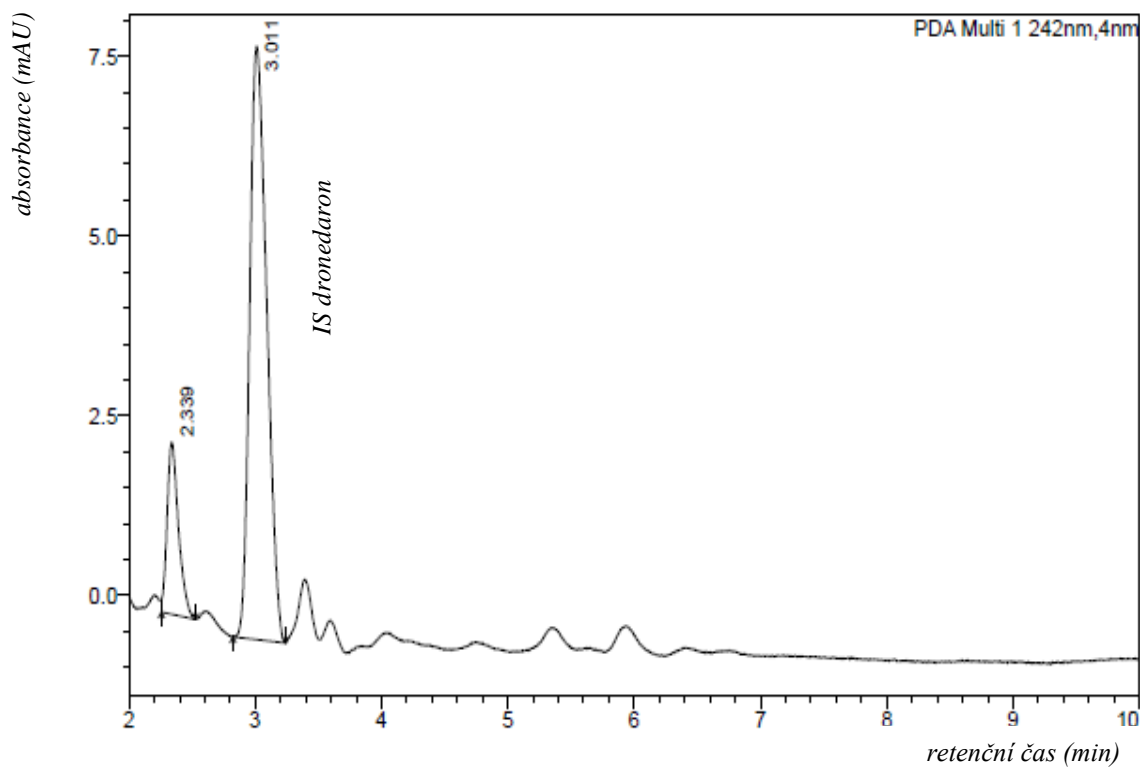
5.2.1 Mez detekce (LOD)

Mez detekce zjištěná ze šumu základní linie na detektoru byla experimentálně zjištěna pro amiodaron 0,0613 $\mu\text{mol/l}$ a pro jeho metabolit desethylamiodaron 0,048 $\mu\text{mol/l}$.

LOD byla vypočtena pro každý vzorek zvlášť (viz Příloha 2a) a následně byl získán průměr ze všech měření. Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 3.

Tab. 3 Hodnoty LOD pro jednotlivé slepé vzorky vypočítané ze šumu, jejich průměr a SD

<i>Analyt</i>	<i>Počet měření n</i>	<i>Průměr z naměřených hodnot šumu ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>Směrodatná odchylka SD</i>
<i>Amiodaron</i>	<i>n = 10</i>	<i>0,0613</i>	<i>0,0134</i>
<i>Desethylamiodaron</i>	<i>n = 10</i>	<i>0,048</i>	<i>0,0096</i>



Obr. 13 Chromatogram blanku s IS

Na Obr. 13 je znázorněn chromatografický záznam extraktu blankové plasmy obsahující vnitřní standard dronedaron o koncentraci 4,46 $\mu\text{mol/l}$.

Na kolonu bylo dávkováno 40 μl vzorku a analýza probíhala při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,4 ml/min a vlnové délce 242 nm.

Retenční čas vnitřního standardu dronedaronu je 3.011 min.

5.2.2 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Experimentálně zjištěná mez stanovitelnosti pro amiodaron má hodnotu 0,130 $\mu\text{mol/l}$ (CV= 7,69 %, R = 108,33 %) a pro desethylamiodaron hodnotu 0,133 $\mu\text{mol/l}$ (CV = 7,69 %, R = 100 %). Obě hodnoty meze stanovitelnosti vyhovují požadavkům FDA a EMEA.

Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků jsou zaznamenány v Příloze 2b.

Tab. 4 Průměr z naměřených hodnot, směrodatná odchylka a parametry preciznosti a výtěžnosti pro LOQ

Analyt	Teoretická konc. ($\mu\text{mol/l}$)	Počet měření n	Průměr z naměřených hodnot ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznost CV (%)	Vychýlení bias (%)	Výtěžnost R (%)
Amiodaron	0,120	$n = 10$	0,130	0,01	7,69	8,33	108,33
DEA	0,133	$n = 10$	0,133	0,01	7,519	0	100

Následně byla mez stanovitelnosti vypočtena z hodnot meze detekce:

Pro amiodaron: $\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD} = 3 \cdot 0,0613 = 0,184 \mu\text{mol/l}$

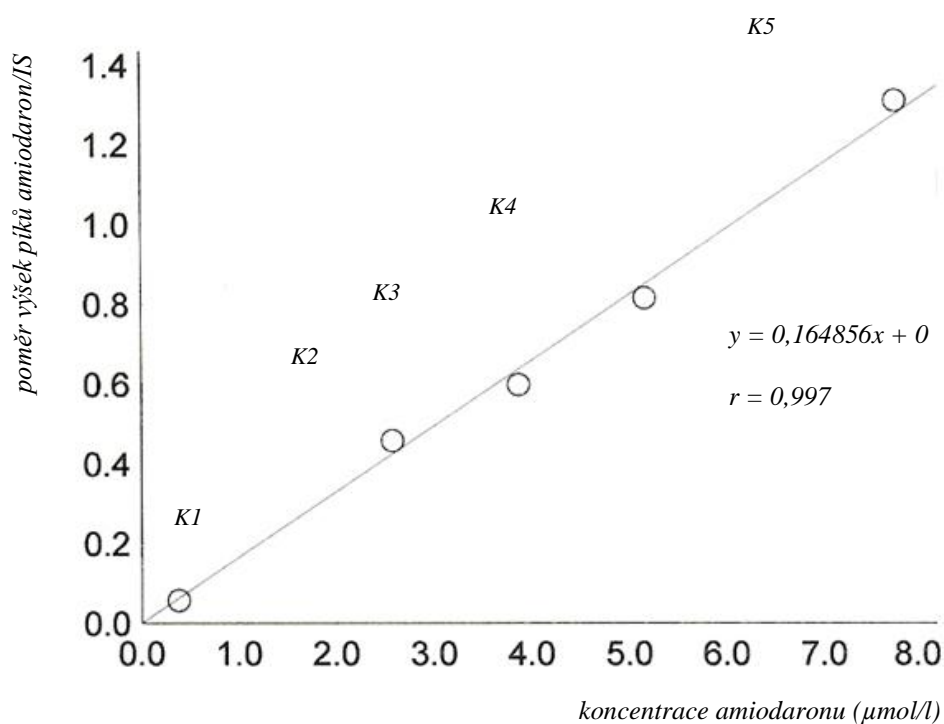
Pro desethylamiodaron: $\text{LOQ} = 3 \cdot \text{LOD} = 3 \cdot 0,048 = 0,144 \mu\text{mol/l}$

5.2.3 Linearita a pracovní rozsah

Metoda je lineární v koncentračním rozmezí 0,39 – 7,75 $\mu\text{mol/l}$ pro amiodaron a v koncentračním rozmezí 0,52 – 7,79 $\mu\text{mol/l}$ pro desethylamiodaron.

