

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



**HPLC STANOVENÍ FLUBENDAZOLU A
JEHO METABOLITŮ V BIOLOGICKÝCH
VZORCÍCH**
(rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2007

Marie Soukupová

Poděkování

Úvodem své rigorózní práce bych ráda poděkovala zejména svému školiteli Ing. Vladimíru Kubičkovi, CSc. za pomoc s přípravou práce, za vědomosti a dovednosti, které mi během řešení úkolu předal, za trpělivost, se kterou mi osvětloval všechny taje chromatografie, konečně za neutuchající optimismus, který do mě vléval, když se v laboratoři zrovna nedařilo.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za laskavou pomoc v biochemické laboratoři a cenné rady, Doc. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za odběr biologického materiálu, paní laborantce Aleně Pakostové za péči a pomoc.

Abstrakt

HPLC STANOVENÍ FLUBENDAZOLU A JEHO METABOLITŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

Flubendazol a jeho metabolity desethylkarboxyflubendazol a flubendazol redukovaný v biologickém materiálu parazita *Haemonchus contortus* a v ovčí plazmě byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzních fázích (HPLC-RP) po extrakci kapalina-kapalina analytů z biologického materiálu octanem ethylnatým. Extrakty byly analyzovány s použitím chromatografické kolony LiChroCART (250 mm x 3 mm, 5 μm) a mobilní fáze acetonitril:fosfátový pufr (pH 3,07; 0,025 M) 3:7 (v/v), průtokovou rychlostí 0,7 ml.min⁻¹. Byla prováděna analýza flubendazolu a jeho metabolitů desethylkarboxyflubendazolu a flubendazolu redukovaného se spektrofotometrickou detekcí při 246 a 300 nm a analýza flubendazolu redukovaného se spektrofluorimetrickou detekcí při excitační vlnové délce 290 nm a emisní vlnové délce 320 nm. Jako vnitřní standard byl zvolen albendazol. Za uvedených podmínek se analyty separují do 25 min.

Abstract

HPLC DETERMINATION OF FLUBENDAZOLE AND ITS METABOLITES IN BIOLOGICAL SAMPLES

A bioanalytical RP HPLC-PDA and new RP HPLC-RF method involving pH- dependent liquid-liquid extraction of flubendazole and its metabolites desethylcarboxy flubendazole and reduced flubendazole into ethyl acetate was performed for the analysis of the parasite material (*Haemonchus contortus*) and for the analysis of sheep plasma. The extracts were analyzed on a reversed-phase LiChroCART (250 mm x 3 mm, 5 μ m) column with acetonitrile-phosphate buffer (pH 3,07; 0,025 M) as a mobile phase. Ultraviolet detection of flubendazole and its metabolites was carried out at 246 and 300 nm, fluorescence detection of reduced flubendazole was carried out at λ excitation 290 nm and λ emission 320 nm. Albendazole was chosen as an internal standard. At a flow rate 0,7 ml.min⁻¹ the whole analysis lasted 25 min.

Obsah

Obsah	5
Úvod	9
Teoretická část.....	10
I. DEFINICE A ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	10
Princip chromatografického dělení.....	10
Podstata separačního děje	11
Používané techniky.....	13
Skupenství fází	14
II. TEORETICKÉ ZÁKLADY CHROMATOGRAFICKÉHO PROCESU	15
III. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	19
Instrumentace v HPLC.....	19
Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu.....	27
IV. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD	28
V. EXTRAKCE Z KAPALINY DO KAPALINY	32
Výběr extrakčního činidla.....	32
LLE v praxi.....	33
Shrnutí	34
VI. FARMAKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA BENZIMIDAZOLŮ	35
VI.1. Helmintózy přežvýkavců.....	35
VI.2. Farmakoterapie benzimidazoly ve veterinární medicíně.....	36
VI.2.1. Albendazol.....	37
VI.2.2. Flubendazol a jeho metabolity	38
Experimentální část	39
1. POUŽITÝ MATERIÁL	39
1.1. Experimentální zvířata a biologický materiál	39
1.2. Chemikálie	40
1.3. Pomůcky a přístroje	40
2. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ.....	42
2.1. Příprava fosforečnanového pufru 0,025M, pH = 3,07	42
2.2. Příprava fosfátového pufru 0,1M, pH = 7,40	42
2.3. Příprava základních roztoků léčiv a metabolitů flubendazolu v DMSO	42
2.4. Příprava a přehled standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci chromatogramů.....	43
2.4.1. Příprava standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů	44
2.4.2. Přehled standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů	44
2.4.3. Příprava standardních roztoků redukovaného flubendazolu a albendazolu pro kalibraci fluorescenčně detekovaných chromatogramů.....	45
2.5. Příprava a přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření.....	46
2.5.1. Příprava roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření	46
2.5.2. Přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření	46
2.6. Příprava a přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžné chromatografické analýzy	48

2.6.1. Příprava testovacího roztoku albendazolu	48
2.6.2. Přehled roztoků FLU, FLU-H a FLU-R používaných pro předběžné chromatografické analýzy.....	48
2.7. Přehled roztoků použitých pro měření limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) při analýze léčiv v biologických materiálech	49
2.7.1. Tabulkový přehled roztoků použitých pro měření LOD a LOQ chromatografických analýz se spektrofotometrickou detekcí	50
2.7.2. Tabulkový přehled roztoků použitých pro měření LOD a LOQ chromatografických analýz se spektrofluorimetrickou detekcí.....	51
3. POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU	52
3.1. Příprava vzorků určených k hodnocení tří způsobů extrakce.....	52
3.2. LLE standardních vzorků léčiv a metabolitů pro následné HPLC analýzy.....	53
3.3. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma, žluč) pro následnou HPLC analýzu	54
3.3.1. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma, žluč) pro následnou HPLC analýzu	54
3.3.2. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma) s reextrakcí interferujících polárních látek pro následnou HPLC analýzu	54
3.3.3. LLE neznámých vzorků biologického materiálu plazmy pro následnou HPLC analýzu.....	55
3.4. Úprava odparků biologických vzorků po inkubaci <i>Haemonchus contortus</i> s flubendazolem	55
3.5. Rekonstituce odparků vzorků po provedení kompletní LLE pro následnou chromatografickou analýzu	56
3.5.1. Rekonstituce odparků extraktů léčiv a metabolitů pro testování vlivu rozpouštědel na rekonstituci odparku po LLE	56
3.5.2. Rekonstituce odparků extraktů léčiv a metabolitů používaná při chromatografii standardních a neznámých biologických vzorků.....	57
3.6. Chromatografická analýza flubendazolu a jeho metabolitů v extraktech po LLE	57
3.6.1. Chromatografické podmínky	57
3.7. Předběžné testování fluorescence léčiv a metabolitů sloužící k nalezení jejich excitačních a emisních vlnových délek.....	58
3.7.1. Fluorimetrická měření emisních spekter léčiv a metabolitů	58
4. VYJAŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	59
4.1. Validace analytické metody	59
4.1.1. Limity detekce a kvantifikace.....	59
4.1.2. Opakovatelnost	59
4.1.3. Rozlišení	59
4.1.4. Správnost.....	59
Výsledková část.....	60
1. Optimalizace rychlosti průtoku MF kolonou	60
2. Optimalizace složení rozpouštědla používaného při rekonstituci odparků.....	61
3. Optimalizace techniky rekonstituce odparků	67
4. Stanovení kalibračních přímků pro spektrofotometrickou detekci.....	69
5. Výsledky hodnocení opakovatelnosti spektrofotometrické detekce standardního vzorku s přibližným obsahem 5 µmol/l analytů	72
6. Vývoj metodiky fluorescenční detekce sledovaných analytů	75

6.1. Nalezení excitační a emisní vlnové délky léčiv a metabolitů	75
6.2. Hodnocení intenzity fluorescence léčiv a metabolitů	76
6.3. Hodnocení mebendazolu jako vnitřního standardu	76
7. Stanovení kalibrační přímky pro spektrofluorimetrickou detekci	77
8. Výsledky hodnocení opakovatelnosti spektrofluorimetrické detekce standardního vzorku s přibližným obsahem 0,075 µmol/l analytu	79
9. Výsledky chromatografického stanovení limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ).....	82
9.1. Limity detekce a kvantifikace pro hodnocení homogenizátů <i>Haemonchus contortus</i>	82
9.1.1. LOD a LOQ pro hodnocení homogenizátů <i>Haemonchus contortus</i> analyzovaných chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí	82
9.1.2. LOD a LOQ pro hodnocení homogenizátů <i>Haemonchus contortus</i> analyzovaných chromatografií se spektrofotometrickou detekcí	82
9.2. Výsledky chromatografického stanovení limitů detekce a kvantifikace biologických vzorků moči, plazmy, žluči.....	83
9.2.1. Limity detekce a kvantifikace analytů při chromatografickém stanovení v biologických vzorcích moči, plazmy, žluči se spektrofotometrickou detekcí	83
9.2.2. Limity detekce a kvantifikace FLU-R při chromatografickém stanovení v biologických vzorcích moči, plazmy, žluči se spektrofluorimetrickou detekcí.....	86
10. Výsledky stanovení flubendazolu a jeho metabolitu FLU-R ve vzorcích určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce.....	88
10.1. Výsledky chromatografického stanovení se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce.....	88
10.2. Výsledky chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce.....	90
11. Výsledky stanovení flubendazolu a jeho metabolitů v biologických vzorcích <i>Haemonchus contortus</i>	92
11.1. Chromatografická analýza se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků po inkubaci <i>Haemonchus contortus</i> s flubendazolem	93
11.2. Chromatografická analýza se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků po inkubaci <i>Haemonchus contortus</i> s flubendazolem	94
12. Výsledky chromatografické analýzy biologických vzorků moči, plazmy, žluči	96
12.1. Výsledky chromatografické analýzy připravených standardních vzorků moči	97
12.1.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků moči	97
12.1.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků moči	98
12.2. Výsledky chromatografické analýzy biologických vzorků plazmy....	100
12.2.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků plazmy.....	101

12.2.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků plazmy.....	101
12.2.III. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí neznámých vzorků plazmy	103
12.3. Výsledky chromatografické analýzy připravených standardních vzorků žluči.....	104
12.3.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků žluči.....	104
12.3.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků žluči.....	105
Diskuse	106
1. Optimalizace rychlosti průtoku MF kolonou	106
2. Optimalizace složení rozpouštědla používaného při rekonstituci odparků	107
3. Optimalizace techniky rekonstituce odparků	110
4. Stanovení kalibračních přímků pro spektrofotometrickou detekci.....	111
5. Hodnocení opakovatelnosti chromatografických analýz se spektrofotometrickou detekcí.....	111
6. Vývoj metodiky fluorescenční detekce analytů	113
7. Stanovení kalibrační přímky pro spektrofluorimetrickou detekci.....	115
8. Hodnocení opakovatelnosti chromatografických analýz se spektrofluorimetrickou detekcí.....	116
9. Limity detekce a kvantifikace chromatografických metod	117
10. Testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce	118
11. Stanovení flubendazolu a jeho metabolitu FLU-R v biologických vzorcích <i>Haemonchus contortus</i>	121
12. Hodnocení vlivu sloučenin obsažených v biologických materiálech (moč, plazma, žluč) uvažovaných pro HPLC stanovení FLU a jeho metabolitů na průběh chromatografických analýz a diskuse chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí FLU-R v neznámých vzorcích plazmy	123
Závěr.....	127
Použitá literatura:.....	129

Úvod

Rigorózní práce byla věnována stanovení anthelmintika flubendazolu a jeho metabolitů (desethylkarboxyflubendazolu a flubendazolu redukováného) v biologických vzorcích vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Práce byla součástí grantového projektu GAČR 524/06/1345, v němž byla sledována biotransformace anthelmintika a testována aktivita biotransformačních enzymů modelového parazita vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*), která je obzvláště patogenním původcem helmintóz přežvýkavců způsobující hostitelům těžkou anémii a hypoalbuminémii, v řadě případů vedoucí až k uhynutí hostitele.

Helmintózy hospodářských, domácích i volně žijících zvířat jsou v současnosti celosvětovým problémem a způsobují značné ekonomické ztráty chovatelům, utrpení zvířatům. Kontrola parazitóz v chovech se dnes soustřeďuje především na podávání anthelmintik, nejčastěji benzimidazolového typu, ke kterým patří sledovaný flubendazol. Bohužel, neuvážené používání těchto látek vedlo v mnoha zemích k rozšíření rezistence u cílových druhů parazitů na podávaná léčiva. Studium mechanismů navození rezistence parazitů může přispět k zlepšení stávající situace modifikací používaných anthelmintik, přehodnocení léčebných schémat.

Součástí studií mechanismů rezistence parazitů jsou dnes především nejružnější biochemické experimenty, kdy řada z nich přímo závisí na hodnocení pomocí vysoce účinných separačních analytických metod. Takovou metodou je mj. i HPLC, která byla využita k řešení zmíněného interdisciplinárního projektu.

Předložená rigorózní práce se soustředila na nalezení vhodné metody extrakce flubendazolu a jeho hlavních metabolitů z biologického materiálu (homogenizátu vlasovek slézových, moči, plazmy, žluči experimentálně infikovaných ovcí domácích) a na optimalizaci HPLC analýzy látek se spektrofotometrickou detekcí. Během řešení rigorózní práce byla nově vypracována a vyzkoušena spektrofluorimetrická detekce pro HPLC stanovení metabolitu flubendazolu redukováného.

Teoretická část

I. DEFINICE A ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít. Chromatografické metody mají dnes prvořadý význam při analýzách mnohých technických produktů a biologického materiálu, které představují velmi složité směsi.

Princip chromatografického dělení

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivá, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, pohyblivá, mobilní fáze pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, přičemž dochází k jejich oddělení.

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy

- separačního děje
- použité techniky
- způsobu vyvíjení
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze^[1].

Podstata separačního děje

Tabulka 1: Rozdělení chromatografických metod [2].

Chromatografická metoda	Povaha separačního procesu	Veličiny určující afinitu dělených látek k fázi
adsorpční	adsorpce	adsorpční izoterma
rozdělovací	extrakce, rozpouštění	rozdělovací konstanta
iontově výměnná	elektrostatická interakce a difúze	náboj, disociační konstanta a efektivní průměr iontu
gelová	difúze	efektivní molekulární objem
afinitní	specifická interakce s afiantem	obecná veličina zatím chybí

ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce z pohyblivé fáze na povrch adsorbentu. Adsorbentem (stacionární fází) bývá nejčastěji oxid hlinitý, hořečnatý, silikagel, práškovaná celulóza nebo aktivní uhlí. Mobilní fázi tvoří buďto čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropní řady nebo směsi rozpouštědel^[1].

ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

K dělení látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Zpravidla se používá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Chromatografický sloupec je naplněn

inertním nosičem (silikagel, křemelina, silikáty, celulóza), na jehož povrchu je zakotvená účinná stacionární kapalná fáze (na celulóze nejčastěji voda). Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průtoku mobilní fáze (organické rozpouštědlo, nemísitelné se stacionární fází) k opakovanému rozdělování (extrakci) součástí směsi mezi obě kapalnou fáze, při plynové chromatografii mezi kapalnou a plynnou fází^[1, 2].

IONTOVĚ-VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE

Na povrchu stacionární fáze dochází k interakci iontů dělených látek s ionogenními skupinami těchto fází. Ionty vázané na povrchu stacionární fáze se vyměňují na základě náboje, velikosti iontů a disociační konstanty za ionty přítomné v mobilní fázi. Podle typu vázaného iontu se stacionární fáze rozlišují na anexy (aniony) a na katexy (kationy)^[1,3].

GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Při tomto druhu chromatografie jsou látky děleny podle velikosti a tvaru molekuly. Stacionární fáze je tvořena gelem, jímž je inertní zesítěná nerozpustná polymerní matrice nasycená kapalinou, nejčastěji vodou. Stejná kapalina je použita jako mobilní fáze. Inertní matrice polymeru vytváří v gelu póry různé velikosti, podle druhu použitého materiálu. Látky dělené směsi jsou z kolony eluovány v pořadí podle své klesající molekulové hmotnosti^[4].

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Podmínky afinitní chromatografie se různí podle druhu izolovaných biologicky aktivních látek, neboť jsou dány výjimečnou specifickou biologickou povahou jejich selektivní interakce s daným afinantem. Afinantem pro izolaci protilátek je antigen, pro izolaci antigenu protilátka. Pomocí vhodných afinantů lze izolovat nukleové kyseliny, transportní a represorové bílkoviny, hormony i jejich receptory a řadu dalších látek^[5].

Používané techniky

KOLONOVÉ USPOŘÁDÁNÍ

PLOŠNÉ USPOŘÁDÁNÍ – papírová chromatografie

- tenkovrstvá chromatografie [1,6]

FRONTÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE

Technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu až do konce chromatografického procesu. Vzorek je tedy rozpuštěn v mobilní fázi. Nejdříve vychází z kolony složka s nejmenší afinitou ke stacionární fázi, nejméně brzděná. Frontální technika není vhodná k preparativním účelům, neboť v čisté formě lze izolovat jen část složky vycházející jako první [2].

VYTĚŠŇOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

Princip této metody spočívá v jednorázovém vnesení pouze části chromatografované směsi na chromatografickou kolonu. Poté se až do konce chromatografování kontinuálně přivádí roztok látky, která má ke stacionární fázi největší afinitu. Toto – tzv. „vytěšňovadlo“ – uvolňuje ze stacionární fáze všechny předem zadržené složky. Složka, která má nejmenší afinitu ke stacionární fázi, opouští kolonu jako první, jako poslední vytéká vytěšňovadlo. Tato metoda bohužel většinou nevede k úplnému rozdělení složek. Jestliže totiž následující složka má uvolňovat předešlou z interakce se stacionární fází, jsou všechny složky ve vzájemném kontaktu a dochází k jejich částečnému mísení [2].

ELUČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Na kolonu se vnáší jen malá část roztoku směsi analytů a tato se následně eluuje mobilní fází, které má ke stacionární fázi menší afinitu než jakákoliv ze

složek. Složky se pohybují poměrně pomalu a k jejich postupu je také potřeba poměrně velkého množství rozpouštědla. Látky jsou vymývány v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fázi a v ideálním případě od sebe dostatečně rozděleny mobilní fází. Při jednoduché (izokratické) eluci se kolona promývá stále stejnou mobilní fází tak dlouho, až dojde k oddělení jednotlivých složek a oddělené látky postupně opustí kolonu v roztoku eluátu. Stupňovitá (gradientová) eluce se provádí postupným promýváním kolony několika eluenty (proměnlivé složení mobilní fáze), z nichž každý následující má vždy vyšší eluční schopnost. Mobilní fáze postupně uvolňuje jednotlivé složky směsi z vazby na stacionární fázi a vymývá je. Při gradientové eluci se zpravidla postupně mění pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fázi. Gradientový způsob vyvíjení se používá zejména při dělení komplikovanějších směsí, cílem je zkrácení času analýzy a ostřejší rozdělení látek^[1,2].

Skupenství fází

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE – mobilní fáze je kapalina a stacionární fáze je nemísitelná kapalina nebo pevná látka.

PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE – mobilní fáze je plyn a stacionární fáze kapalina nebo pevná látka^[1].

II. TEORETICKÉ ZÁKLADY CHROMATOGRAFICKÉHO PROCESU

Charakteristickou veličinou pro každou látku v daném chromatografickém procesu je její retenční (eluční) čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas t_R je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima píku na chromatogramu a retenční objem V_R je objem mobilní fáze, která proteče kolonou od nástřiku po eluci koncentračního maxima píku. Tyto dvě veličiny spolu souvisí vztahem:

$$V_R = t_R \cdot v$$

kde v je objemový průtok mobilní fáze.

Retenční objem je dán součtem veličin:

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde V'_R je skutečný retenční objem a V_M (mrtvý objem) odpovídá celkovému objemu mobilní fáze od nástřiku až po detektor. U většiny dobře sestrojených přístrojů je tento objem minimální a proto jej lze zanedbat.

Analogicky platí tento vztah i pro retenční čas:

$$t_R = t'_R + t_M$$

kde t'_R je skutečný retenční čas a t_M je mrtvý čas kolony, tj. retenční čas látky, která se v koloně nezadržuje.

Dále se k charakteristice retence používá hmotnostní distribuční poměr D_m (známý jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k), pro který platí vztahy:

$$D_m = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Hmotnostní distribuční poměr D_m vyjadřuje poměr mezi celkovým množstvím chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky ve fázi mobilní. Je přímo úměrný rovnovážnému distribučnímu koeficientu K_C (známý též jako distribuční konstanta), který je vyjádřením poměru koncentrací chromatografované látky v obou fázích.

$$D_m = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

kde V_S je objem stacionární fáze a V_M objem mobilní fáze. Hmotnostní distribuční poměr dovoluje odhadnout eluci látek z kolony v přijatelném čase a retenčním objemu. Pokud je D_m malé (1 až 10), je trvání analýzy krátké.

K popisu účinnosti separace látek se používá veličina rozlišení R_S . Rozlišením se rozumí rozdíl vzdálenosti dvou píků separovaných látek a platí pro ně vztah:

$$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

kde t_1 a t_2 jsou retenční časy píků a w_1 a w_2 jsou šířky píků v polovině jejich výšky. Za dokonalé (píky rozdělené až na základní linii) se považuje hodnota $R_S = 1,5$. Rozlišení souvisí s kapacitním poměrem, distribuční konstantou a účinností.

Separační účinnost kolony se vyjadřuje pomocí parametru účinnosti kolony, který je vyjádřen počtem teoretických pater N , pro která platí:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Při výpočtu množství teoretických pater se používá retenční čas t_R testované látky a šířka píku v polovině jeho výšky w_h . Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

Pro srovnání účinnosti různých kolon se používá parametru výškového ekvivalentu teoretického patra H , který je poměrem délky kolony L vyjádřené v metrech a počtu teoretických pater N dle vztahu:

$$H = \frac{L}{N}$$

Výškový ekvivalent teoretického patra závisí na řadě parametrů, důležitým je průtoková rychlost U . Závislost popisuje Van Deemterova rovnice:

$$H = \frac{A+B}{U+CU}$$

kde A je příspěvek turbulentní difúze, B je příspěvek molekulární difúze, C charakterizuje příspěvek odporu vůči převodu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra. Pro dosažení účinné separace je nutné, aby hodnota ekvivalentu teoretického patra činila 0.01 – 1.00 mm. Dalšími faktory ovlivňujícími tuto veličinu je mimokolonový mrtvý objem a objem analyzovaného vzorku.

Důležitým parametrem je také selektivita kolony. To je míra relativní separace dvou složek směsi:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{D_{m2}}{D_{m1}}$$

Selektivitu v kapalinové chromatografii je možné ovlivnit složením mobilní fáze, změnou pH mobilní fáze, teplotou a také náplní kolony^[7,8,9].

Další parametr hodnocený v chromatografii je poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek. Vypočítá se:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H je výška píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku.

Písmeno h značí absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20-ti násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku pozorovaného v místě rovnoměrně situovaného okolo místa, kde by se tento pík nacházel^[10,11].

III. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv a je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích^[6].

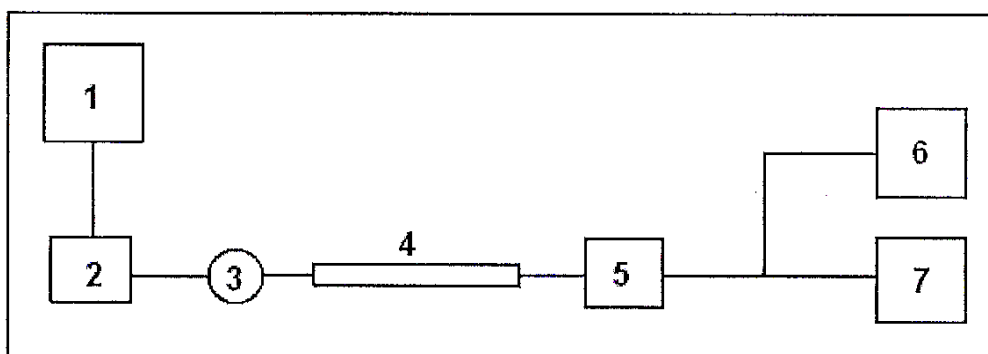
Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. A protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), lze říci, že je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, ve zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech^[1].

INSTRUMENTACE V HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony (může být použit i regulátor teploty kolony), detektoru a zařízení na zpracování dat (integrátoru či počítače). Mobilní fáze je do systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků a protéká obvykle konstantní rychlostí kolonou a poté detektorem^[11].

Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu

1-zásobník(y) mobilní fáze; 2-vysokotlaké čerpadlo; 3-dávkovací zařízení; 4-kolona; 5-detektor; 6.7-zařízení na zpracování dat



Zásobníky mobilní fáze

Konstrukčním materiálem zásobníků bývá nejčastěji sklo, plasty (polyethylen, polypropylen, polytetrafluorethylen) nebo nerezová ocel. Často je třeba zbavit mobilní fázi pohlcených plynů, a proto jsou některé typy zásobníků uzavřené víčkem se dvěma vývody. Jeden vývod je určen pro přívod helia nebo jiného inertního plynu, druhý je pro připojení na vakuovou linku. K propojení chromatografických systémů se většinou používá kapilár z plastů. Mnohem pevnější spojení je voleno u systémů pracujících s vysokými tlaky, kde se užívají kapiláry z nerezové oceli^[7]. U moderních chromatografických systémů je mezi zásobníky mobilní fáze a čerpadlo mobilní fáze zařazen vakový degasér. Toto zařízení představuje nejvhodnější způsob odplynění mobilní fáze.

Čerpadla mobilní fáze

Čerpací systémy jsou potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí na kolonu. Cílem je co nejmenší kolísání tlaků, čehož se dosahuje např. průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. Zároveň je třeba, aby konstrukční materiál čerpacího systému byl chemicky odolný proti korozivním účinkům dopravovaných kapalin.

Výstupní tlak na čerpadlech se pohybuje od 1 do 60 MPa, průtoková rychlost od 0,1 do 10 ml/min, důležitá je dobrá reprodukovatelnost nastavení průtoku a vysoká přesnost. V dnešní době se nejčastěji používají dvou až tří pístová čerpadla s registrací okamžitého tlaku a následnou regulací frekvence impulzů, které řídí chod elektromotoru pumpy. Pro zajištění minimálního kolísání tlaku je nutné dokonalé odplynění mobilní fáze. Čerpadla pracující s konstantním průtokem využívají mechanického pohonu pístu v komoře, kde zdrojem hnací síly jsou elektromotory^[7,11,12].

Dávkovací zařízení

Vzorek určený k chromatografickému dělení se nejprve rozpouští ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi, a následně se dávkuje do kolony.

Účinnost celého chromatografického systému je do značné míry závislá i na dokonalém dávkování vzorku. Dávkovací zařízení používající techniky nástřiku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze se již prakticky nepoužívají. U moderních přístrojů se používají buď smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo dávkovače automatické. Principem je systém pevného pouzdra s otočným jádrem a teflonovými kroužky. Injekční stříkačkou se naplní dávkovací kapilára bez přerušení průtoku mobilní fáze a otočením jádra se zařadí do průtoku. Vzorek je vytlačen proudící mobilní fází na chromatografickou kolonu. Dávkovací zařízení umožňuje vpravení konstantního objemu do kolony, a tak není nutné přesně odměřovat množství vzorku^[7,9,13]. Pro postupné nástřikování většího počtu vzorků (sériové analýzy) se dnes používají programovatelné autosamplery.

Chromatografické kolony (geometrie kolon, náplně)

Chromatografické kolony jsou tvořeny trubicí z různého materiálu, naplněné sorbentem. V dnešní době se trubice zhotovují převážně z antikorozi oceli s leštěným vnitřním povrchem. Do tlaků cca 20 MPa lze použít i kolony ze speciálního tvrzeného skla, které se z bezpečnostních důvodů umísťují do kovového pouzdra^[14].

Pro analytická měření se používají analytické kolony v délce 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 3 – 5 mm. Velikost částic náplně se pohybuje v rozmezí 3 – 10 μm . Díky uvedené zrnitosti dosahují tyto kolony až 5 000 nebo 10 000 teoretických pater na 10 cm délky. U většiny separací se využívá chemicky modifikovaný oxid křemičitý (silikagel), který se upravuje reakcí s různými silanizačními činidly za vzniku kovalentně vázaných silylových derivátů (chemicky vázané stacionární fáze), které pokrývají proměnlivé množství aktivních míst na povrchu, a tak určují jeho vlastnosti. Sorbenty lze rozdělit podle polarity. Nepolárním sorbentem je silikagel modifikovaný na svých hydroxylových skupinách alifatickým řetězcem s 8 nebo s 18 uhlíky ($=\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$, $=\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$). Nepolární sorbenty bývají rovněž označovány „reversed phase“ – RP. Jsou tak nazývány vzhledem k jejich opačným fyzikálně chemickým vlastnostem v porovnání s klasickými polárními sorbenty (tzv. „normální fáze“), které byly do chromatografie zavedeny dříve.