Pro amiodaron byla sestavena regresní přímka s rovnicí $y = 0,164856x + 0$ a korelačním koeficientem $r = 0,997$ a pro metabolit desethylamiodaron byla sestrojena regresní přímka s rovnicí $y = 1760x - 87,7$ a $r = 0,9989$.

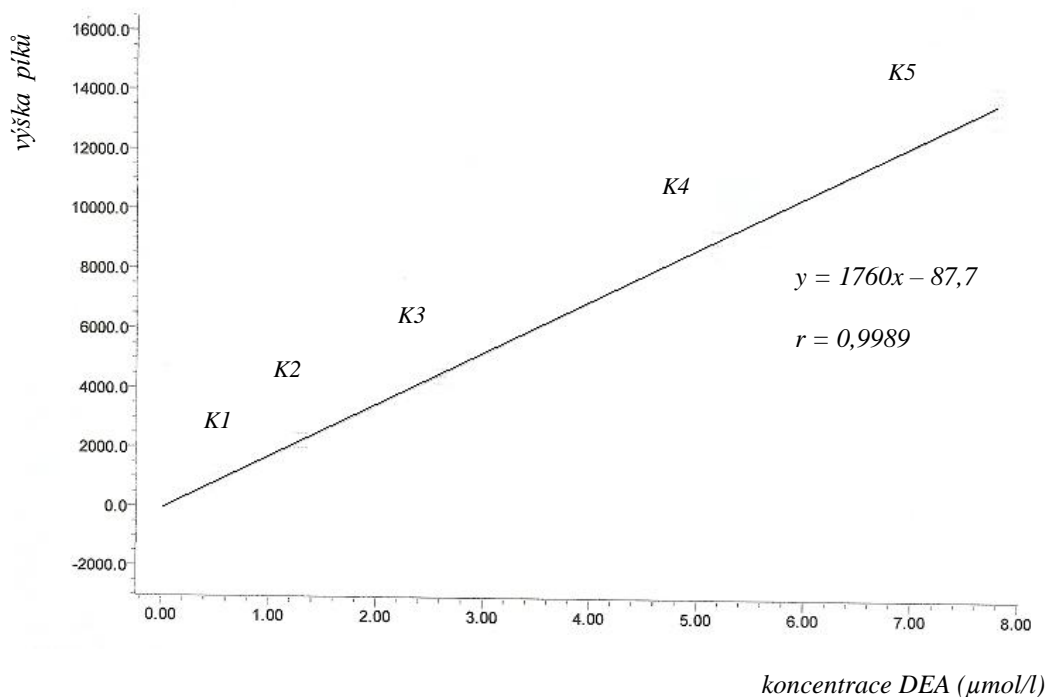
Kalibrační křivka pro amiodaron byla sestrojena jako závislost poměru výšek pík analyzované látky a vnitřního standardu na koncentraci analytu v analyzovaných vzorcích. Pomocí regresní přímky byla prokázána linearita.



Obr. 14 Kalibrační křivka – stanovení amiodaronu

Pracovní rozsah je dán mezi stanovitelnosti (LOQ) a nejvyšším kalibračním bodem a odpovídá koncentračnímu rozmezí 0,13 $\mu\text{mol/l}$ – 7,75 $\mu\text{mol/l}$.

Kalibrační křivka pro desethylamiodaron byla sestrojena jako závislost výšky píku na koncentraci analytu ve vzorku. Pomocí regresní přímky byla prokázána linearita.



Obr. 15 Kalibrační křivka – stanovení desethylamiodaronu

Pracovní rozsah je dán mezi stanovitelnosti (LOQ) a nejvyšším kalibračním bodem a odpovídá koncentračnímu rozmezí 0,133 μmol/l – 7,79 μmol/l.

V Tab. 5 a 6 jsou zaznamenány naměřené koncentrace jednotlivých kalibračních bodů, jejich průměry, teoretické hodnoty, preciznost a výtěžnost měření.

FDA doporučuje pro nejnižší a nejvyšší kalibrační bod hodnoty preciznosti do 20 % a pro hodnoty mezi těmito body pak do 15 %. Tato kritéria jsou splněna.

Tab. 5 Naměřené koncentrace amiodaronu v jednotlivých vzorcích, teoretické hodnoty, preciznost a výtěžnost měření

Vzorek	Počet měření	Naměřená hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	Teoretická hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznost CV (%)	Výtěžnost R (%)
K1	1	0,349	0,348	0,388	0,743	89,755
	2	0,344				
	3	0,351				
	4	0,349				
K2	1	2,878	2,782	2,583	3,733	107,704
	2	2,831				
	3	2,638				
	4	*				
K3	1	3,675	3,634	3,875	0,940	93,768
	2	3,647				
	3	3,581				
	4	3,631				
K4	1	5,100	4,949	5,167	3,911	95,781
	2	4,938				
	3	5,121				
	4	4,637				
K5	1	8,407	7,952	7,750	5,737	102,600
	2	7,514				
	3	7,477				
	4	8,408				

* z technických důvodů se vzorek nezměřil

Tab. 6 Naměřené koncentrace DEA v jednotlivých vzorcích, teoretické hodnoty, preciznost a výtěžnost měření

Vzorek	Počet měření	Naměřená hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	Teoretická hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznost CV (%)	Výtěžnost R (%)
K1	1	0,54	0,54	0,52	4,54	103,8
	2	0,51				
	3	0,57				
K2	1	1,33	1,34	1,3	0,70	103,3
	2	1,35				
	3	1,35				
K3	1	2,60	2,54	2,6	2,99	97,6
	2	2,43				
	3	2,58				
K4	1	5,27	5,17	5,2	2,25	99,5
	2	5,01				
	3	5,24				
K5	1	7,91	7,82	7,79	2,78	100,4
	2	7,52				
	3	8,03				

5.2.4 Parametry preciznosti, výtěžnosti (recovery) a vychýlení (bias)

Preciznost byla vyjádřena variačním koeficientem vypočteným pro každou hladinu a analyzovanou látku zvlášť.

Výsledky preciznosti v sérii a mezi sériemi pro amiodaron a desethylamiodaron splňují doporučení FDA, nepřekračují hodnotu variačního koeficientu 15 %.

Výtěžnost (recovery) byla stanovena také v sérii a mezi sériemi, jejíž hodnoty rovněž splňují kritéria FDA, spadají do intervalu 80 – 120 %.

Vychýlení (bias) bylo vypočítáno u výsledků získaných za podmínek opakovatelnosti (v sérii).

Výsledky stanovení preciznosti v sérii a mezi sériemi, výtěžnosti a vychýlení (bias) jsou shrnuty v Tab. 7 a 8.

Tab. 7 Preciznost, výtěžnost a bias metody v sérii na koncentrační hladině level 1a level 2 u kontrolních materiálů ClinCheck Controls (Recipe, Německo)

ClinCheck Controls	Počet měření <i>n</i> v sérii	Teoretická konc. ($\mu\text{mol/l}$)	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	S_D ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznost CV (%)	Vychýlení bias (%)	Výtěžnost R (%)
Amiodaron level 1	<i>n</i> = 10	1,20	1,15	0,04	3,48	- 4,17	95,83
DEA level 1	<i>n</i> = 10	1,33	1,34	0,03	2,24	0,75	100,75
Amiodaron level 2	<i>n</i> = 10	4,97	4,83	0,07	1,45	- 2,82	97,18
DEA level 2	<i>n</i> = 10	5,45	5,28	0,06	1,14	- 3,12	96,88

Tab. 8 Preciznost a výtěžnost metody mezi sériemi na koncentrační hladině level 1a level 2 u kontrolních materiálů ClinCheck Controls (Recipe, Německo)

ClinCheck Controls Šarže 128	Počet měření <i>n</i> mezi sériemi	Teoretická konc. ($\mu\text{mol/l}$)	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznost CV (%)	Výtěžnost R (%)
Amiodaron level 1	<i>n</i> = 21	1,26	1,18	0,08	6,63	93,65
DEA level 1	<i>n</i> = 21	1,35	1,45	0,13	8,75	107,41
Amiodaron level 2	<i>n</i> = 21	5,14	4,72	0,27	5,82	91,83
DEA level 2	<i>n</i> = 21	5,50	5,80	0,46	7,85	105,45

5.3 Porovnání výsledků analýzy amiodaronu a jeho metabolitu v séru

K vyhodnocování výsledků po chromatografické analýze je možné použít různé metody. Jedna z možností je použít vnitřní standard. Technika vnitřního standardu byla využita při zavádění metody na stanovení amiodaronu a jeho metabolitu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Je to metoda, kdy se ke vzorku přidá známé množství látky – tzv. vnitřního standardu (IS). Porovnávají se poměry odezvy analytu a přidaného vnitřního standardu ve vzorku a kalibrátorech. Tato látka nesmí interferovat s ostatními píky ve stanovovaném vzorku. Výhodou této techniky je, že se celá analýza uskuteční v jednom nástřiku a jsou eliminovány ztráty při přípravě vzorku.