Středně polární fázi bývá tříuhlíkatý řetězec obsahující skupinu –CN, –NH₂, –OH (neboli Si-(CH₂)₃-CN , Si(CH₂)₃-NH₂, Si-(CH₂)₃-OH). Jako polární sorbent se používá silikagel. Je vhodný pro většinu látek mimo silně bazických, které interagují s jeho slabě kyselými hydroxylovými funkcemi. Dále se používá oxid hlinitý vhodný pro dělení nepříliš polárních látek, které se od sebe stericky liší. Mezi polární sorbenty se řadí rovněž oxid hořečnatý^[7,9,11,15,16,17].

Moderní přístroje umožňují použít při dělení látek několik kolon najednou, jedná se o techniku přepínání spřažených kolon (column switching). Kolony bývají napojeny za sebou a mohou se lišit délkou, náplní atd. Technika se používá ke zlepšení separace látek a zkrácení času analýzy^[9].

Detektory

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Zpravidla se požaduje, aby sledovaly koncentraci separovaných složek v eluátu. Klasický detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál detektoru je pak zpracováván integrátorem nebo počítačem.

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze. V podstatě jsou rozlišovány dva typy detektorů – univerzální a selektivní. Na detektor jsou kladeny zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším koncentračním rozmezí
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci^[9].

Tabulka 2: Přehled veličin měřených detektory^[9].

Měřená veličina	Detektor
absorpce záření	spektrofotometrický v ultrafialové, viditelné a infračervené oblasti
index lomu	refraktometrický
intenzita fluorescence	spektrofluorimetrický
elektrolytický proud	polarografický
elektrická vodivost	vodivostní
permitivita	kapacitní, permitivitní
elektroodový potenciál	potenciometrický
ionizační proud	transportní s plamenoionizační detekcí
sorpční teplo (teplota)	mikroadsorpční
radioaktivita	radiometrický

V HPLC jsou nejpoužívanější fotometrické metody pracující v ultrafialové oblasti nebo viditelné oblasti světelného záření, následují detektory spektrofluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické. V dnešní době jsou také stále častěji používány detektory hmotnostní^[14]. Nedávno byl světu představen detektor využívající rozptylu světla látkami (ELSD – Evaporative Light Scattering Detektor), u něhož výrobce deklaruje univerzální použití pro libovolný analyt.

Spektrofotometrické detektory

Proměřují absorpci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra (naprostá většina léčiv jsou bílé krystalické látky). V praxi se uplatňují především UV detektory, event. UV-VIS detektory.

Nejužívanější UV detektory:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm a nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Jsou poměrně jednoduché konstrukce a cenově nejdostupnější.
- UV-VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou (libovolně měnitelná dle potřeb)
- scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva)
- diode array detektor (řízený počítačem, trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo při několika vlnových délkách současně, porovnává poměry absorbancí)

Spektrofotometrické detektory se vyznačují značnou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je použít při gradientové eluci^[6].

Spektrofluorimetrické detektory

Využívají se v případech, kdy analyzované léčivo (rozkladný produkt) vykazuje fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory, zato však citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci^[6].

Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, tj. oxidačně-redukčních změn, jež probíhají na fázovém rozhraní roztok – elektroda. Ampérometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné nebo oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Používá se dvoelektrodových nebo častěji tříelektrodových systémů (skládajících se z měrné, srovnávací a pomocné elektrody).

Ampérometrické detektory využívají tuhé měrné elektrody zhotovované nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, grafitové pasty nebo kovů. Nevýhodou těchto materiálů je zanášení a postupná deaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce a nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru při kvantitativní analýze.

Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se pravidelně obnovuje povrch.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Umožňují dosáhnout větší citlivosti detekce než ampérometrické detektory^[9,14].

Elektrochemické detektory umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti (detekční limit 10^{-9} až 10^{-11} g/ml). Důležité při jejich používání je důkladné odplynění mobilní fáze, tak aby bylo dosaženo stabilní nulové linie a dobré reprodukovatelnosti výsledků. Základním předpokladem je vodivá mobilní fáze, takže tyto detektory nelze použít při chromatografii v systémech s normálními fázemi.

Refraktometrické detektory

Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony s obsahem analytu. Jsou prakticky univerzální (vyhodnotí jakoukoliv látku), při analytickém hodnocení léčiv se však používají ojedinele pro poměrně velké nevýhody – především výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování (odezva detektoru je značně závislá na teplotě) a nelze je použít při gradientové eluci^[6].

Hmotnostní detektory

Pro detekci léčiv je v poslední době stále častěji využíváno též spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). U hmotnostní detekce je nutné po výstupu z HPLC kolony z eluátu odstranit mobilní fázi. Molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru dále ionizovány nárazy elektronů či termoionizací a vzniklé nabitě částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou následně separovány

v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli podle hmotnosti a náboje, je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně velmi náročné^[6].

Zařízení pro zpracování dat

K vyhodnocení a dalšímu zpracování chromatografických dat se dříve používaly jedno i vícekanálové integrátory vybavené mikroprocesorem. Dnes se používají hlavně počítače vybavené speciálním softwarem pro zpracování chromatografických dat. Počítač navíc přímo ovládá pracovní parametry chromatografu (složení mobilní fáze, průtok mobilní fáze, teplota, citlivost detektoru)^[14] a je tak zároveň řídicí jednotkou i vyhodnocovacím zařízením.

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA HPLC CHROMATOGRAMU

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Některé moderní UV detektory umožňují v maximu chromatografického píku sejmout UV spektrum; shoda UV spekter vzorku a standardu je další identifikační charakteristikou.

Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha (event. výška) chromatografického píku. Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají dvě metody:

A) **Metoda vnějšího standardu**, která spočívá ve dvou krocích (dvojm dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.

B) **Metoda vnitřního standardu** – ke známému roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní vůči ostatním analytů ve směsi^[6,15].

IV. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je demonstrovat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné i různých laboratořích.

Validace se provádí při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, má-li být přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod.

Analytické metody používané pro monitorování kvality léčiv musí splňovat určité požadavky, které vyplývají ze zamýšleného použití. Podle toho, k jakému účelu má analytická metoda sloužit, ověřují se následující parametry:

- správnost
- přesnost
- selektivita
- detekční limit
- kvantitativní limit
- linearita
- rozsah
- robustnost

Správnost (Accuracy)

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Zjistit správnou hodnotu může být problém. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Nejsou-li k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje se přípravek se známým přídavkem standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost:^[15]

$$\text{výtěžnost} = 100 \cdot \frac{\text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

Přesnost (Precision)

Přesnost analytické metody je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování metody se rozlišuje opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na tomtéž přístroji, se stejnými činidly, na jednom zhomogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji. V tomto případě jde o přesnost při přenosu metody z jedné laboratoře do druhé.

Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze šesti nezávislých analýz zhomogenizovaného vzorku, provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Jedná se tedy o chybu celého analytického postupu, jak instrumentální části, tak postupu přípravy vzorku. Nestačí proto např. šestkrát nastříknout jeden vzorek, ale je nutné připravit kompletním postupem šest roztoků vzorku^[16].

Selektivita (Selectivity)

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrix¹). Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s maticí. Interference matrice se projevuje tím, že analytický signál neodpovídá stanovovanému analytu, ale tento signál je superponován signálem rušivé složky (čistota signálu). Prokazování selektivity metody je do jisté míry závislé na použité instrumentální technice, a proto je nutné pro každý použitý systém vypracovat individuální program prokazování selektivity metody^[17].

¹ „matrix“ – pro celou práci se používá anglického výrazu v jediném gramatickém tvaru.

Detekční limit (LOD - Limit Of Detection)

Vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která není stanovovaná kvantitativně. U neinstrumentálních metod se detekční limit hledá experimentálně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku^[15].

Kvantitativní limit (LOQ - Limit Of Quantification)

Je též parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10^[15].

Linearita (Linearity)

Je to schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Pokud je metoda lineární, lze s výhodou určit směrnice z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, je třeba výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky^[15].

Rozsah (Range)

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně^[15].

Robustnost (Robustness)

Robustnost je míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Je to míra schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým nutně dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když popsany postup zůstává zachován. Hodnotí míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky^[16].

V. EXTRAKCE Z KAPALINY DO KAPALINY

Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction – LLE) se používá jako technika předúpravy vzorků (nejenom biologických materiálů) již po mnoho let. V analýzách léčiv se jí běžně rozumí přímá extrakce biologického materiálu rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Během LLE dochází k rozdělování analytu mezi organickou a vodnou fází až do ustavení rovnováhy popisované Nernstovým distribučním zákonem^[18, 19, 20]. Distribuce látky mezi dvěma fázemi je přitom ovlivňována mnoha faktory, které je nutné uvažovat při výběru extrakčního činidla. Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími LLE jsou:

- fyzikálně chemické vlastnosti rozpouštědla
- pH vodné fáze
- vzájemný poměr fází
- způsob a doba trvání extrakce
- toxicita rozpouštědel^[21]

Základním požadavkem LLE přitom je, aby se analyt přednostně distribuoval do organické fáze.

Pokud jsou výtěžky extrakce nízké, je možné provádět extrakce několikanásobné, případně následné (rozpouštědly z eluotropní řady), i když v praxi se často extrahuje pouze jednou velkou dávkou rozpouštědla s cílem ušetřit laboratorní čas při dosažení stejně dobrých výsledků.

Výběr extrakčního činidla

Relativní lipofilita či hydrofobicita analytu určuje výběr extrakčního činidla. Rozpouštědlo vhodné pro extrakci by mělo mít nízký bod varu, aby se dalo na konci extrakce účinně odstranit a nízkou viskozitu, aby se dobře mísilo s matrix vzorku. Rozpouštědla používaná pro LLE se rozlišují a vybírají podle polarit (eluotropická řada). Faktorem, který se rovněž bere do rozvahy při provádění LLE, je množství vody, které se rozpouští v daném extrakčním činidle, neboť obsah vody v rozpouštědle významně ovlivňuje množství ko-extrahovaných interferujících

součástí matrix ve finálním extraktu. Obecně lze říci, že při extrakcích biologických vzorků platí: čím méně polární je rozpouštědlo, tím větší bývá selektivita extrakce. Rozpouštědlem volby je tedy obvykle to nejméně polární, ve kterém je analyt ještě rozpustný. (Problematiku výběru extrakčního činidla velmi pěkně zpracoval R. D. McDowall^[18], podrobnosti viz. s.18).

LLE v praxi

Úspěšnost extrakce do značné míry závisí na **pH extrahovaného materiálu**, ve kterém by analyt měl být v neionizované formě, aby se podpořil jeho přechod do organické fáze. Doporučuje se proto taková úprava pH vodné fáze, při které existuje jistota, že extrahovaná molekula nenesou ionty. Navíc vhodná úprava pH vzorku umožňuje frakcionaci extraktů na kyselou, neutrální a bazickou frakci, kteréžto lze dále jednotlivě zpracovávat .

Mísení a tvorba emulzí. Mísení je výhodné pro rychlé dosažení extrakční rovnováhy, kdy dochází k účinnějšímu styku fází, nadbytek organického rozpouštědla zvětšuje povrch mezi fázemi. K mísení se používá nejrůznějších mechanických míchaček (zprostředkují válení, obracení, kutálení, otáčení nebo víření extrahované směsi), případně se mísí ručně. A ačkoliv je míchání fází pro LLE velmi výhodné, přináší s sebou i některé problémy.

Nejvýznamnějším z nich je, bez ohledu na způsob mísení, tvorba emulzí, které lze jen velmi obtížně rozdělit na původní fáze. Často nelze emulzní soustavy zvrátit ani centrifugací či ultrasonifikací. Tvorba emulzí způsobuje ztráty analytu jejich okluzí do zpravidla vnitřní fáze emulze, snižuje se extrakční účinnost. Prevencí emulgace extrahované směsi je méně energické míchání a použití menších objemů extrakčního činidla.

Odstranění rozpouštědla (např. odpařováním, vymrazováním v tekutém dusíku, odpipetováním atd.) je často limitujícím krokem v rámci LLE, rovněž přináší problémy:

- nebezpečná je práce se samotným rozpouštědlem, neboť až na výjimky se v LLE používají toxické a hořlavé látky (vznikající páry je nutné účinně ventilovat)

- způsoby odpařování rovněž přinášejí rizika, která vedou k nižším výtěžkům extrakcí způsobeným degradací analytů teplem, jejich vytěkáním nebo adsorpcí na stěny laboratorního skla

- odstraňování větších nadbytků extrakčního činidla je časově náročné, prodražuje předseparaci vzorků

Shrnutí

LLE je v současnosti stále ještě jedna z nejvyžívanějších technik předúpravy biologických vzorků, velmi přizpůsobivá, dobře zdokumentovaná, jednoduchá (nevyžaduje složité zařízení), umožňuje extrakce jak stopových koncentrací, tak velkého množství látek^[21]. Přes své přednosti vzhledem ke zmíněným nevýhodám je tato technika stále více nahrazována solid phase extraction (SPE) a preparativní HPLC, zvláště u rutinních aplikací. LLE lze rovněž použít k efektivnímu zpracování velkého množství vzorků, může být prováděna v šaržích, nicméně, časté přenášení solutů během LLE činí tento proces náročný na laboratorní práci i čas.

VI. FARMAKOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA BENZIMIDAZOLŮ

VI.1. Helmintózy přežvýkavců

Helmintózy, nemoci způsobené parazitujícími červy, představují jednu z nejrozšířenějších příčin ohrožení zdravotního stavu hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Chovatelům hospodářských zvířat působí tyto nemoci značné ekonomické ztráty, samotným zvířatům pak velké zdravotní problémy a předčasnou smrt^[22].

Jediným zatím všeobecně dostupným prostředkem v boji s parazitujícími červy je farmakoterapie a profylaxe s využitím vhodných anthelmintik. Situaci však komplikuje skutečnost, že počet dostupných léčiv je relativně velmi malý a během uplynulých desetiletí se značně snížila jejich účinnost. Parazité postupně vytvořili mechanismy, kterými se úspěšně brání toxickému působení anthelmintik a tak v posledních desetiletích se léková rezistence mnohých druhů červů stala celosvětovým problémem^[23].

Mechanismů navození rezistence helmintů je řada typů. Např. u některých kmenů *Haemonchus contortus* rezistentních na některá benzimidazolová anthelmintika byla prokázána mutace genu pro β -tubulin, která chrání mikrotubuly parazita před atakem benzimidazoly. Jinou účinnou obrannou strategií helmintů je modulace aktivity membránových transportérů, čímž se buď sníží prostup anthelmintik do organismu parazita nebo naopak zvýší aktivní odstranění léčiva z parazita. Posledně zmíněná strategie byla popsána i u kmene *Haemonchus contortus* rezistentního na ivermektin. Přes intenzivní studium mnoho mechanismů navození rezistence zůstává neobjasněno. V poslední době se ukazuje, že v řadě případů navozené lékové rezistence helmintů mohou hrát významnou roli biotransformační enzymy, a to jak parazita, tak i hostitele^[24].

Výzkum biotransformačních enzymů hostitele a parazita (jako modelový červ byl vybrán *Haemonchus contortus*, vlasovka slézová, čeleď *Trichostrongylidae*, *Nematoda*, častý a relativně velmi patogenní parazit domácích i volně žijících přežvýkavců působící nematodózy trávicího traktu) a jejich význam pro terapii helmintóz a helmintorezistenci u přežvýkavců jsou součástí projektu, v rámci kterého vznikala tato rigorózní práce.

VI.2. Farmakoterapie benzimidazoly ve veterinární medicíně

Skupina benzimidazolových anthelmintik je velmi rozsáhlou skupinou především antinematod odvozenou od jediné chemické struktury. Část léčiv skupiny benzimidazolových anthelmintik má kromě antinematodních, příp. anticestodních i antitreumatodní účinky. K těmto tzv. širokospektrým anthelmintikům patří albendazol, fenbendazol, triklabendazol, netobimin, febantel a thiofanat. Zmíněné benzimidazoly jsou indikovány proti fasciliózám a dikrocelióze především domácích, ale i volně žijících přežvýkavců.

Mechanismus účinku benzimidazolů je založen na inhibici energetického metabolismu parazitujících červů. Většina léčiv skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky rovněž oxicidně. Jejich anthelmintická aktivita je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. U monogastrických zvířat (např. pes, kočka, prase) je většinou třeba opakovaného podání léčiva, u polygastrických zvířat či dalších býložravců (skot, ovce, kůň ad.) lze benzimidazoly podávat i jednorázově. Léčiva netobimin, febantel a thiofanat jsou proléčivý účinných metabolitů. K léčivům celé skupiny benzimidazolů se může vyvinout rezistence.

K základním indikacím benzimidazolů patří nematodózy plic, gastrointestinálního traktu, příp. dalších orgánů a tkání. Používají se u druhů: *bos taurus*, *ovis ammon*, *sus scrofa*, *canis lupus*, *felis silvestris*, *equus caballus*, *capra aegagrus*, dále u drůbeže, lovné zvěře, holubů.

Léčiva nemají závažné nežádoucí účinky, u některých druhů zvířat vyvolávají nauzeu, vomitus, průjem.

U části léčiv skupiny je kontraindikováno podání laktujícím přežvýkavcům s produkcí určenou pro lidský konzum, podání koním chovaným k jatečným účelům, podání zvířatům s poruchami jater a ledvin. Část benzimidazolů negativně ovlivňuje vývoj ranných stádií plodu.

Terapeutické dávky jsou závislé na konkrétních látkách a jejich způsobu podání zvířatům, obecně se pohybují v jednotkách až desítkách mg/kg živé hmotnosti. Při nedostatečném účinku se benzimidazolová anthelmintika mohou kombinovat.

Benzimidazoly jsou zvířatům podávány individuálně i hromadně perorálně, parenterálně i.m., s.c., lokálně zevně. Léčivé přípravky náleží do kategorií veterinárních přípravků, jsou zatíženy ochrannými lhůtami (OL)^[25].

VI.2.1. Albendazol

Albendazol {methyl [5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl] karbamát} je jedním ze skupiny benzimidazolových anthelmintik používaných v současné veterinární praxi.

Mechanismus účinku tohoto léčiva spočívá v inhibici polymerizace mikrotubulů parazita. Odlišnou afinitou k tubulinu parazitických červů a savčímu tubulinu se vysvětluje selektivní toxicita látky vůči helmintům. Albendazol působí rovněž interferencí s energetickým metabolismem červů, kdy inhibuje fumarát reduktasu. Inhibice enzymu fumarát reduktasy vede k depleci adenosin trifosfátu (ATP) a vyhladovění červa.

Absorpce albendazolu je poměrně rozsáhlá oproti jiným používaným benzimidazolům. Po perorální aplikaci 20 mg/kg živé hmotnosti látky telatům se dosahuje maximálních hladin v plazmě odpovídajících 5,5 mg albendazolu zhruba za 15 hodin po podání. Z podané dávky se asi 28% exkretuje do moči v průběhu 24 hodin, 47% v průběhu dalších 9 dnů. Albendazol se v těle metabolizuje především na albendazol-sulfoxid a albendazol-sulfon, které jsou vyloučeny zejména močí. Residua léčiva jsou nacházena v játrech a ledvinách (množství 0,4 a 0,3 mg/g 30 dnů po ukončení léčby), ze svalů a tuku mizí během týdne (0,1 mg/g 5 den od ukončení léčby)^[26].

Spektrum terapeutického působení albendazolu zahrnuje červy: *Bunostomum*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia*, *Strongyloides*, *Trichostrongylus*, *Dictyocaulus*, *Monezia*, *Fasciola hepatica* a *Dicrocoelium dendriticum* sužující skot a ovce. Léčivo působí na dospělé i larvy helmintů^[26], v případě obličných červů působí rovněž ovicidně^[27]. Zvířata léčená albendazolem nesmějí být porážena během terapie a dalších 21 dní po ukončení léčby. Léčivo je kontraindikováno u skotu, který produkuje mléko určené pro lidský konzum(OL)^[26].

VI.2.2. Flubendazol a jeho metabolity

Flubendazol {methyl [5-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl] karbamát} je širokospektrým benzimidazolovým anthelmintikem podobně jako albendazol, od něhož se neliší ani mechanismem účinku (mechanismus účinku, spektrum působení ad. viz. VI.2.1.). Flubendazol je používán nejenom v terapii helmintóz skotu a ovcí, ale rovněž u drůbeže a vepřů.

Parentní flubendazol bývá nacházen v krevní plazmě po i.v. podání zvířatům zhruba za 36 hodin, kdy dosahuje svých nejvyšších plazmatických koncentrací. Jeho metabolity: desethylkarboxyflubendazol (hydrolyzovaný, FLU-H) a redukovaný flubendazol (FLU-R) se objevují v plazmě už za 5 minut po i.v. aplikaci (hodnoceno u ovcí). Redukovaný metabolit flubendazolu vzniká činností jaterních mikrosomálních enzymů. Oba metabolity si zachovávají účinnost proti helmintům^[27].

Experimentální část

1. POUŽITÝ MATERIÁL

1.1. Experimentální zvířata a biologický materiál

K optimalizaci extrakce a separace flubendazolu a jeho metabolitů bylo využito několik typů biologických vzorků.

Z homogenátu jater potkaních samců kmene Wistar (o váze 250-300 g) byly diferenční centrifugací připraveny subcelulární frakce (mikrosomy a cytosol). Dále bylo použito dospělců *Haemonchus contortus* (vlasovky slézové), čeledě *Trichostrongylidae*, *Nematoda*, získaných z experimentálně infikovaných ovcí domácích. Dospělci byli homogenizováni a zpracováni na subcelulární frakce (frakce A obsahující převážně mitochondrie, frakce B obsahující převážně cytosol a frakce C obsahující zejména mikrosomy)^[29]. Takto získaný biologický materiál byl uchováván v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

K experimentům byli dále používáni mladí samci a samice ovce domácí (*Ovis ammon* f. *aries*) stáří 2-3 měsíce, plemeno merinolandshaf, dodané ZEM a.s. Nový Bydžov, chované za standardních podmínek. Zvířata byla rozdělena do skupin: A) zdravá, neléčená B) infikovaná *Haemonchus contortus*, neléčená C) zdravá, ošetřovaná flubendazolem D) infikovaná *Haemonchus contortus* a léčená flubendazolem.

V rámci rigorózní práce byly hodnoceny vzorky zvířat ze skupiny A a C. Experimentální skupina A – tj. zdravá zvířata bez medikace - byla utracena 24.4.06 a vzorkována – číslo 17598 (beránek, nar. 1.12.05), 17599 (beránek, nar. 1.12.05), 17604 (beránek, nar. 10.12.05), 22184 (jehnička, nar. 2.12.05), 22186 (jehnička, nar. 12.2.05). Zvířata ze skupiny C – tj. léčená flubendazolem bez infekce vlasovkou slézovou – byla vzorkována následovně: číslo 17605 (beránek, nar. 10.12.05), 17606 (beránek, nar. 10.12.05), 19073 (beránek, nar. 13.12.05), 19076 (beránek, nar. 24.12.05), 22196 (jehnička, nar. 25.12.05), 22197 (jehnička, nar. 25.12.05), 22198 (jehnička, nar. 25.12.05), 22199 (jehnička, nar. 26.12.05). Zvířatům skupiny C byl podáván flubendazol formou orální suspenze v dávce 15 mg/kg ž.hm., 3 dny po sobě. K přípravě suspenze

byl použit Flubenol 50% premix, suspenze byla podávána v objemu 20ml/25 kg ž.hm. Zvířatům byly v průběhu aplikace anthelmintika flubendazolu odebírány vzorky krve (plazmy) a po usmrcení byla odebrána játra, tenké střevo, žlučník a močový měchýř. V plasmě byl pomocí HPLC kvantifikován metabolit flubendazol redukováný.

Všechny experimenty probíhaly v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny etickou komisí pro laboratorní zvířata při FaF UK HK.

1.2. Chemikálie

Flubendazol (Janssen Pharma), zkratka FLU

Desethylkarboxyflubendazol (Janssen Pharma), zkratka FLU-H (FLU hydrolyzovaný)

Flubendazol redukováný (Janssen Pharma), zkratka FLU-R

Albendazol (Sigma-Aldrich), vnitřní standard (IS) pro HPLC, zkratka ALB

Methanol Chromasolv (Riedel-de Haen)

Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), zkratka ACN

Dimethylsulfoxid (Fluka), zkratka DMSO

Isopropylalkohol (Merck)

Terc-butyl-methylether (Sigma-Aldrich), zkratka tBME

Octan ethylnatý pro HPLC (Sigma-Aldrich), zkratka OE

Amoniak 25% (Lachema Neratovice)

Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , (Lachema Neratovice)

Kyselina orthofosforečná 85%, H_3PO_4 , (Lachema Neratovice)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, (Penta Chrudim)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (Penta Chrudim)

NADPH 10 mM roztok (Katedra biochemie FaF UK HK)

Ultračistá voda čištěná reverzní osmózou (FaF UK HK)

1.3. Pomůcky a přístroje

skleněné zábrusové zkumavky, lahvičky, kádinky, odměrné baňky, mikrozukavky

vialky 2 ml, čistota 100/PK (Agilent Technologies)
automatické pipety 0,1–2,5 µl (Eppendorf), 2-20µl (Labsystems), 5-40 µl, 40-200µl, 100-1000µl, 1-5ml (Biohit Proline), plastové špičky pro jednorázové použití (Sarstedt)
nástroje na navažování – lodička, kovové lžičky a kopistky
skleněná aparatura na filtrování MF (filtr 0,45 µm x 47mm), Supelco
ultrazvukový generátor, Velp Scientifice
analytické váhy Sartorius, Gottingen
pH-metr Jenway 3020, Dunmow, Essen, UK
laboratorní míchačka Variomag Electronicrührer MONO
třepačka MS2 Minishaker, IKA
centrifuga 5415D , Eppendorf, Hamburg
termoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf
koncentrátor 5301 AG, Eppendorf, Hamburg
fluorimetr Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic, USA
kyvety pro fluorescenci
kapalinový chromatograf Shimadzu LC, (analytický software – CLASS-VP), Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
předkolona Thermo-Hypersil, 10x4 mm, náplň BDS-Hypersil-C8 (5µm), Thermo-Hypersil
předkolona LiChrospher 60, 4x4 mm, náplň RP-select B (5µm), Hewlett Packard
kolona LiChroCART, 250x3 mm, LiChrospher 60, RP-select B (5 µm), Hewlett Packard

2. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

2.1. Příprava fosforečnanového pufru 0,025M, pH = 3,07

Fosforečnanový pufr byl připraven rozpuštěním 1,70 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 500 ml odměrné baňce, doplněním ultračistou vodou po značku. Obsah baňky byl intenzivně protřepán, pH upraveno přidávkem kyseliny orthofosforečné 85% na hodnotu 3,07.

2.2. Příprava fosfátového pufru 0,1M, pH = 7,40

Fosfátový pufr byl připraven sléváním 4 dílů 0,1M hydrogenfosforečnanu sodného (navážka 35,80 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml H_2O) a 1dílu dihydrogenfosforečnanu sodného (navážka 3,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /250 ml H_2O) v kádince za stálého míchání (na míchačce) a kontroly pH (na pH metru) do dosažení požadované hodnoty pH 7,40.

2.3. Příprava základních roztoků léčiv a metabolitů flubendazolu v DMSO

2.3.1. Příprava základního roztoku albendazolu

Množství 0,01326 g albendazolu navážené na analytických vahách bylo kvantitativně přeneseno do 10 ml odměrné baňky, doplněno DMSO do 10 ml. Rozpouštění substance bylo urychleno 1,5 min třepáním na laboratorní třepačce 1800 otáček/min. Byl tak získán roztok o koncentraci 10 mmol/l.

2.3.2. Příprava základního roztoku flubendazolu

K množství 0,00156 g flubendazolu naváženému do vialky na analytických vahách bylo automatickou pipetou přidáno 500 μl DMSO, vialka uzavřena. Rozpouštění substance bylo podpořeno ponecháním 3 min na ultrazvukovém generátoru při 25 kHz. Byl tak získán roztok o přibližné koncentraci 10 mmol/l, přesná koncentrace činila 9,958 mmol/l.