Další technikou vyhodnocování, kterou lze použít, je metoda jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací. Analyzuje se standard o známé koncentraci a hledá se závislost kalibrační funkce. Tento typ hodnocení výsledků byl dříve používán k hodnocení vzorků s amiodaronem a jeho metabolitem vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na Úseku klinické farmakologie (ÚKBD), splňoval tedy parametry ověřené validací.

Závěrem práce jsem se rozhodla pro porovnání těchto dvou metod hodnocení výsledků. Účelem porovnání bylo zjistit, zda výsledky získané jednou metodou hodnocení jsou, v průměru, totožné s výsledky získanými druhou metodou hodnocení.

K testu bylo nashromážděno 41 vzorků pacientů užívajících amiodaron, které byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vyhodnoceny pomocí vnitřního standardu dronedaronu a poté pomocí jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací. K vytvoření jednobodové kalibrační křivky byl použit Serum Calibration Standard amiodarone/desethylamiodarone. Výsledky byly zaznamenány do tabulky (viz příloha 3).

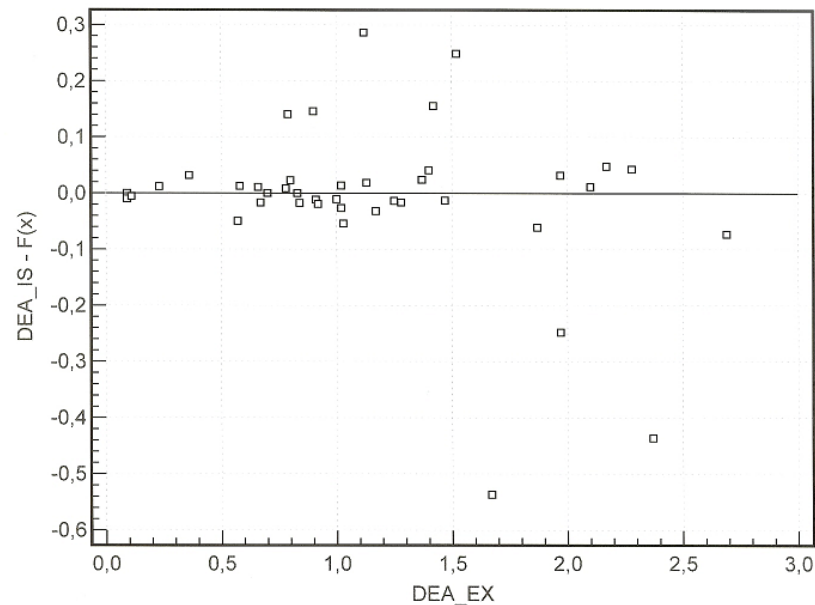
Výsledky byly porovnávány pomocí Bland-Altmanova diagramu, Passing-Bablokovy neparametrické regrese a Studentova t-testu a korelace.

5.3.1 Passing-Bablokova neparametrická regrese

Výsledky byly nejdříve porovnány pomocí Passing-Bablokovy neparametrické regrese. Tento test nevyžaduje normální rozložení dat a je velmi odolný vůči odlehlým hodnotám.

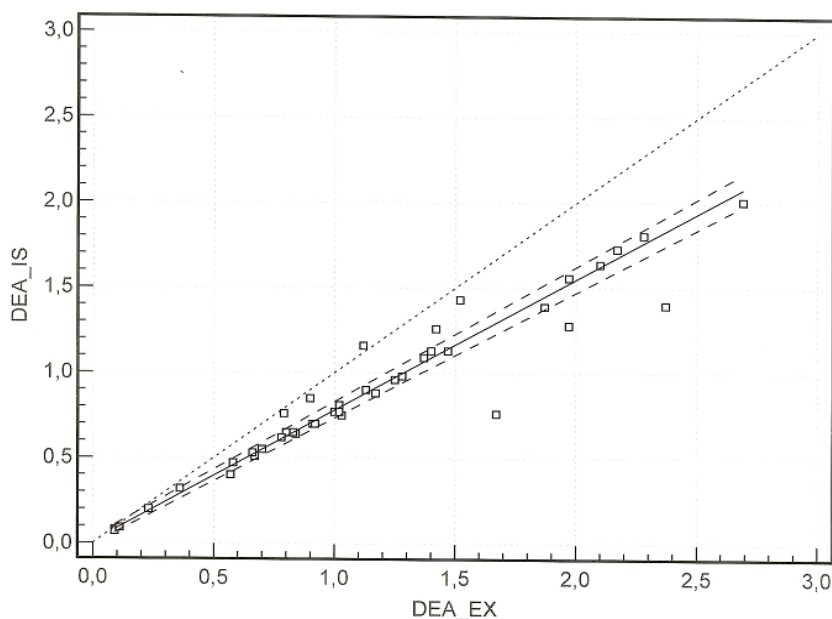
Hodnotí se, zda je sklon (směrnice) proložené přímky významně odlišný od jedničky, která odpovídá úhlu 45° a dále, zda je intercept (hodnota, ve které proložená přímka protíná osu y) významně odlišný od nuly. [5]

Na osu x byly vyneseny výsledky získané vyhodnocením pomocí kalibrační křivky s externí kalibrací a na osu y pak výsledky získané za použití vnitřního standardu dronedaronu.



Obr. 16 Passing-Bablokův diagram

Intercept, tedy hodnota, ve které je proložená přímka, protíná osu y v hodnotě 0. Výsledky obou metod hodnocení se tedy významně neliší.



Obr. 17 Passing-Bablokova regrese výsledků desethylamiodaronu

Na Obr. 17 je znázorněna Passing-Bablokova regrese pro výsledky desethylamiodaronu, z které lze vyčíst, že nedochází k významné odchylce od linearity (viz Cosum test linearity). Výsledky Passing-Bablokovy regrese jsou zachyceny v Tab. 9 a 10.

Tab. 9 Výsledky Passing-Bablokova srovnání u výsledků desethylamiodaronu

<i>Počet vzorků n = 41</i>	
<i>Výsledky DEA získané pomocí kalibrační křivky s externí kalibrací</i>	<i>Výsledky DEA získané pomocí vnitřního standardu</i>
<i>Průměr = 1,1493</i>	<i>Průměr = 0,8876</i>
<i>Medián = 1,0200</i>	<i>Medián = 0,7700</i>
<i>SD = 0,6448</i>	<i>SD = 0,4780</i>

Z výsledků srovnání je patrné, že při hodnocení pomocí vnitřního standardu vychází hodnoty desethylamiodaronu nižší v průměru o 0,26 $\mu\text{mol/l}$.