2.3.3. Příprava základního roztoku desethylkarboxyflubendazolu

K množství 0,00134 g desethylkarboxyflubendazolu naváženému do vialky na analytických vahách bylo automatickou pipetou přidáno 500 µl DMSO, vialka uzavřena. Rozpouštění substance bylo podpořeno ponecháním 3 min na ultrazvukovém generátoru při 25 kHz. Byl tak získán roztok o přibližné koncentraci 10 mmol/l, přesná koncentrace činila 10,497 mmol/l.

2.3.4. Příprava základního roztoku redukováného flubendazolu

K množství 0,00156 g redukováného flubendazolu naváženému do vialky na analytických vahách bylo automatickou pipetou přidáno 500 µl DMSO, vialka uzavřena. Rozpouštění substance bylo podpořeno ponecháním 3 min na ultrazvukovém generátoru při 25 kHz. Byl tak získán roztok o přibližné koncentraci 10 mmol/l, přesná koncentrace činila 10,086 mmol/l.

2.3.5. Příprava základního roztoku mebendazolu

K množství 0,01475 g mebendazolu naváženému do lahvičky na analytických vahách bylo automatickou pipetou přidáno 5,0 ml DMSO, lahvička byla uzavřena parafilmem M. Rozpouštění substance bylo podpořeno ponecháním 3 min na laboratorní třepačce při 2200 otáčkách/min. Byl tak získán roztok o koncentraci 10 mmol/l.

2.4. Příprava a přehled standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci chromatogramů

Příprava standardních roztoků pro kalibraci chromatogramů se shoduje s přípravou roztoků k hodnocení opakovatelnosti chromatografie se spektrofotometrickou (roztok FLU-H, FLU-R, FLU 5,0 mmol/l, roztok ALB 10,0 mmol/l) a spektrofluorimetrickou detekcí (roztok FLU-R 0,075 mmol/l, ALB 0,100 mmol/l). K hodnocení opakovatelnosti bylo použito pouze některých z dále uvedených roztoků a jejich příprav. Roztoky byly dále zpracovávány LLE (viz. následující 3.2.)

2.4.1. Příprava standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

Standards byly získány zředováním základních roztoků (viz. 2.3.) DMSO ve vialkách. Příslušné objemy základních roztoků a DMSO byly do vialek přenášeny mikropipetou, po smísení ponechány 1 min na ultrazvukovém generátoru při 25 kHz pro dokonalé promísení substancí. Byla provedena LLE (viz. 3.1.) a extrakty byly odpařeny do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.4.2. Přehled standardních roztoků léčiv a metabolitů pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

2.4.2.I. Standardní roztoky flubendazolu pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

Standardní roztok 7,5 mmol/l FLU byl získán smísením 300 μ l FLU 10 mmol/l a 100 μ l DMSO, standardní roztok 6,5 mmol/l smísením 260 μ l FLU 10 mmol/l a 140 μ l DMSO, standardní roztok FLU 5 mmol/l smísením 200 μ l FLU 10 mmol/l a 200 μ l DMSO, standardní roztok 3,3 mmol/l smísením 132 μ l FLU 10 mmol/l a 268 μ l DMSO, standardní roztok 2,5 mmol/l smísením 100 μ l FLU 10 mmol/l a 300 μ l DMSO, standardní roztok 1,2 mmol/l smísením 48 μ l 10 mmol/l FLU a 352 μ l DMSO. Jako standard FLU 10 mmol/l posloužil základní roztok 2.3.2.

2.4.2.II. Standardní roztoky desethylkarboxyflubendazolu pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

Příprava standardních roztoků 7,5 mmol/l, 6,5 mmol/l, 5,0 mmol/l, 3,3 mmol/l, 2,5 mmol/l a 1,2 mmol/l FLU-H se dělá obdobným způsobem uvedeným ve 2.4.2.I. míšením základního roztoku FLU-H 10 mmol/l a DMSO. Jako standard FLU-H 10 mmol/l posloužil základní roztok 2.3.3.

2.4.2.III. Standardní roztoky redukovaného flubendazolu pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

Příprava standardních roztoků 7,5 mmol/l, 6,5 mmol/l, 5,0 mmol/l, 3,3 mmol/l, 2,5 mmol/l a 1,2 mmol/l FLU-R se dělá obdobným způsobem uvedeným ve 2.4.2.I. míšením základního roztoku FLU-R 10 mmol/l a DMSO. Jako standard FLU-R 10 mmol/l posloužil základní roztok 2.3.4.

2.4.2.IV. Standardní roztok albendazolu (IS) pro kalibraci spektrofotometricky detekovaných chromatogramů

Jako vnitřní standard ALB 10 mmol/l posloužil základní roztok 2.3.1.

2.4.3. Příprava standardních roztoků redukovaného flubendazolu a albendazolu pro kalibraci fluorescenčně detekovaných chromatogramů

2.4.3.I. Příprava standardních roztoků redukovaného flubendazolu pro kalibraci fluorescenčně detekovaných chromatogramů

Standardní roztok 0,1 mmol/l FLU-R byl získán smísením 10 μ l základního roztoku FLU-R (2.3.4.) a 990 μ l DMSO, standardní roztok 0,075 mmol/l smísením 10 μ l standardního roztoku 7,5 mmol/l FLU-R (viz. 2.4.2.III.) a 990 μ l DMSO, standardní roztok 0,050 mmol/l smísením 10 μ l standardního roztoku 5 mmol/l FLU-R (viz. 2.4.2.III.) a 990 μ l DMSO, standardní roztok 0,025 mmol/l FLU-R smísením 10 μ l standardního roztoku 2,5 mmol/l FLU-R (viz. 2.4.2.III.) a 990 μ l DMSO, standardní roztok 0,012 mmol/l FLU-R smísením 10 μ l standardního roztoku 1,2 mmol/l (viz. 2.4.2.III.) a 990 μ l DMSO. Standardní roztok 0,035 mmol/l FLU-R a standardní roztok 0,060 mmol/l FLU-R byly získány zředováním standardního roztoku 0,1 mmol/l FLU-R následovně: standardní roztok 0,035 mmol/l byl získán smísením 350 μ l standardního roztoku 0,1 mmol/l FLU-R a 650 μ l DMSO, standardní roztok 0,060 mmol/l smísením 600 μ l standardního roztoku 0,1 mmol/l FLU-R a 400 μ l DMSO. Příslušné objemy standardních roztoků a DMSO byly do vialek přenášeny mikropipetou, po smísení ponechány 1 min na ultrazvukovém generátoru při 25

kHz pro dokonalé promísení substancí. Následně byla provedena LLE (viz. 3.1.) a extrakty byly odpařeny do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.4.3.II. Příprava standardního roztoku albendazolu (IS) pro kalibraci fluorescenčně detekovaných chromatogramů

Standardní roztok 0,1 mmol/l ALB byl získán smísením 10 µl základního roztoku 10 mmol/l ALB (viz. 2.3.1.) a 990 µl DMSO ve vialce. Příslušné objemy základního roztoku a DMSO byly do vialek přenášeny mikropipetou, po smísení ponechány 1 min na ultrazvukovém generátoru při 25 kHz pro dokonalé promísení substancí. Následně byla provedena LLE (viz. 3.1.) a extrakt byl odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.5. Příprava a přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření

2.5.1. Příprava roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztoky byly připraveny zředěním základních roztoků léčiv a metabolitů v DMSO (viz. 2.3.) mobilní fází používanou při chromatografii. Do 10 ml odměrné baňky bylo mikropipetou přeneseno 100 µl základního roztoku příslušného analytu, 2970 µl ACN a protřepáno na laboratorní třepačce 0,5 min při 1800 otáčkách/min, dále bylo přidáno 6930 µl fosforečnanového pufru 0,025M o pH = 3,07 a směs byla opět protřepána na laboratorní třepačce 0,5 min při 1800 otáčkách/min. Takto byly získány čiré roztoky.

2.5.2. Přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžná spektrofluorimetrická měření

2.5.2.I. Roztok flubendazolu pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztok byl získán ředěním základního roztoku FLU 10 mmol/l v DMSO (viz. 2.3.2.) mobilní fází pro chromatografii, která se skládá z ACN a

fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) smíšených v poměru 3:7 (v/v) postupem popsaným 2.5.1.

2.5.2.II. Roztok desethylkarboxyflubendazolu pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztok byl získán ředěním základního roztoku FLU-H 10 mmol/l v DMSO (viz. 2.3.3.) mobilní fází pro chromatografii, která se skládá z ACN a fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) smíšených v poměru 3:7 (v/v) postupem popsaným 2.5.1.

2.5.2.III. Roztok redukováného flubendazolu pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztok byl získán ředěním základního roztoku FLU-R 10 mmol/l v DMSO (viz. 2.3.4.) mobilní fází pro chromatografii, která se skládá z ACN a fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) smíšených v poměru 3:7 (v/v) postupem popsaným 2.5.1.

2.5.2.IV. Roztok albendazolu pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztok byl získán ředěním základního roztoku ALB 10 mmol/l v DMSO (viz. 2.3.1.) mobilní fází pro chromatografii, která se skládá z ACN a fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) smíšených v poměru 3:7 (v/v) postupem popsaným 2.5.1.

2.5.2.V. Roztok mebendazolu pro předběžná spektrofluorimetrická měření

Roztok byl získán ředěním základního roztoku mebendazolu 10 mmol/l v DMSO (viz. 2.3.5.) mobilní fází pro chromatografii, která se skládá z ACN a fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) smíšených v poměru 3:7 (v/v) postupem popsaným 2.5.1.

2.6. Příprava a přehled roztoků léčiv a metabolitů pro předběžné chromatografické analýzy

2.6.1. Příprava testovacího roztoku albendazolu

K množství 0,00133 g albendazolu naváženému na analytických vahách do kádinky bylo přidáno mikropipetou 5 ml DMSO. Rozpouštění substance bylo urychleno 1,5 min třepáním na laboratorní třepačce 1800 otáček/min. Byl tak získán čirý roztok o koncentraci 1 mmol/l. Dále bylo z roztoku 1 mmol/l ALB odebráno 5 μ l, se kterými byla provedena LLE postupem uvedeným pod 3.1. Extrakt byl odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.6.2. Přehled roztoků FLU, FLU-H a FLU-R používaných pro předběžné chromatografické analýzy

2.6.2.I. Testovací roztok FLU

K testování vhodných chromatografických podmínek byl použit 1 μ l základního roztoku FLU 10 mmol/l (viz. 2.3.2.), se kterým byla provedena LLE postupem uvedeným pod 3.1. Extrakt byl odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.6.2.II. Testovací roztok FLU-H

K testování vhodných chromatografických podmínek byl použit 1 μ l standardního roztoku FLU-H 5 mmol/l (viz. 2.4.2.II.), se kterým byla provedena LLE postupem uvedeným pod 3.1. Extrakt byl odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.6.2.III. Testovací roztok FLU-R

K testování vhodných chromatografických podmínek byl použit 1 μ l základního roztoku FLU-R 5 mmol/l (viz. 2.4.2.III.), se kterým byla provedena

LLE postupem uvedeným pod 3.1. Extrakt byl odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut.

2.7. Přehled roztoků použitých pro měření limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) při analýze léčiv v biologických materiálech

Pro měření limitů detekce a kvantifikace chromatografických analýz byly použity konkrétní limitní roztoky (viz. tabulka 3 a 4), s nimiž byla provedena LLE v závislosti na způsobu detekce [(1µl roztoku FLU nebo FLU-H nebo FLU-R + 1µl ALB (IS) v případě detekce spektrofotometrické a 1µl FLU-R + 1 µl ALB (IS) v případě spektrofluorimetrické detekce]. Postupy uvedenými pod 3.2. (přídavek cytosolové frakce homogenizátu jater potkaních samců kmene Wistar, který byl použit jako biologický materiál pro přípravu limitních vzorků k ověření LOD a LOQ měřených vzorků *Haemonchus contortus*, jež byly dodány k analýze v podobě odparků – vzorky označené HC1-6 a HCI-II v tabulce 3 a 4) a 3.3.1. (vzorky v moči 17598 a 22186, označené M1-6 a MI-II; plazmě 17598, ozn. P1-6 a PI-II; žluči 22184, ozn. Z1-6 a ZI-II) a 3.3.2. (moči 17598, plazmě 17598). Extrakty byly odpařeny do sucha v koncentrátoru při 45°C po dobu 60 minut. Rekonstituce odparků pro měření limitů probíhala podle 3.5.1.II.

Výchozími roztoky pro ředění konkrétních limitních roztoků byly: roztok flubendazolu 10 mmol/l v DMSO (navážka 0,00157g/500 µl), roztok desethylkarboxyflubendazolu 10 mmol/l v DMSO (navážka 0,00158g/500µl) a roztok flubendazolu redukovaného 10 mmol/l v DMSO (navážka 0,00128g/500µl). Dále byl připraven výchozí roztok FLU 100 mmol/l v DMSO (navážka 0,00157g/50 µl), výchozí roztok 100 mmol/l FLU-H v DMSO (navážka 0,00158g/50µl) a výchozí roztok FLU-R 100 mmol/l v DMSO (navážka 0,00128g/50µl). Byl použit rovněž standardní roztok FLU-R 0,100 mmol/l (viz. 2.4.3.I.).

Vnitřní standard albendazol: ALB 10 mmol/l pro spektrofotometrickou detekci a ALB 0,1 mmol/l pro spektrofluorimetrickou detekci v DMSO byl připraven podle 2.4.2.IV. a 2.4.3.II.