Tab. 10 Passing-Bablokova regrese pro výsledky desethylamidaronu

Rovnice regrese	$y = 0,0107 + 0,7703 x$
Systematické rozdíly	
Úsek A 95% interval spolehlivosti	0,0107 (- 0,0059 až 0,0350)
Proporcionální rozdíly	
Směrnice B 95% interval spolehlivosti	0,7703 (0,7400 až 0,7949)

Cusum test linearity:

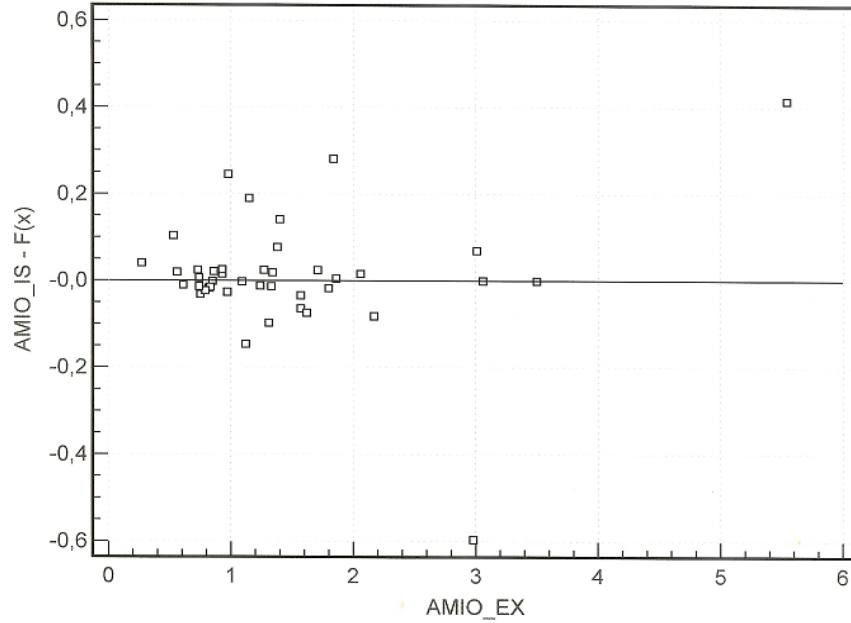
Porovnáním metod nebyla shledána významná odchylka od linearity ($p > 0,10$).

Nulová hypotéza H_0 byla stanovena tak, že neexistuje významná odchylka od linearity. Tuto hypotézu potvrzuje hodnota $p > 0,10$, která je vyšší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Při hodnocení Passing-Bablokovy regrese se zkoumá, zda 95% interval spolehlivosti splňuje následující podmínky:

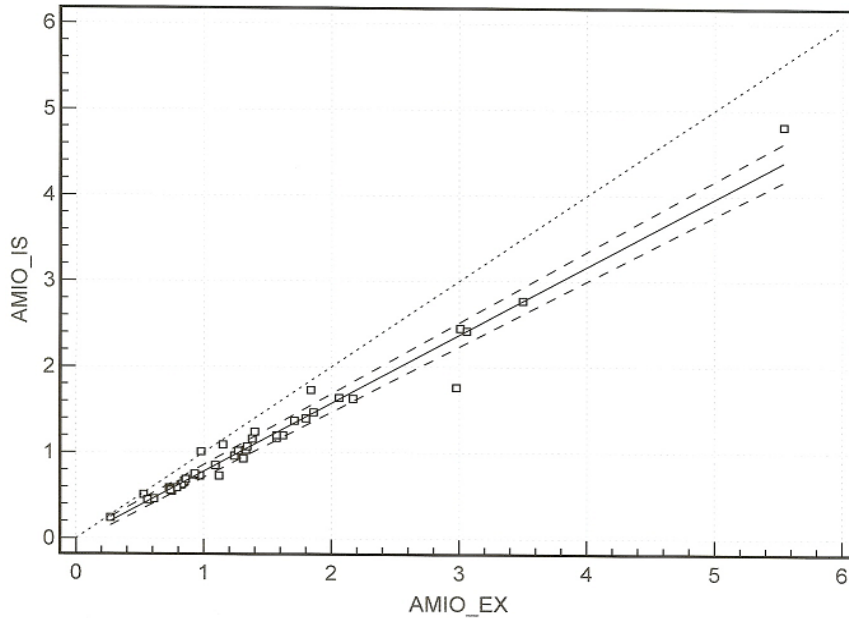
- **usek A má zahrnovat 0**
- **směrnice B má zahrnovat 1**

V případě úseku A zahrnuje 95% interval spolehlivosti 0, což znamená, že je vyloučena systematická chyba při vyhodnocování výsledků pomocí vnitřního standardu dronedaronu. Naproti tomu, 95% interval spolehlivosti u směrnice B nezahrnuje 1, což poukazuje na přítomnosti proporcionální chyby.



Obr. 18 Passing-Bablokův diagram

Intercept, tedy hodnota, ve které je proložená přímka, protíná osu y v hodnotě 0. Výsledky obou metod hodnocení se tedy významně neliší.



Obr. 19 Passing-Bablokova regrese výsledků amiodaronu

Na Obr. 19 je znázorněna Passing-Bablokova regrese pro výsledky amiodaronu, z které lze vyčíst, že nedochází k významné odchylce od linearity (viz Cosum test linearity). Výsledky Passing-Bablokovy regrese jsou zachyceny v Tab. 11 a 12.

Tab. 11 Výsledky Passing-Bablokova srovnání u výsledků amiodaronu

Počet vzorků $n = 41$	
Výsledky amiodaronu získané pomocí kalibrační křivky s externí kalibrací	Výsledky amiodaronu získané pomocí vnitřního standardu
Průměr = 1,4588	Průměr = 1,1576
Medián = 1,2400	Medián = 1,0100
SD = 0,9859	SD = 0,8141

Z výsledků srovnání je patrné, že při hodnocení pomocí vnitřního standardu vychází hodnoty amiodaronu nižší v průměru o 0,30 $\mu\text{mol/l}$.

Tab. 12 Passing-Bablokova regrese pro výsledky amiodaronu

Rovnice regrese	$y = -0,0155 + 0,7959 x$
<i>Systematické rozdíly</i>	
Úsek A 95% interval spolehlivosti	- 0,0155 (- 0,0533 až 0,0271)
<i>Proporcionální rozdíly</i>	
Směrnice B 95% interval spolehlivosti	0,7959 (0,7627 až 0,8288)

Cusum test linearity:

Porovnáním metod nebyla shledána významná odchylka od linearity ($p > 0,10$).

Nulová hypotéza H_0 byla stanovena tak, že neexistuje významná odchylka od linearity. Tuto hypotézu potvrzuje hodnota $p > 0,10$, která je vyšší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Při hodnocení Passing-Bablokovy regrese se zkoumá, zda 95% interval spolehlivosti splňuje následující podmínky:

- **usek A má zahrnovat 0**
- **směrnice B má zahrnovat 1**

V případě úseku A zahrnuje 95% interval spolehlivosti 0, což znamená, že je vyloučena systematická chyba při vyhodnocování výsledků pomocí vnitřního standardu

dronedaronu. Naproti tomu, 95% interval spolehlivosti u směrnice B nezahrnuje 1, což poukazuje na přítomnosti proporcionalní chyby při vyhodnocování výsledků pomocí vnitřního standardu.

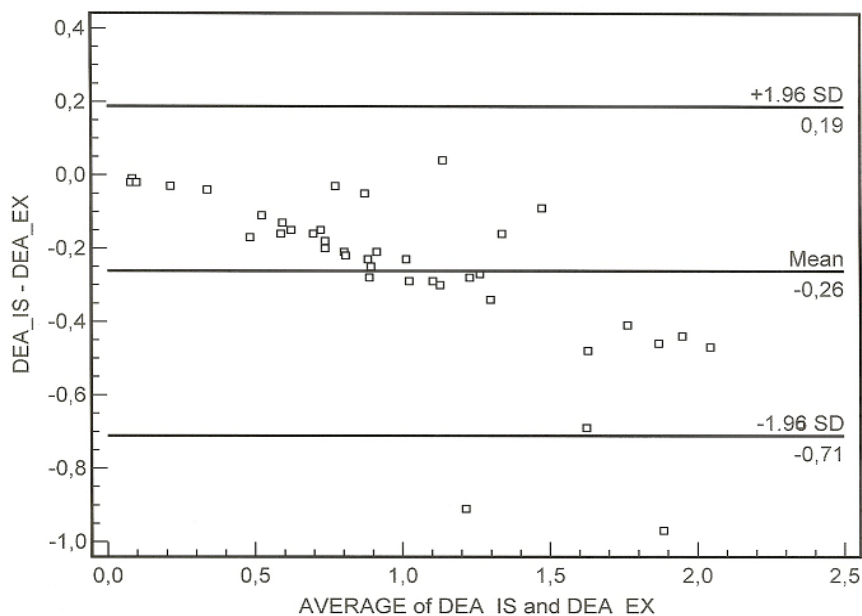
5.3.2 Bland-Altmanův rozdílový diagram

Výsledky vzorků byly zpracovány také Bland-Altmanovým rozdílovým diagramem. Rozdíly mezi dvěma metodami vyhodnocování jsou vyneseny proti jejich průměru.