2.7.1. Tabulkový přehled roztoků použitých pro měření LOD a LOQ chromatografických analýz se spektrofotometrickou detekcí

Tabulka 3: *Limitní roztoky pro chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí.*

Vzorek	Analyt	Přídavek DMSO k 10 µl 10 mmol/l standardního roztoku analytu (µl)		Limit	Výsledná koncentrace limitního standardního roztoku (mmol/l)
HC1	FLU-H	115	ředění vzniklého roztoku 10 x DMSO	LOD	0,080
HC2		27		LOQ	0,269
HC3	FLU-R	73		LOD	0,120
HC4		15,5		LOQ	0,390
HC5	FLU	104		LOD	0,880
HC6		24		LOQ	0,294
Vzorek	Analyt	Přídavek DMSO k 10 µl 100 mmol/l standardního roztoku analytu (µl)		Limit	Výsledná koncentrace limitního standardního roztoku (mmol/l)
M1	FLU-H	26	ředění vzniklého roztoku 10 x DMSO	LOD	2,790
M2		1		LOQ	9,090
M3	FLU-R	27		LOD	2,700
M4		1		LOQ	9,090
M5	FLU	45,5		LOD	1,800
M6		6,5		LOQ	6,060

P1	FLU-H	926	ředění vzniklého roztoku 10 x DMSO	LOD	0,110
P2		271		LOQ	0,360
P3	FLU-R	490		LOD	0,200
P4		140		LOQ	0,670
P5	FLU	718		LOD	0,140
P6		208		LOQ	0,460
Z1	FLU-H	397		LOD	0,250
Z2		112		LOQ	0,820
Z3	FLU-R	202		LOD	0,470
Z4		53		LOQ	1,590
Z5	FLU	536		LOD	0,180
Z6		154		LOQ	0,610

2.7.2. Tabulkový přehled roztoků použitých pro měření LOD a LOQ chromatografických analýz se spektrofluorimetrickou detekcí

Tabulka 4: *Limitní roztoky pro chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí.*

Vzorek	Analyt	Přídavek DMSO k 100 µl 0,100 mmol/l standardního roztoku analytu (µl)	ředění vzniklého roztoku 10 x DMSO	Limit	Výsledná koncentrace limitního standardního roztoku (µmol/l)
HCI	FLU-R	5647			LOD
HCII		1601	LOQ		0,588
Vzorek		Přídavek DMSO k 10 µl 10,0 mmol/l standardního roztoku FLU-R (µl)	Limit		Výsledná koncentrace limitního standardního roztoku (µmol/l)

MI		164	ředění vzniklého roztoku 10 x DMSO	LOD	57,470
MII		42		LOQ	192,310
PI		12212		LOD	0,820
PII		3657		LOQ	2,730
ZI		2434		LOD	4,090
ZII		723		LOQ	13,640

3. POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU

3.1. Příprava vzorků určených k hodnocení tří způsobů extrakce

K izolaci léčiv z biologického materiálu a ke zpracování standardních vzorků byla používána extrakce do organického rozpouštědla (LLE), založená na rozdělování rozpuštěných látek mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny.

Byl zkoušen a hodnocen vliv použitého organického rozpouštědla na výsledky extrakce. Celkem byla testována tři organická rozpouštědla (ACN, OE a tBME).

Byly připraveny 3 sady vzorků 1-9 dle tabulky 5 v mikrozkušnicích. Po vnesení kapalných součástí směsi do zkumavek, byly vzorky inkubovány po dobu 60 min při 37°C v termobloku. Získaná množství 1 ml roztoků po inkubaci byla rozdělena po 300 µl do zábrusových zkumavek. Ke vzorkům první sady (A) bylo přidáno 180 µl ACN, ke vzorkům druhé sady (B) 30 µl 25% amoniaku a 600 µl OE, ke vzorkům třetí sady (C) bylo přidáno 30 µl 25% amoniaku a 900 µl tBME. Vzorky byly třepány 3 minuty na laboratorní třepačce 1 800 ot/min. Po protřepání a následném oddělení fází bylo do vialky odebráno v případě A) 430 µl vzorku a ponecháno bez další úpravy k chromatografické analýze. V sadě B) bylo ze vzorků do vialek odebráno 500 µl a v případě C) 800 µl. Určená množství byla odpařována v koncentrátoru 30 minut při 45°C. Odparky vzorků sady B a C byly rekonstituovány způsobem uvedeným v bodě 3.5.1.II. Vzorky ze sady A doplněny směsí ACN: fosfátový pufr (pH = 3,07) do 1,70 ml. Takto získané vzorky byly podrobeny chromatografické analýze.

Tabulka 5.: Schéma přípravy vzorků k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na výsledky extrakce.

Vzorek	Roztok FLU (10mM)	DMSO	Mikrosomy	Roztok NADPH 10 mM	Cytosol	Fosfátový pufr 0,1M, pH=7,40
1,2,3 (mikrosomy)	2 µl	-	330 µl	100 µl	-	568 µl
4,5,6 (cytosol)	2 µl	-	-	100 µl	330 µl	568 µl
7 (slepý)	-	2 µl	330 µl	100 µl	-	568 µl
8 (slepý)	-	2 µl	-	100 µl	330 µl	568 µl
9	2 µl	-	-	100 µl	-	898 µl

3.2. LLE standardních vzorků léčiv a metabolitů pro následné HPLC analýzy

Kapalný extrakt analytů byl získán následovně: 1 µl roztoku FLU, 1 µl roztoku FLU-H, 1 µl roztoku FLU-R, 1 µl roztoku ALB byly nanášeny na dno lahvičky. Následně bylo přidáno 330 µl cytosolu a 662 µl fosfátového pufru 0,1M (pH = 7,40, viz. 2.2.). Vzniklá směs byla v lahvičce protřepána 0,5 min na laboratorní třepačce při 1800 otáčkách/min a mikropipetou přenesena do zábrusové zkumavky. Určitá modifikace LLE nastala pouze v případě předběžných chromatografických analýz, množství roztoků použitá pro tato měření jsou uvedena pod bodem 2.6.

Vlastní extrakce byla provedena po alkalizaci směsi 100 µl 25% amoniaku přídatkem 2,0 ml OE a protřepáním 2 min na laboratorní třepačce při 2200 otáčkách/min. Po oddělení fází byla mikropipetou odebrána organická fáze a kapalný extrakt byl přenesen do vialky 2,0 ml a odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C 60 minut.

Celý proces byl také prováděn s polovičním množstvím všech používaných analytů a činidel, kdy se čas odpařování 1 ml OE fáze snížil na 30 minut při 45°C v koncentrátoru.

3.3. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma, žluč) pro následnou HPLC analýzu

Extrakt byly připravovány způsobem uvedeným v bodě 3.1. s modifikací ve fázi smíšení analytů s biologickým materiálem a ve fázi oddělování nemísitelných složek.

3.3.1. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma, žluč) pro následnou HPLC analýzu

K 1 µl roztoku FLU, 1 µl roztoku FLU-H, 1 µl roztoku FLU-R, 1 µl roztoku ALB naneseným na dno lahvičky byl v případě testování vlivu reálného biologického materiálu na průběh a výsledky chromatografických analýz namísto 330 µl cytosolu a 662 µl fosfátového pufru 0,1M (pH = 7,40, viz. 2.2.) mikropipetou přenesen - 1 ml moči nebo 1 ml plazmy, nebo 1 ml žluči. Vzniklá směs byla v lahvičce protřepána 0,5 min na laboratorní třepačce při 1800 otáčkách/min a mikropipetou přenesena do zábrusové zkumavky.

Vlastní extrakce byla provedena po alkalizaci směsi 100 µl amoniaku 25% přídatkem 2,0 ml octanu ethylnatého a protřepáním 2 min na laboratorní třepačce při 2200 otáčkách/min.

Po protřepání bylo množství 3 ml substancí ze zábrusové zkumavky rozděleno mikropipetou po 1,5 ml do mikrozkuvek a vzorky byly odstředěny při 5.0 rpm po dobu 10 minut. Mikropipetou byla odebrána organická fáze a kapalný extrakt byl přenesen do vialky 2,0 ml a odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C 60 minut.

3.3.2. LLE standardních vzorků biologického materiálu (moč, plazma) s reextrakcí interferujících polárních látek pro následnou HPLC analýzu

Extrakt byly připravovány způsobem uvedeným v bodě 3.3.1. s modifikací ve fázi samotné extrakce, kdy po protřepání analytů s OE byla prováděna reextrakce interferujících polárních látek z biologické matrix 1,0 ml ultračisté vody mikropipetou přenesené do zábrusové zkumavky 2 minutovým protřepáním na laboratorní třepačce při 2200 otáčkách/min.

Po protřepání bylo vzniklé množství 4 ml substancí ze zábrusové zkumavky rozděleno mikropipetou po 2,0 ml do mikrozkuvek a k oddělení fází byla používána centrifuga 5.0 rpm po dobu 10 minut. Mikropipetou byla odebrána organická fáze a kapalný extrakt byl přenesen do vialky 2,0 ml a odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C 60 minut.

3.3.3. LLE neznámých vzorků biologického materiálu plazmy pro následnou HPLC analýzu

Z neznámých vzorků plazmy byl odebrán 1 ml a podroben extrakci: alkalizaci 100 µl amoniaku 25%, následné extrakci 2,0 ml octanu ethylatého protřepáním 2 min na laboratorní třepačce při 2200 otáčkách/min.

Po protřepání bylo množství 3 ml ze zábrusové zkumavky rozděleno mikropipetou po 1,5 ml do mikrozkuvek a vzorky byly odstředěny při 5.0 rpm po dobu 10 minut. Mikropipetou byla odebrána organická fáze a kapalný extrakt byl přenesen do vialky 2,0 ml a odpařen do sucha v koncentrátoru při 45°C 60 minut.

3.4. Úprava odparků biologických vzorků po inkubaci *Haemonchus contortus* s flubendazolem

Byly analyzovány biologické vzorky subcelulárních frakcí homogenizátů *Haemonchus contortus*. Odparky byly rekonstituovány způsobem uvedeným v experimentální části 3.5.1.II. V případě potřeby (nalezená koncentrace mimo kalibrační rozsah) byly rekonstituované odparky patřičně naředěny.

3.5. Rekonstituce odparků vzorků po provedení kompletní LLE pro následnou chromatografickou analýzu

3.5.1 Rekonstituce odparků extraktů léčiv a metabolitů pro testování vlivu rozpouštědel na rekonstituci odparku po LLE

Byly testovány čtyři možnosti rekonstituce.

3.5.1.I. Rekonstituce pouze ACN

Odparek extraktu po provedení LLE (postupem uvedeným v 3.1.) ve vialce byl rozpuštěn v 1 ml čistého acetonitrilu ponecháním na ultrazvukovém generátoru 5 min při 25 kHz.

3.5.1.II. Rekonstituce MF - ACN : fosforečnanový pufr (pH = 3,07) 3:7 (v/v)

K odparku extraktu získanému po LLE (postupem uvedeným v 3.1. nebo 3.2.) ve vialce bylo nejprve mikropipetou přeneseno 300 μ l ACN a směs byla ponechána na ultrazvukovém generátoru 5 min při 25 kHz. Poté bylo přidáno 700 μ l fosforečnanového pufru (pH = 3,07, viz. 2.1.) a směs byla opět ponechána na ultrazvukovém generátoru 5 min při 25 kHz.

3.5.1.III. Rekonstituce s přidavkem 0,5 μ l DMSO do MF

K odparku extraktu získanému po LLE (postupem uvedeným v 3.1.) ve vialce bylo nejprve mikropipetou přeneseno 0,5 μ l DMSO. Dále bylo postupováno podle 3.5.1.II.

3.5.1.IV. Rekonstituce s přidavkem 1,0 μ l DMSO do MF

K odparku extraktu získanému po LLE (postupem uvedeným v 3.1.) ve vialce byl nejprve mikropipetou přenesen 1,0 μ l DMSO. Dále bylo postupováno podle 3.5.1.II.

3.5.2. Rekonstituce odparků extraktů léčiv a metabolitů používaná při chromatografii standardních a neznámých biologických vzorků

Odparky byly rekonstituovány způsobem uvedeným v bodě 3.5.1.II.

3.6. Chromatografická analýza flubendazolu a jeho metabolitů v extraktech po LLE

3.6.1. Chromatografické podmínky

Vysokoučinná kapalinová chromatografie probíhala na Shimadzu LC chromatografu (degaser GT -154, gradientová pumpa LC-10ADVP, autosampler SIL-10ADVP s variabilní nástřikovou smyčkou 0,1-50 μ l, UV/VIS photodiode array detektor SPD-M10Avp, spektrofluorimetrický detektor RF-10AXL, System controller SCL-10AVP, kolonový termostat CTO-10ACVP, CLASS-VP analytický software) v isokratickém modu, nastříkováno bylo standardně 50 μ l vzorku. Byla používána kolona LiChroCART 250x3 mm, náplň LiChrospher 60 RP-select B (5 μ m). Kolona byla termostatována na 25°C. Při předběžném testování chromatografických podmínek v počátcích analýz byla používána předkolona Thermo-Hypersil 10x4 mm se stacionární fází BDS-Hypersil-C8 (5 μ m). Později před započítím měření standardních a biologických vzorků byla předkolona vyměněna za Guard Column 4x4 mm se stacionární fází používanou u kolony. Mobilní fáze měla složení ACN : 0,025M fosfátový pufr (pH = 3,07) 3:7 (v/v), průtok MF činil 0,7 ml/min. Podmínky spektrofotometrické detekce: deuteriová lampa, scan 190 – 370 nm, vlnová délka 246 nm a 300 nm. Podmínky spektrofluorimetrické detekce: postupně byly zkoušeny následující excitační a emisní vlnové délky $\lambda_{ex} = 290$ nm a $\lambda_{em} = 334$ nm, $\lambda_{ex} = 300$ nm a $\lambda_{em} = 360$ nm, $\lambda_{ex} = 290$ nm a $\lambda_{em} = 320$ nm. Pro vlastní měření bylo nakonec použito vlnových délek $\lambda_{ex} = 290$ nm a $\lambda_{em} = 320$ nm. Za výše uvedených podmínek se separují látky do 25 minut.

3.7. Předběžné testování fluorescence léčiv a metabolitů sloužící k nalezení jejich excitačních a emisních vlnových délek

3.7.1. Fluorimetrická měření emisních spekter léčiv a metabolitů

Byla změřena 2D emisní spektra analyzovaných látek (viz. 2.5.2) při $\lambda_{ex}=246$ nm, $\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{ex}=350$ nm v rozmezí 250-500 nm emisních vlnových délek, šíře štěrbin monochromátorů činila 4 nm.

Dále byla změřena 3D spektra flubendazolu 100 μ M v MF a desethylkarboxyflubendazolu 100 μ M v MF. Šíře štěrbin monochromátorů byla nastavena na 2 nm.

4. VYJAŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

4.1. Validace analytické metody

4.1.1. Limity detekce a kvantifikace

Koncentrační limity byly vypočteny z hodnoty směrodatné odchylky šumu základní linie na blankových chromatogramech biologických materiálů.

4.1.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vypočítávána jako relativní směrodatná odchylka (RSD) koncentrací látek ve vzorku, standardně z osmi nástřiků téhož vzorku. Koncentrace byly získány po přepočtu ploch píků analytů a vnitřního standardu (ALB) na chromatogramech.