Horizontální čáry ukazují průměrný rozdíl mezi metodami (detekce systematické chyby) a meze shody (průměr $\pm 1,96$ SD rozdílů).

Na osu x se umístí průměry výsledků obou metod hodnocení a na osu y difference výsledků obou metod. [5]

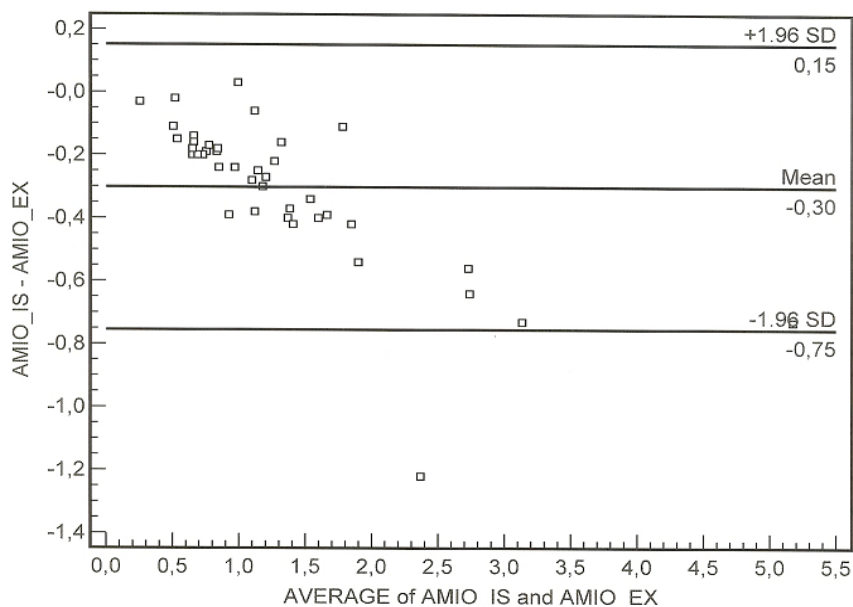
Správnost mezi metodami se posuzuje testováním hypotézy, zda průměr odchylek je nulový, pokud 95 % interval spolehlivosti (konfidenční interval) průměru diferencí zahrnuje 0 pak je tato hypotéza přijata a mezi metodami není statistický rozdíl.



Obr. 20 Bland-Altmanův rozdílový diagram pro hodnoty desethylamiodaronu

Na Obr. 20 je znázorněn Bland-Altmanův diagram hodnot desethylamiodarnu s průměrnou diferencí $-0,26 \mu\text{mol/l}$. Meze shody jsou $0,19 - 0,71 \mu\text{mol/l}$. Z grafu je vidět, že 0 na ose y je v intervalu $\pm 1,96$ SD, což znamená, že mezi metodami

hodnocení není významný rozdíl. Dále je z grafu patrné, že hodnoty jsou rozloženy rovnoměrně a neprojevuje se žádný trend, který by signalizoval přítomnost systematické chyby.



Obr. 21 Bland-Altmanův rozdílový diagram pro hodnoty amiodaronu

Na Obr. 21 je znázorněn Bland-Altmanův diagram hodnot amiodaronu s průměrnou diferencí $-0,30 \mu\text{mol/l}$. Meze shody jsou $0,15 - 0,75 \mu\text{mol/l}$. Z grafu je vidět, že 0 na ose y je v intervalu $\pm 1,96 \text{ SD}$, což znamená, že mezi metodami hodnocení není významný rozdíl. Dále je z grafu patrné, že hodnoty jsou rozloženy rovnoměrně a neprojevuje se žádný trend, který by signalizoval přítomnost systematické chyby.

5.3.3 Párový t-test

Tento test nemá žádné předpoklady o rozložení vstupních dat, protože je počítán až na základě jejich diferencí. Tyto difference by měly být normálně rozloženy a otázkou v párovém t-testu je, zda se průměrná hodnota diferencí rovná nějakému číslu, typicky jde o srovnání s nulou jako důkaz neexistence změny mezi oběma spárovanými skupinami. V testu je uveden průměr diferencí a srovnávané číslo, které je 0, pokud nepředpokládáme rozdíl mezi vzorky.

Za nulovou hypotézu H_0 bylo zvoleno takové tvrzení, že výsledky analýzy jsou nezávislé na způsobu hodnocení. Tzn., že je dosaženo vždy stejných výsledků nezávisle na způsobu hodnocení a průměr diferencí je 0. Opakem nulové hypotézy je pak

alternativní hypotéza H_A , která říká, že mezi metodami hodnocení je rozdíl a nejsou získány vždy naprosto stejné výsledky.

Tab. 13 Výsledky párového t-testu pro výsledky desethylamiodaronu

<i>Desethylamiodaron</i>	
<i>Průměrný rozdíl</i>	– 0,2617
<i>Standardní odchylka</i>	0,2292
<i>95% CI</i>	– 0,3340 až – 0,1894
<i>t</i>	7,312
<i>Stupeň volnosti (DF)</i>	40
<i>p</i>	< 0,0001

Hodnotu t-testu byla porovnána s hodnotou z tabulky kritických hodnot Studentova t rozdělení, která je pro $t_{0,05} = 1,684$ (DF = 40).^[27]

$$t = 7,312 > t_{0,05} = 1,684$$

Z porovnání bylo zjištěno, že hodnota t-testu je vyšší než tabulková hodnota $t_{0,05}$, což znamená, že nulová hypotéza H_0 musí být zamítnuta. Přijímá se tedy alternativní hypotéza H_A , která říká, že metody hodnocení neposkytují vždy naprosto stejné výsledky a průměr diferencí není nulový. Navíc hodnota $p < 0,0001$ je menší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$, což potvrzuje zamítnutí nulové hypotézy H_0 .

Tab. 14 Výsledky párového t-testu pro výsledky amiodaronu

<i>Amiodaron</i>	
<i>Průměrný rozdíl</i>	– 0,3012
<i>Standardní odchylka</i>	0,2313
<i>95% CI</i>	– 0,3742 až – 0,2282
<i>t</i>	8,340
<i>Stupeň volnosti (DF)</i>	40
<i>p</i>	< 0,0001

Hodnota t-testu byla porovnána s hodnotou z tabulky kritických hodnot Studentova t rozdělení, která je pro $t_{0,05} = 1,684$ (DF = 40).^[27]

$$t = 8,340 > t_{0,05} = 1,684$$

Porovnáním bylo zjištěno, že hodnota t-testu je vyšší než tabulková hodnota $t_{0,05}$, což znamená, že nulová hypotéza H_0 musí být zamítnuta. Přijímá se tedy alternativní hypotéza H_A , která říká, že metody hodnocení neposkytují vždy naprosto stejné výsledky a průměr diferencí není nulový. Navíc hodnota $p < 0,0001$ je menší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$, což potvrzuje zamítnutí nulové hypotézy H_0 .

5.3.4 Korelace

Korelace se používá k hodnocení těsnosti závislosti dvou náhodných spojitých proměnných. Dvě veličiny jsou korelované, pokud určité hodnoty jedné veličiny mají tendenci se vyskytovat společně s určitými hodnotami druhé veličiny. Jde tedy o dvoustranný reciproční vztah dvou náhodných proměnných x a y , které jsou vzájemně závislé.^[5]

Pro kvantitativní vyjádření těsnosti vztahu dvou korelovaných veličin byl navržen Pearsonův korelační koeficient r , který může nabývat hodnot od $+1$ do -1 . Čím větší je hodnota r , tím těsnější je korelace mezi oběma proměnnými. Pokud je korelační koeficient roven nule, korelační závislost neexistuje. Korelační koeficient $r = 1$ vyjadřuje úplnou (lineární) přímou závislost veličin.^[16]

Při zjišťování korelace mezi proměnnými byly na osu y vyneseny výsledky analytů vyhodnocené pomocí vnitřního standardu a na osu x výsledky analytů vyhodnocené pomocí jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací. Za nulovou hypotézu H_0 bylo uvažováno takové tvrzení, že mezi výsledky neexistuje vzájemná korelace. Alternativní hypotéza H_A je pak opakem nulové hypotézy a říká, že mezi výsledky vzájemná korelace existuje.