4.1.3. Rozlišení

Rozlišení bylo vypočítáno ve specifických případech (viz. výsledková část, kapitola 1) z průměrných hodnot retenčních časů a průměrů šířek píků v polovině jejich výšky stanovovaných látek.

4.1.4. Správnost

Správnost byla vyjádřena jako výtěžnost R v procentech jako 100násobek podílu zjištěného množství léčiva chromatografickou metodou a přidaného množství léčiva před provedením LLE.

$$R (\%) = \frac{\text{zjištěné množství léčiva}}{\text{přidané množství léčiva}} \cdot 100$$

Výsledková část

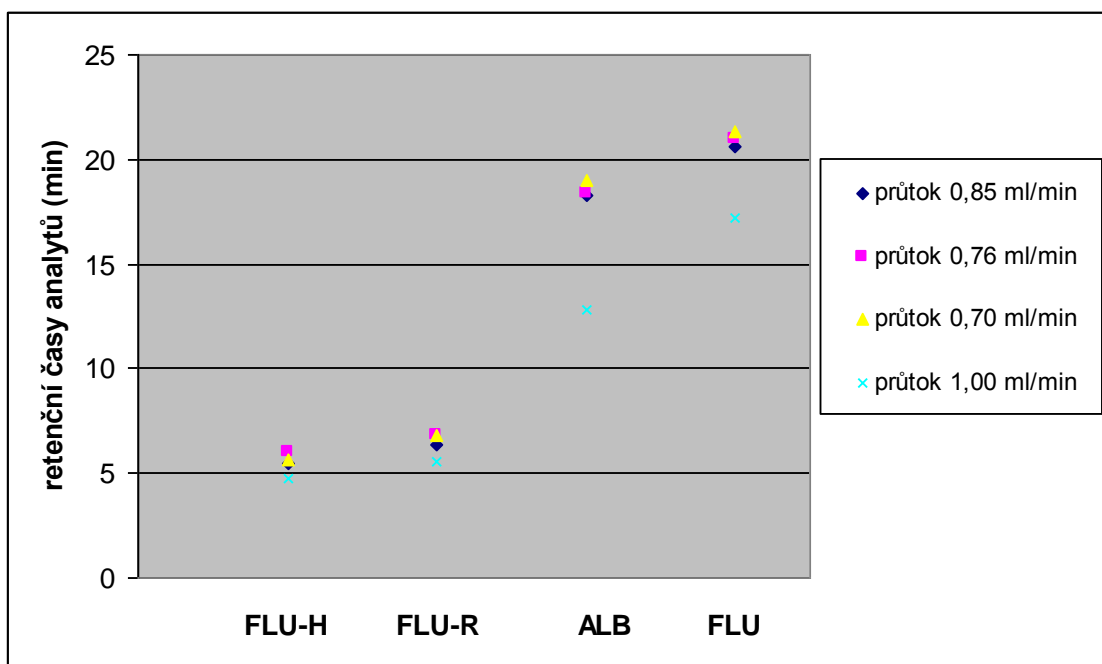
1. Optimalizace rychlosti průtoku MF kolonou

V předběžných experimentech byl posuzován vliv rychlosti průtoku MF na chromatografickou analýzu probíhající na koloně 250 x 3 mm. Cílem proměňování rychlostí průtoku bylo přiblížení se retenčním časům analytů, jak je získal Nobilis^[30], který se HPLC analýze FLU a jeho metabolitů věnoval jako první na koloně 250 x 4 mm se stejnou stacionární fází, jaká je použita v této práci.

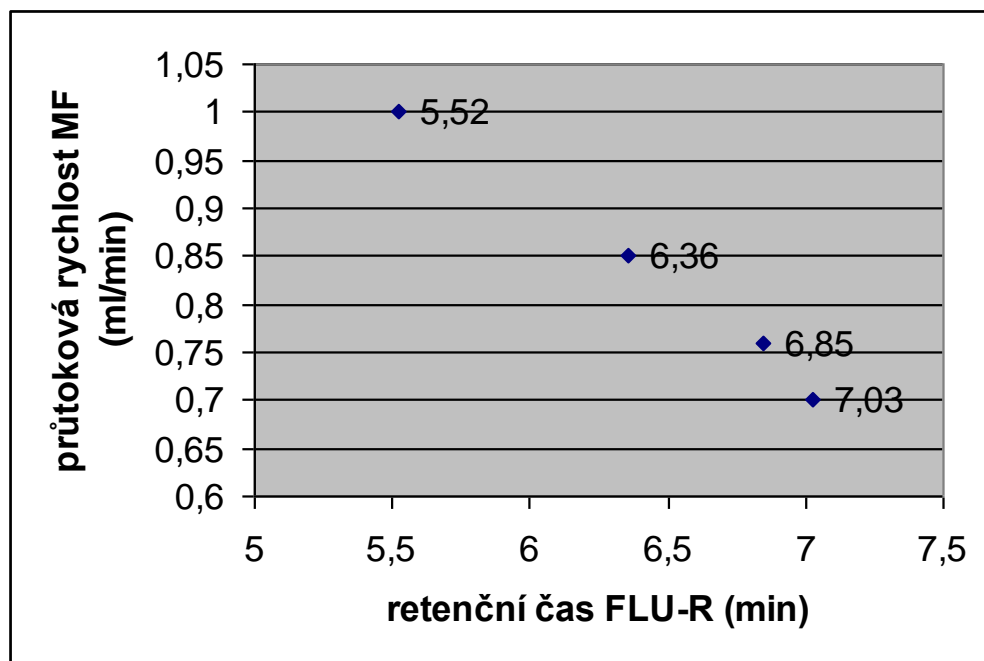
Byly sledovány retenční časy analytů, rozdělení chromatografických píků až na základní linii při průtoku MF rychlostí 1,0, 0,85, 0,76 a 0,70 ml/min. Vliv průtokové rychlosti na hodnoty retenčních časů jednotlivých analytů znázorňuje obrázek 2.

Obrázek 3 pak představuje závislost retenčního času pouze analyzovaného FLU-R na zvolené průtokové rychlosti.

Obr. 2: Grafické znázornění závislosti retenčních časů jednotlivých analytů na zvolené průtokové rychlosti. Vyšší průtok odpovídá zkrácení retenčních časů. Pomalejší průtoky zlepšují rozdělení píků až na základní linii, zároveň však prodlužují čas analýzy.



Obr. 3: Grafické znázornění závislosti retenčního času analyzovaného FLU-R na zvolené průtokové rychlosti. Nižší průtok odpovídá prodlouženému retenčnímu času.



2. Optimalizace složení rozpouštědla používaného při rekonstituci odparků

Součástí vývoje chromatografické metody pro stanovení flubendazolu a jeho metabolitů (desethylkarboxyflubendazolu a flubendazolu redukovaného) byly předběžné experimenty, které sloužily k nalezení optimálního způsobu rekonstituce odparků vzorků. Chromatografie probíhala se spektrofotometrickou detekcí.

Byly hodnoceny chromatogramy získané po rekonstituci odparků pouze ACN a po rekonstituci ACN s přidavkem fosforečnanového pufru (pH = 3,07). Výsledky znázorňují vzorové chromatogramy na obrázcích 4 a 5. Současně byly sledovány retenční časy analytů. Výsledky sledování dokumentuje tabulka 6, v níž je obsažena reprodukovatelnost retenčních časů vyjádřená jako jejich relativní směrodatná odchylka. Konečně byl hodnocen vliv DMSO aplikovaného přímo na odparky před vnesením dalších součástí MF do vialky s

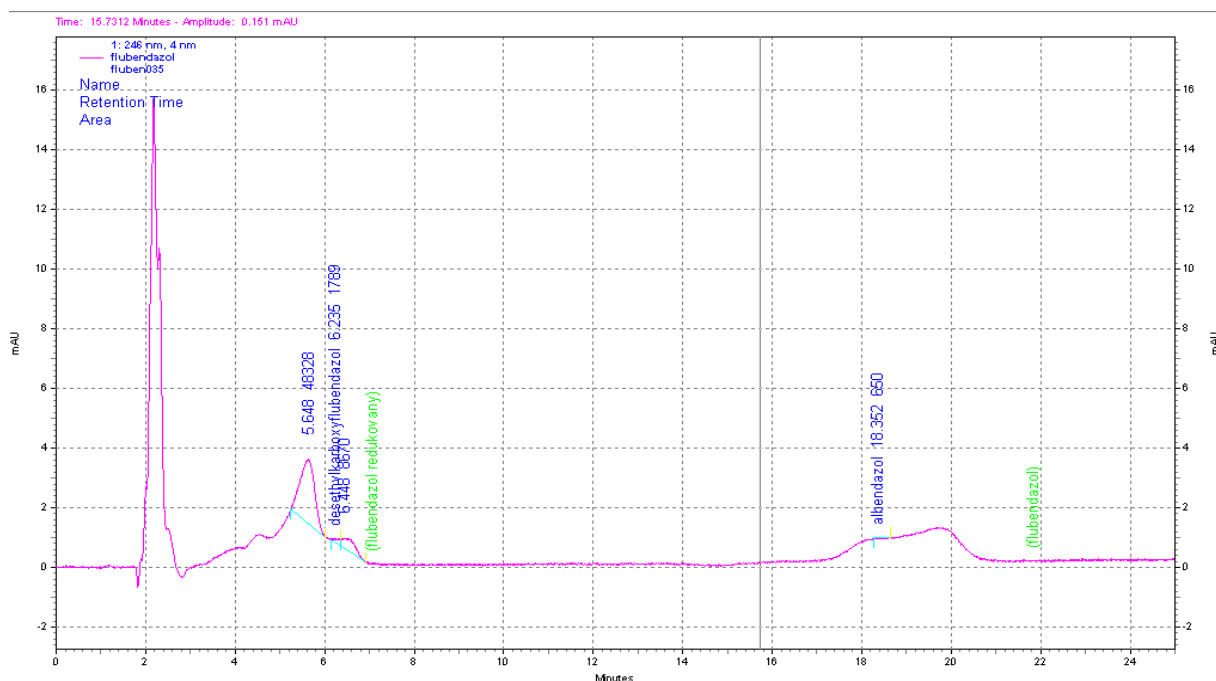
odparkem na rozpustnost analytů. Výsledky shrnuje tabulka 7 a dokreslují vzorové chromatogramy na obrázcích 6, 7 a 8.

Tabulka 8 zobrazuje retenční časy analytů nalezené během sledování vlivu DMSO aplikace k odparkům.

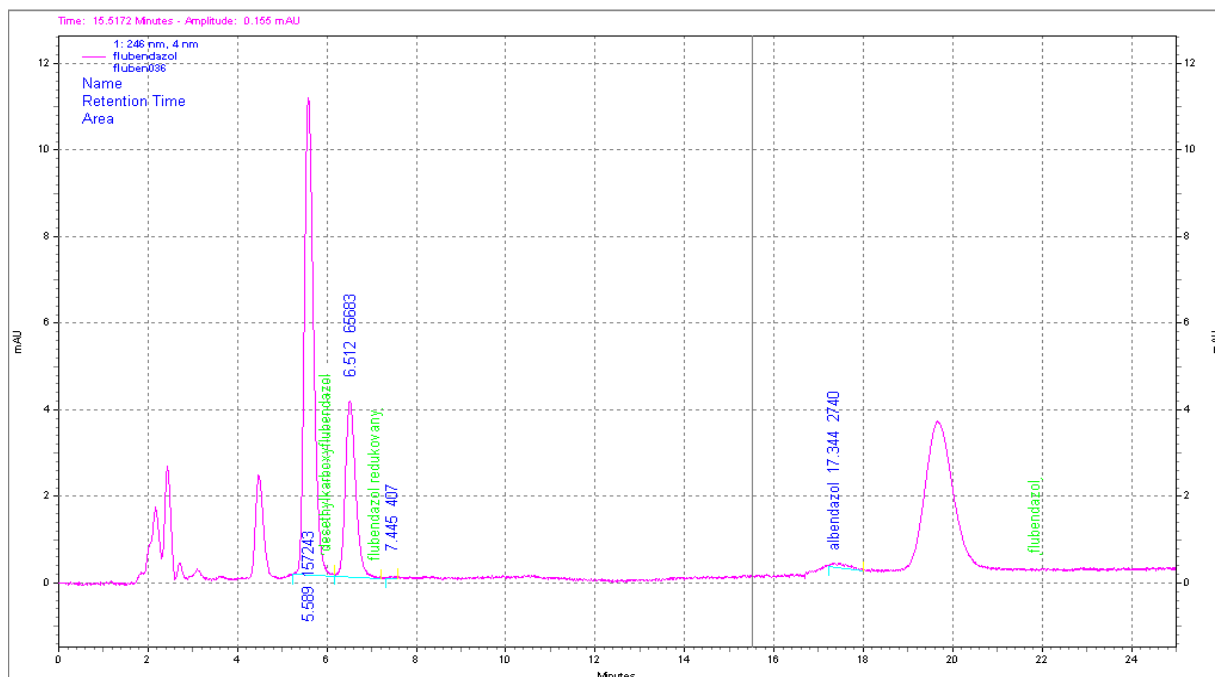
Součástí hodnocení chromatogramu z obr. 8 (vzorek 1, tabulka 6) a chromatogramů vzorků 2-5 uvedených v tabulce 6 byl také výpočet rozlišení pro píky FLU-H a FLU-R a rozlišení píků vnitřního standardu ALB a analytu FLU. Hodnota rozlišení R_{S1} vypočítaná z průměrných hodnot retenčních časů a průměrných hodnot šířky píků v polovině jejich výšky pěti vzorků pro píky FLU-H a FLU-R činí 1,94, hodnota rozlišení R_{S2} píků ALB a FLU vypočítaná stejným způsobem je rovna 1,60.

Podobně byla vypočítána rozlišení R_{S3} píků FLU-H a FLU-R a R_{S4} píků ALB a FLU z tabulky 8, kdy hodnota R_{S3} činí 1,62 a hodnota R_{S4} je rovna 1,93.

Obr. 4: Ukázka chromatogramu po rekonstituci odparku pouze ACN. Píky rozmyté a chvostující. Vnitřní standard albendazol není hodnotitelný.