Tab. 15 Výsledky korelace pro výsledky desethylamiodaronu

Počet vzorků $n = 41$	
Korelační koeficient r	0,9599 ($p < 0,0001$)
95% CI interval pro r	0,9256 až 0,9786

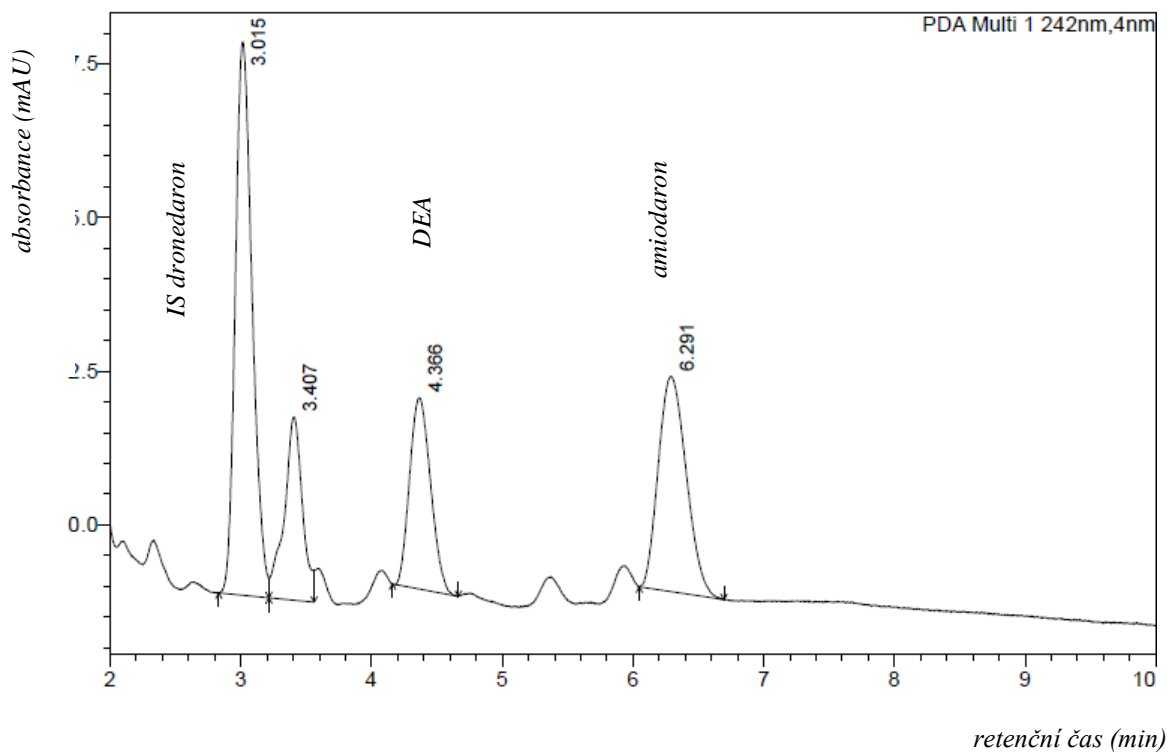
Korelační koeficient pro výsledky desethylamiodaronu je 0,9599, což znamená, že mezi výsledky vyhodnocenými pomocí vnitřního standardu a pomocí jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací existuje vzájemná shoda (korelace). Hodnota $p < 0,0001$ pak navíc vyvrací nulovou hypotézu a potvrzuje alternativní.

Tab. 16 Výsledky korelace pro výsledky amiodaronu

<i>Počet vzorků $n = 41$</i>	
<i>Korelační koeficient r</i>	<i>0,9851 ($p < 0,0001$)</i>
<i>95% CI pro r</i>	<i>0,9720 až 0,9921</i>

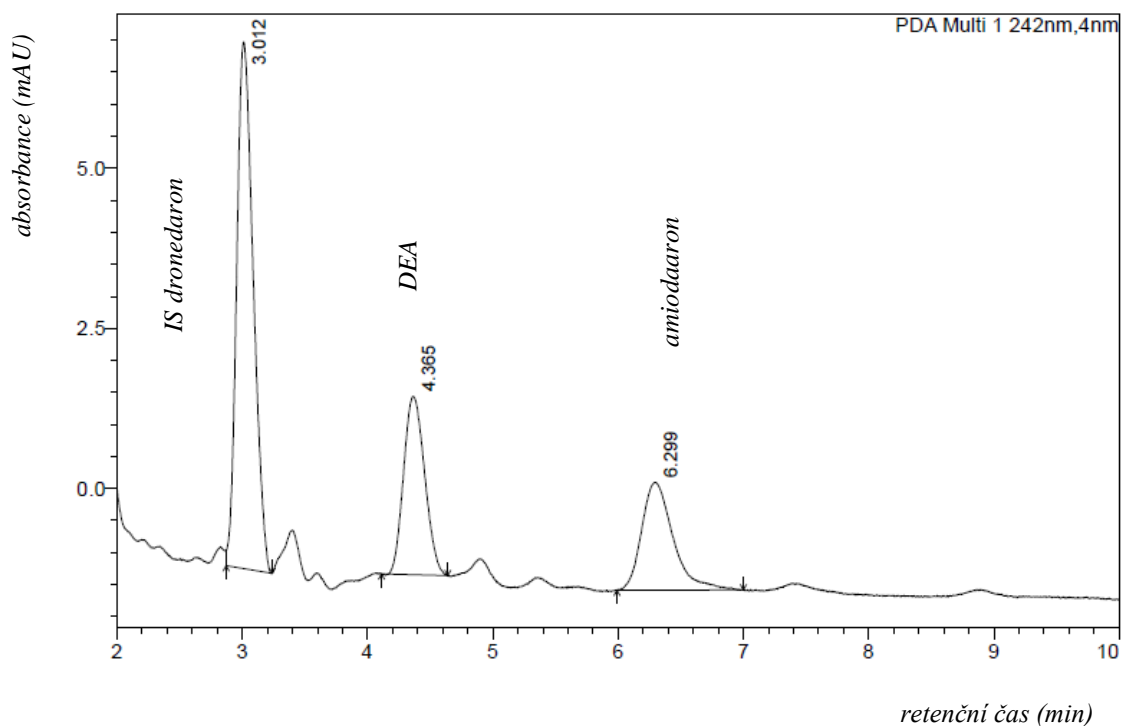
Korelační koeficient pro výsledky amiodaronu je 0,9851, což znamená, že mezi výsledky vyhodnocenými pomocí vnitřního standardu a pomocí jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací existuje vzájemná shoda (korelace). Čím více se hodnota korelačního koeficientu blíží 1, tím je shoda těsnější, což platí více pro výsledky amiodaronu než pro výsledky desethylamiodaronu. Hodnota $p < 0,0001$ pak navíc vyvrací nulovou hypotézu a potvrzuje alternativní.

5.4 Chromatografické záznamy analýzy vzorků pacientů



Obr. 22 Chromatografický záznam vzorku pacienta 1

Na Obr. 22 je zaznamenán chromatogram prvního pacienta. Jednalo se o ženu s hodnotami amiodaronu 2,830 $\mu\text{mol/l}$ a desethylamiodaronu 1,948 $\mu\text{mol/l}$ v séru. Výsledky této pacientky spadají do doporučeného terapeutického rozmezí, které činí pro amiodaron 0,80 – 3,90 $\mu\text{mol/l}$ a pro desethylamiodaron 0,80 – 4,90 $\mu\text{mol/l}$. Pacientka tedy užívá správnou dávku tohoto léku a nedochází k intoxikaci ani nedostatečné hladině v séru.



Obr. 23 Chromatografický záznam vzorku pacienta2

Na Obr. 23 je zaznamenán chromatogram druhého pacienta. Jednalo se o muže s hodnotami amiodaronu 1,487 $\mu\text{mol/l}$ a desethylamiodaronu 1,911 $\mu\text{mol/l}$ v séru. Výsledky tohoto pacienta spadají do doporučeného terapeutického rozmezí, které činí pro amiodaron 0,80 – 3,90 $\mu\text{mol/l}$ a pro desethylamiodaron 0,80 – 4,90 $\mu\text{mol/l}$. Pacient tedy užívá správnou dávku tohoto léku a nedochází k intoxikaci ani nedostatečné hladině v séru.

6 DISKUSE

Metod pro stanovení amiodaronu a jeho metabolitu desethylamiodaronu existuje celá řada, nejčastěji se jedná o metody chromatografické a v menší míře o metody imunochemické. Imunochemické mají však nevýhodu v tom, že nelze detekovat v jednom kroku amiodaron a jeho metabolit. Proto je, dle literární rešerše, častěji využívána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je dostatečně citlivá a specifická a není náročná na úpravu vzorku. Nejen tyto důvody, ale i znalost metody stanovení amiodaronu a jeho metabolitu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s vyhodnocením pomocí kalibrační křivky, která byla používána na Úseku klinické farmakologie (ÚKBD) dříve, rozhodly pro volbu metody HPLC s tím rozdílem, že vyhodnocení je prováděno pomocí vnitřního standardu.

Po zavedení metody bylo nutné provést validaci, která je nezbytná pro rutinní používání analytického systému. Validace zahrnovala parametry meze detekce, meze stanovitelnosti, linearity a pracovního rozsahu, preciznosti, vychýlení (bias) a výtěžnosti (recovery). Výsledky validačních parametrů potvrdily použitelnost metody v praxi.

Mez detekce amiodaronu (0,0613 $\mu\text{mol/l}$) a desethylamiodaronu (0,048 $\mu\text{mol/l}$) i mez stanovitelnosti amiodaronu (0,130 $\mu\text{mol/l}$, resp. 0,184 $\mu\text{mol/l}$) a desethylamiodaronu (0,133 $\mu\text{mol/l}$, resp. 0,144 $\mu\text{mol/l}$) byly svými hodnotami pod dolní hranici doporučeného terapeutického rozmezí, které činí pro amiodaron 0,80 – 3,90 $\mu\text{mol/l}$ a pro desethylamiodaron 0,80 – 4,90 $\mu\text{mol/l}$. Mez kvantifikace byla stanovena s požadovanou precizností a vychýlením (výtěžností).

Linearita byla stanovena pro amiodaron v rozmezí hodnot 0,39 - 7,75 $\mu\text{mol/l}$ a pro desethylamiodaron v rozmezí 0,52 – 7,79 $\mu\text{mol/l}$. Pracovní rozsah byl dán mezi detekce a nejvyšším kalibračním bodem, pro amiodaron vyšel v rozmezí koncentrací 0,13 – 7,75 $\mu\text{mol/l}$ a pro desethylamiodaron v rozmezí 0,133 – 7,79 $\mu\text{mol/l}$.

Parametry preciznosti byly vyjádřeny pomocí opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti. Preciznost byla stanovována na dvou koncentračních hladinách, zvlášť pro amiodaron a zvlášť pro metabolit. Výsledek opakovatelnosti byl získán jako variační koeficient, který vyšel pro amiodaron 3,48 % a 1,45 % a pro metabolit 2,24 % a 1,14 %. Mezilehlá preciznost byla stanovena z výsledků získaných za období 3 měsíců. Variační koeficienty mezilehlé preciznosti u výsledků amiodaronu vyšly 6,63 % a 5,28 % a u výsledků metabolitu 8,75 % a 7,85 %. Výtěžnost (recovery) byla stanovena v rozmezí

91,83 % - 107,41 %. Hodnoty výtěžnosti a preciznosti splňují kritéria doporučená společnostmi FDA a EMEA.

Na závěr byly porovnány výsledky získané dvěma metodami vyhodnocení. Jedna z nich byla metoda jednobodové kalibrační křivky s externí kalibrací a druhá metoda vnitřního standardu. Cílem porovnání bylo zjistit, zda jsou výsledky v průměru stejné, pokud použijeme různé metody hodnocení.

Nejprve byly výsledky porovnány Passing-Bablokovou regresí, pomocí které bylo zjištěno, že výsledky hodnocené za využití vnitřního standardu vychází u desethylamiodaronu v průměru o 0,26 $\mu\text{mol/l}$ nižší než výsledky hodnocené kalibrační křivkou s externí kalibrací. Výsledky amiodaronu vycházely v průměru o 0,30 $\mu\text{mol/l}$ nižší při hodnocení pomocí vnitřního standardu. Regresí bylo dále zjištěno, že u obou analytů nedochází ke vzniku systematické chyby při hodnocení pomocí vnitřního standardu, ale dochází naopak ke vzniku proporcionální chyby.

Dále byly výsledky porovnány pomocí Bland-Altmanova diagramu. Tímto testem bylo prokázáno, že mezi metodami hodnocení není významný rozdíl (hodnoty v intervalu $\pm 1,96$ SD). Výsledky byly podrobeny i párovému t-testu, který potvrdil, že metody hodnocení neposkytují vždy naprosto stejné výsledky. Nakonec byla provedena korelace mezi výsledky, kterou bylo ověřeno, že mezi metodami hodnocení existuje určitá korelace (závislost).

Ze srovnání různých metod hodnocení výsledků vyplynulo, že metoda vnitřního standardu a metoda kalibrační křivky neposkytují totožné výsledky, ale výsledky se od sebe zásadně neliší (spadají do intervalu ± 2 SD).

7 ZÁVĚR

Výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie je její dostatečná citlivost, specifita a nenáročnost na úpravu vzorku. Je proto výhodná pro rutinní použití v laboratořích, které musí zpracovávat množství vzorků. Jedná se, mimo jiné, o vzorky sér pacientů užívajících antiarytmikum amiodaron. Amiodaron se řadí k léčivům, u kterých je vhodné monitorovat plazmatickou hladinu a to z důvodu dlouhého poločasu eliminace a z dávky nepředvídatelné plazmatické koncentrace. Nezanedbatelné je také množství nežádoucích účinků této látky.

Zvolená metoda stanovení amiodaronu a jeho metabolitu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí a vyhodnocením pomocí vnitřního standardu dronedaronu byla validačními parametry ověřena jako dostatečně citlivá a specifická. Metoda je v nutném pracovním rozsahu lineární a poskytuje spolehlivé výsledky. (Potvrzeno úspěšnou účastí v cyklu externí kontroly kvality - INSTAND, Německo). Validační parametry vyhovují doporučením vydanými společnostmi FDA, EMEA a Česká skupina klinické biochemie.

8 SEZNAM ZKRATEK

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
CE	Conformité Européenne
CI	Confidence Interval
ČSKB	Česká skupina klinické biochemie
DAD	Diode Array Detector
DEA	Desethylamiodaron
EHK	Externí hodnocení kvality
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray Ionization
FDA	U. S. Food and Drug Administration
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Imunoglobulin G
IS	Internal Standard
LC	Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MS	Mass Spectrometry
MW	Molecular Weight
NP	Normal Phase
RP	Reversed Phase
SD	Standard Deviation
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
ULOQ	Upper Limit of Quantification
UV	Ultraviolet
VIS	Visible Spectroscopy

9 LITERATURA

1. Amiodarone hydrochloride. *PubChem: Open chemistry database* [online]. 2011 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441325>
2. COUFAL, Pavel. Domovská stránka. *Přírodovědecká fakulta: Univerzity Karlovy v Praze* [online]. 1996 [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/>
3. CVAČKA, Josef. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. In: *Přírodovědecká fakulta: Univerzity Karlovy v Praze* [online]. 2010 [cit. 2014-11-25]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
4. DASTYCH, Milan, Miroslava BEŇOVSKÁ, Petr BREINEK, Dana BUČKOVÁ, Jana GOTTWALDOVÁ a Alena MIKUŠKOVÁ. *Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně*. 2011
5. DOHNAL, Luděk. Desatero pro porovnávání výsledků dvou metod. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze* [online]. 2006 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap_4_Desatero.pdf
6. DOUŠA, Michal. *HPLC* [online]. 2013 [cit. 2014-11-25]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
7. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Česká společnost klinické biochemie* [online]. 2010 [cit. 2014-12-02]. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf
8. FLOREY, Ed. by Klaus. *Analytical profiles of drug substances*. New York [u.a.]: Acad. Press, 1991. ISBN 01-226-0820-8.
9. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. In: *U. S. Food and Drug Administration* [online]. 2001 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>

10. Chemicalize [online]. [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=amiodarone+hydrochloride&source=fp>
11. JIRAVSKÁ GODULA, Bogna, Otakar JIRAVSKÝ, Pavel VÁVRA a Marian BRANNY. Nežádoucí účinky amiodaronu. *Klinická farmakologie* [online]. 2004, č. 18 [cit. 2014-10-15]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/03/10.pdf>
12. JUENKE, BROWN a MCMILLIN. A Rapid Procedure for the Monitoring of Amiodarone and N-Desethylamiodarone by HPLC-UV Detection. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2004, č. 28 [cit. 2014-11-05]. Dostupné z: <http://jat.oxfordjournals.org/content/28/1/63.full.pdf>
13. KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3.
14. KATZUNG, Bertram G, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Základní a klinická farmakologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. Jinočany: H, 2006, 1106 s. ISBN 80-731-9056-7.
15. KOPLÍK, Richard. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2014 [cit. 2014-11-25]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~koplikr/%C4%8C%C3%A1stA6_2.pdf
16. Lineární korelační závislost. In: *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Statistika a výpočetní technika* [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn5/linearni.htm>
17. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. PrahaK: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
18. MCMASTER, Marvin C. *LC/MS: a practical user's guide*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2005. ISBN 04-716-5531-7.

19. Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři. *SEKK* [online]. 2009 [cit. 2014-12-02]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>
20. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology: (CPMP/ICH/381/95). In: *European Medicines Agency: Science medicines health* [online]. 1995-2014 [cit. 2014-12-06]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf
21. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3
22. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Klatovy: Michal Douša, 2013, 235 s. ISBN 97880260424402.
23. PISKAČ, Pavel, Marie CHALUPOVÁ a Šárka PROKOPCOVÁ. *Český lékopis 1997* [online]. 2002/2003 [cit. 2014-10-15]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>
24. POLLAK, P. Timothy, CARRUTHERS a FREEMAN. Simplified Liquid-Chromatographic Assay of Amiodarone and Desethylamiodarone after Solid-Phase Extraction. [Http://www.clinchem.org/content/32/5/890.full.pdf](http://www.clinchem.org/content/32/5/890.full.pdf) [online]. 1986, roč. 32, č. 5 [cit. 2014-11-05]. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/32/5/890.full.pdf>
25. RAJENDRAN, SD, YMadhusudan RAO, S THANIKACHLAM, K SATHISH, R GOPINATH a KP ARUN. Simultaneous estimation of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatographic method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, vol. 68, issue 6, s. 715-. DOI: 10.4103/0250-474X.31001. Dostupné z: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2006/68/6/715/31001>
26. RODRIQUES, M., G. ALVES, FERREIRA, QUEIROZ, A. FALCAO. A rapid HPLC method for the simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite in rat plasma and tissues: a useful tool for pharmacokinetic studies. In: *PubMed.gov* [online]. 2013 [cit. 2014-11-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977121>

27. Tabulka kritických hodnot Studentova t rozdělení. In: *Katedra analytické chemie - UP v Olomouci: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci* [online]. 2008 [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/tabulky-1-1316614942.pdf>
28. TESTA, A., V. OJETTI, A. MIGNECO, M. SERRA, C. ANCONA, A. DE LORENZO a GENTILONI SILVERI. Use of amiodarone in emergency. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* [online]. 2005, č. 9, s. 183-190 [cit. 2014-10-21]. Dostupné z: <http://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/314.pdf>
29. VOTAVA a SLÍVA. *Antiarytmika* [online]. 2010 [cit. 2014-10-15]. Dostupné z: http://www.medicabaze.cz/?&sec=term_detail&termId=3025&tname=Antiarytmika
30. WIDIMSKÝ, Jiří. *Kardiovaskulární farmakoterapie*. Vyd. 1. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1991, 259 s. ISBN 80-201-0099-7.
31. XU, Quanyun A a Timothy L MADDEN. *Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2011, xiv, 502 p. ISBN 978-047-0455-616.

PŘÍLOHY

- Příloha 1: Kapalinový chromatograf UHPLC Nexera
- Příloha 2: Naměřené hodnoty šumu základní linie u deseti vzorků blanku pro amiodaron a desethylamiodaron a naměřené hodnoty vzorků při zjišťování meze detekce (LOQ)
- Příloha 3: Výsledky vzorků obsahující amiodaron a jeho metabolit vyhodnocené pomocí vnitřního standardu a pomocí kalibrační křivky.

Příloha 1a: Kapalinový chromatograf UHPLC Nexera, Shimadzu



Příloha 2a: Naměřené hodnoty šumu základní linie u deseti vzorků blanku při zjišťování meze detekce (LOD).

<i>Amiodaron</i>		<i>Desethylamiodaron</i>	
<i>Vzorek</i>	<i>Naměřené hodnota šumu ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>Vzorek</i>	<i>Naměřené hodnota šumu ($\mu\text{mol/l}$)</i>
1	0,069	1	0,072
2	0,056	2	0,053
3	0,077	3	0,039
4	0,068	4	0,047
5	0,079	5	0,043
6	0,062	6	0,053
7	0,055	7	0,043
8	0,065	8	0,043
9	0,046	9	0,041
10	0,036	10	0,046

Příloha 2b: Naměřené koncentrace vzorků při zjišťování meze stanovitelnosti (LOQ).

<i>Amiodaron</i>		<i>Desethylamiodaron</i>	
<i>Vzorek</i>	<i>Naměřené koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)</i>	<i>Vzorek</i>	<i>Naměřené koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)</i>
1	0,121	1	0,135
2	0,131	2	0,136
3	0,124	3	0,134
4	0,130	4	0,143
5	0,137	5	0,131
6	0,135	6	0,129
7	0,120	7	0,142
8	0,138	8	0,129
9	0,131	9	0,126
10	0,133	10	0,125

Příloha 3: Výsledky vzorků obsahující amiodaron a jeho metabolit vyhodnocené pomocí vnitřního standardu a pomocí kalibrační křivky.

Vzorek	<i>Desethylamiodaron (μmol/l)</i>		<i>Amiodaron (μmol/l)</i>	
	<i>Výsledky získané metodou vnitřního standardu</i>	<i>Výsledky získané metodou kalibrační křivky</i>	<i>Výsledky získané metodou vnitřního standardu</i>	<i>Výsledky získané metodou kalibrační křivky</i>
1	0,08	0,09	1,16	1,38
2	0,07	0,09	2,45	3,01
3	0,20	0,23	4,81	5,54
4	1,26	1,42	1,2	1,40
5	0,65	0,80	0,59	0,73
6	0,85	0,90	1,09	1,15
7	1,46	1,97	1,17	1,57
8	0,75	1,03	0,55	0,75
9	1,56	1,97	2,42	3,06
10	0,62	0,78	0,58	0,74
11	1,09	1,37	1,37	1,71
12	1,16	1,12	1,01	0,98
13	1,43	1,52	1,73	1,84
14	1,81	2,28	1,47	1,86
15	0,96	1,25	0,66	0,85
16	1,64	2,10	1,40	1,80
17	0,32	0,36	0,24	0,27
18	0,64	0,84	0,62	0,82
19	0,70	0,91	0,63	0,83
20	0,70	0,92	0,59	0,79
21	2,01	2,69	1,63	2,17
22	0,09	0,11	2,77	3,50
23	0,77	1,00	1,03	1,33
24	1,13	1,47	0,96	1,24
25	0,51	0,67	0,56	0,74
26	1,39	1,87	1,20	1,62
27	0,77	1,02	0,73	0,97
28	0,53	0,66	0,69	0,86
29	0,88	1,17	0,46	0,61
30	0,55	0,70	0,74	0,93
31	0,90	1,13	0,75	0,93
32	0,76	0,79	0,51	0,53
33	0,47	0,58	0,45	0,56
34	1,13	1,40	1,02	1,27

35	0,76	1,67	0,73	1,12
36	0,65	0,83	0,85	1,09
37	1,40	2,37	1,76	2,98
38	1,73	2,17	1,64	2,06
39	0,81	1,02	1,07	1,34
40	0,40	0,57	0,93	1,31
41	0,98	1,28	1,20	1,57