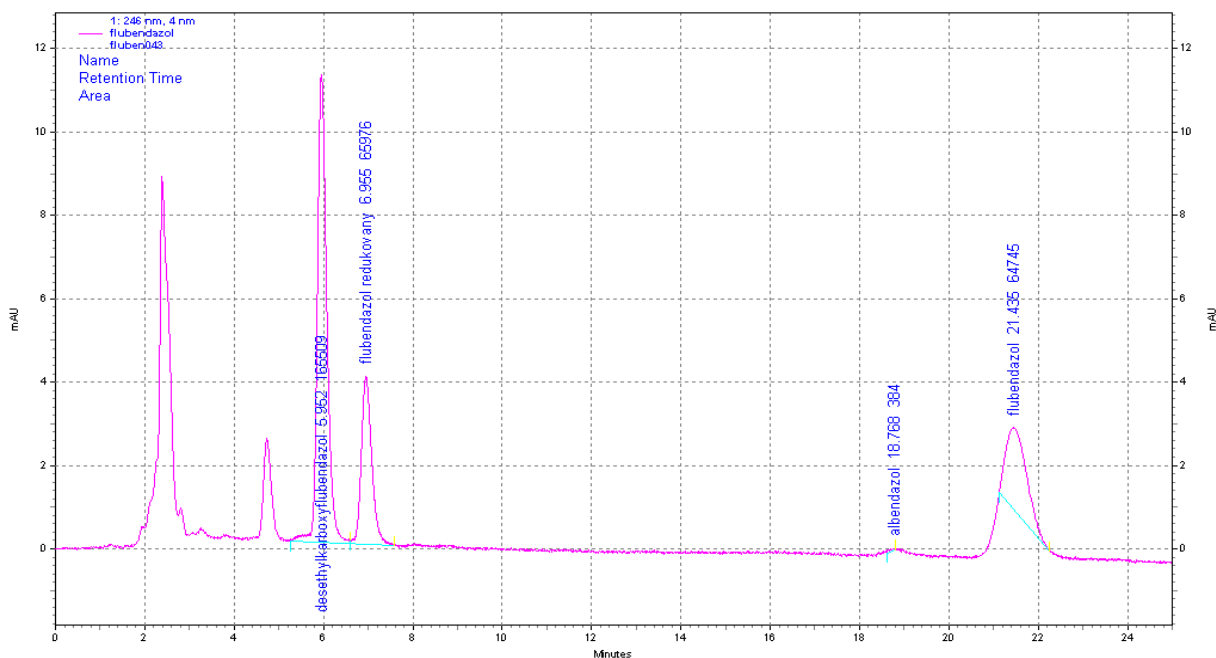
Obr. 5: Ukázka chromatogramu po rekonstituci odparku směsí ACN : fosforečnanový pufr (pH=3,07) 3:7 (v/v). Vnitřní standard albedazol není hodnotitelný.



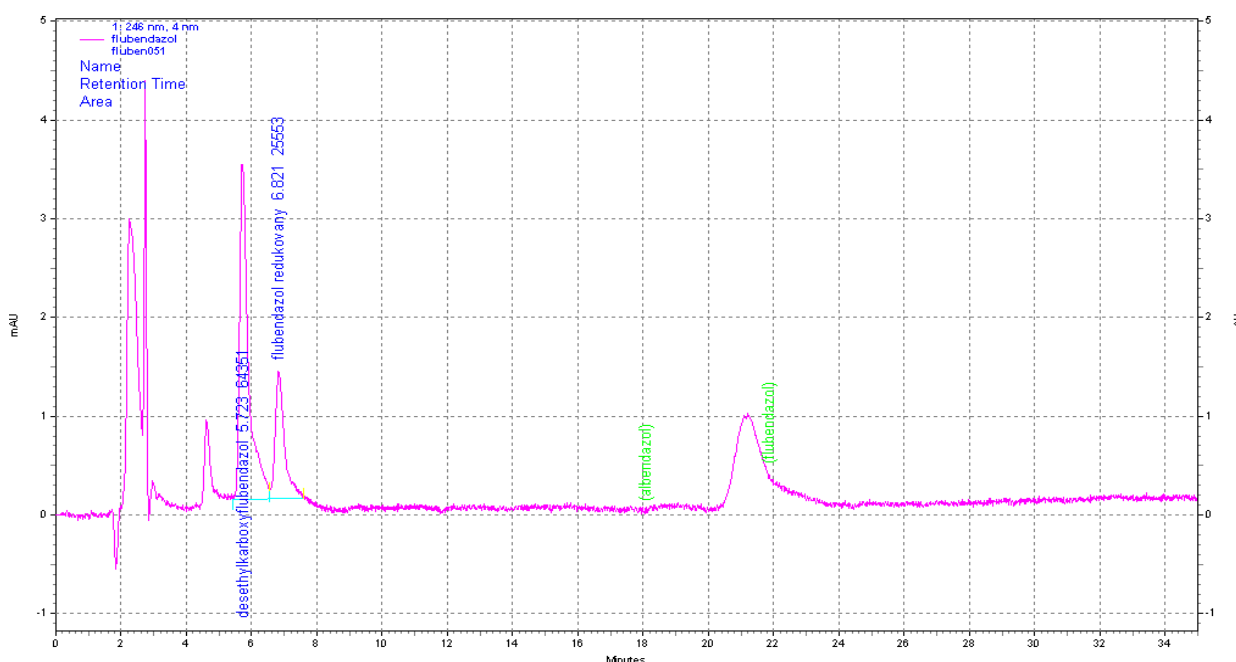
Tabulka 6: Retenční časy analytů po rekonstituci odparků MF ve složení ACN : fosforečnanový pufr (pH=3,07) 3:7 (v/v).

Vzorek	t_R FLU-H (min)	t_R FLU-R (min)	t_R ALB (min)	t_R FLU (min)
1	5,68	6,88	19,05	21,39
2	5,68	6,85	19,02	21,37
3	5,68	6,85	19,02	21,34
4	5,69	6,88	19,02	21,34
5	5,69	6,85	19,05	21,38
průměr	5,68	6,86	19,03	21,36
SD_1	0,003	0,007	0,007	0,010
RSD_1 [%]	0,05	0,10	0,04	0,05

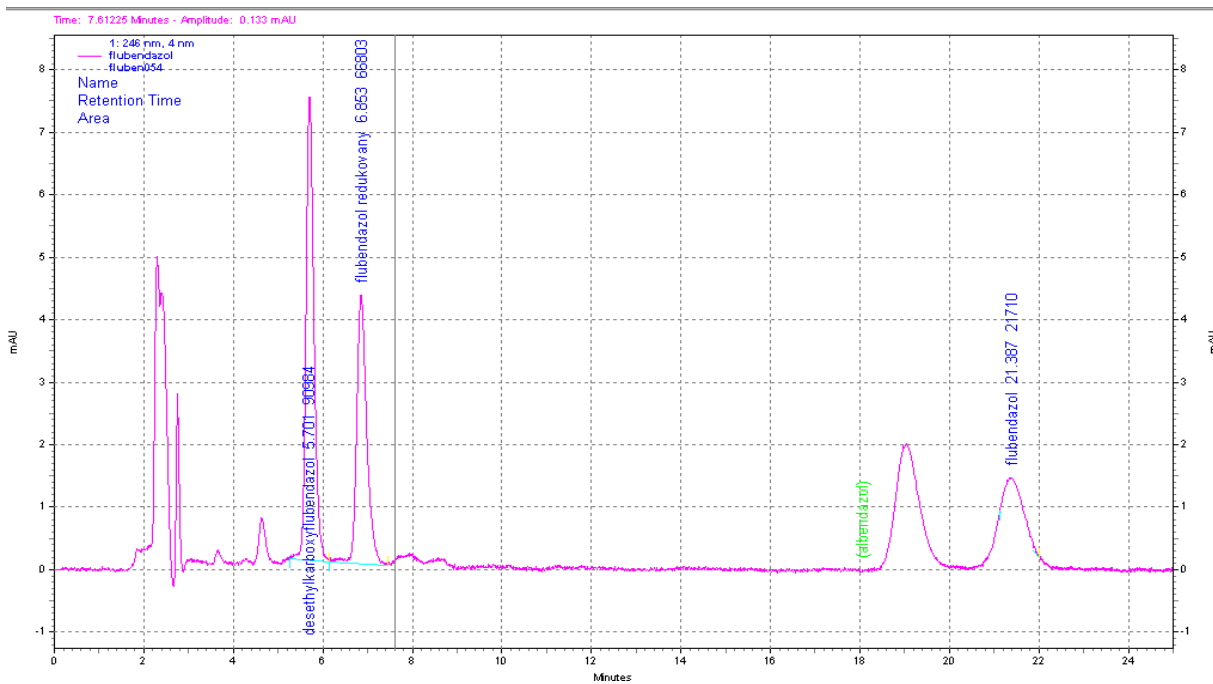
Obr. 6: Chromatogram po rekonstituci odparku s přidavkem 1,0 μ l DMSO do MF pro zlepšení rozpustnosti analytů v MF. Rekonstituce směsí ACN : fosforečnanový pufr (pH= 3,07) 3:7 (v/v). Vnitřní standard albendazol není hodnotitelný.



Obr. 7: Chromatogram po rekonstituci odparků s přidavkem 0,5 μ l DMSO do MF pro zlepšení rozpustnosti analytů v MF. Rekonstituované odparky zředěné 2krát MF. Rekonstituce směsí ACN : fosforečnanový pufr (pH= 3,07) 3:7 (v/v). Vnitřní standard albendazol není hodnotitelný.



Obr. 8: Vzorový chromatogram po rekonstituci odparků MF o složení ACN : fosforečnanový pufr (pH=3,07) 3:7 (v/v). Nově připravený vnitřní standard albendazol.



Tabulka 7: Hodnocení vlivu DMSO na rekonstituci odparků vzorků mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr (pH=3,07). Hodnocení porovnáním ploch stanovovaných metabolitů flubendazolu - FLU-H a FLU-R. Vzorky 4-5 byly zředitovány 2krát MF, plochy píku FLU-H a FLU-R vnesené do tabulky odpovídají dvojnásobku ploch nalezených na chromatogramech.

Vzorek	Přídavek DMSO k odparku (μl)	Plocha píku FLU-H	Plocha píku FLU-R
1	1	172068	68751
2		165509	65976
3		148362	55833
průměr		161980	63520
SD ₂		7067	3926
RSD ₂ [%]		4,4	6,2
4	0,5	128702	51066
5		125472	46824
6		81996	41210
průměr		112057	46367
SD ₃		15059	854
RSD ₃ [%]		13,4	1,8
7	0	90984	66803
8		99041	70168
9		91347	69528
10		89113	65362
11		94528	67138
průměr		93003	67800
SD ₄		1743	894
RSD ₄ [%]		1,9	1,3

Tabulka 8: Výsledky sledování retenčních časů analytů po rekonstituci odparků s přídatkem 1,0 μ l DMSO před vnesením MF o složení ACN : fosforečnanový pufr (pH=3,07) 3:7 (v/v).

Vzorek	t_R FLU-H (min)	t_R FLU-R (min)	t_R ALB (min)	t_R FLU (min)
A1	6,00	7,00	19,11	21,77
A2	5,95	6,95	18,78	21,44
A3	5,98	6,85	18,35	21,00
A4	5,75	6,72	18,11	20,64
průměr	5,92	6,88	18,59	21,21
SD_5	0,058	0,062	0,223	0,248
RSD_5 [%]	0,98	0,90	1,20	1,17

3. Optimalizace techniky rekonstituce odparků

Byl sledován vliv techniky rekonstituce odparků na chromatografickou analýzu. Postupně byly hodnoceny chromatogramy odparků zpracovávaných bez a s použitím ultrazvukového generátoru při rekonstituci. Byl rovněž posuzován vliv pořadí přidávaných součástí MF popř. DMSO (viz. tabulka 7 předchozí kapitoly) k odparkům během rekonstituce odparků s použitím ultrazvukového generátoru na základě porovnání ploch píku analyzovaného FLU-H.

K odparkům A a B byl najednou přidán 1,0 ml MF (ACN:fosforečnanový pufr pH=3,07), k odparkům C a D bylo nejprve přidáno 300 μ l ACN a (po sonifikaci – vzorek D) 700 μ l fosforečnanového pufru (pH=3,07). Směs byla následně ponechána v ultrazvukovém generátoru.

Výsledky sledování jsou shrnuty v tabulce 9 na příkladu velikosti plochy FLU-H.

Tabulka 9: Výsledky optimalizace techniky rekonstituce odparků.

Vzorky	Použití ultrazvuku (25 kHz) k rekonstituci po přidání 300 μl ACN	Doba sonifikace (min)	Použití ultrazvuku (25 kHz) k rekonstituci po přidání 700 μl fosforečnanového pufru	Doba sonifikace (min)	Plocha píku FLU-H
A	ne	0	ne	0	48328
B	ne	0	ano	1,5	57412
C	ne	0	ano	5	134660
D	ano	5	ano	5	157243

4. Stanovení kalibračních přímk pro spektrofotometrickou detekci

Lineární kalibrační přímka byla získána se vzorky FLU-H, FLU-R, a FLU rozpuštěnými v MF (ACN : fosforečnanový pufr pH=3,07 3:7 v/v) o nejnižší koncentraci 1,2 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorku, nejvyšší koncentraci 7,5 $\mu\text{mol/l}$ v případě metabolitů FLU-H a FLU-R, a o nejvyšší koncentraci 10,0 $\mu\text{mol/l}$ v případě FLU. Ke všem analyzovaným vzorkům byl přidáván vnitřní standard [IS] ALB ve fixní koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé standardní vzorky analytů v reálném biologickém materiálu (cytosol) byly podrobeny LLE následované odpařováním dle postupu uvedeného v experimentální části (viz. 3.1.). Rekonstituce odparků standardů probíhala dle 3.5.1.II. Chromatogramy standardů po proběhlé chromatografické analýze se spektrofotometrickou detekcí byly hodnoceny při vlnové délce 246 nm, získaná kalibrační data byla uložena do analytického software chromatografu a následně využívána pro kvantitativní hodnocení chromatogramů neznámých vzorků.

Výsledky kalibračních měření zobrazuje tabulka 10 a obrázky 9,10, 11, 12.

Kalibrační přímky jsou charakterizovány regresními rovnicemi 1-3 (tabulka 10), kde x značí poměr koncentrací hodnoceného analytu (FLU-H, FLU-R nebo FLU) a vnitřního standardu (ALB), y poměry ploch hodnocených analytů a vnitřního standardu. Těsnost, s níž experimentální data souhlasí s regresními rovnicemi, vyjadřují hodnoty koeficientů determinace R^2_{1-III} , které jsou rovněž součástí tabulky 10.

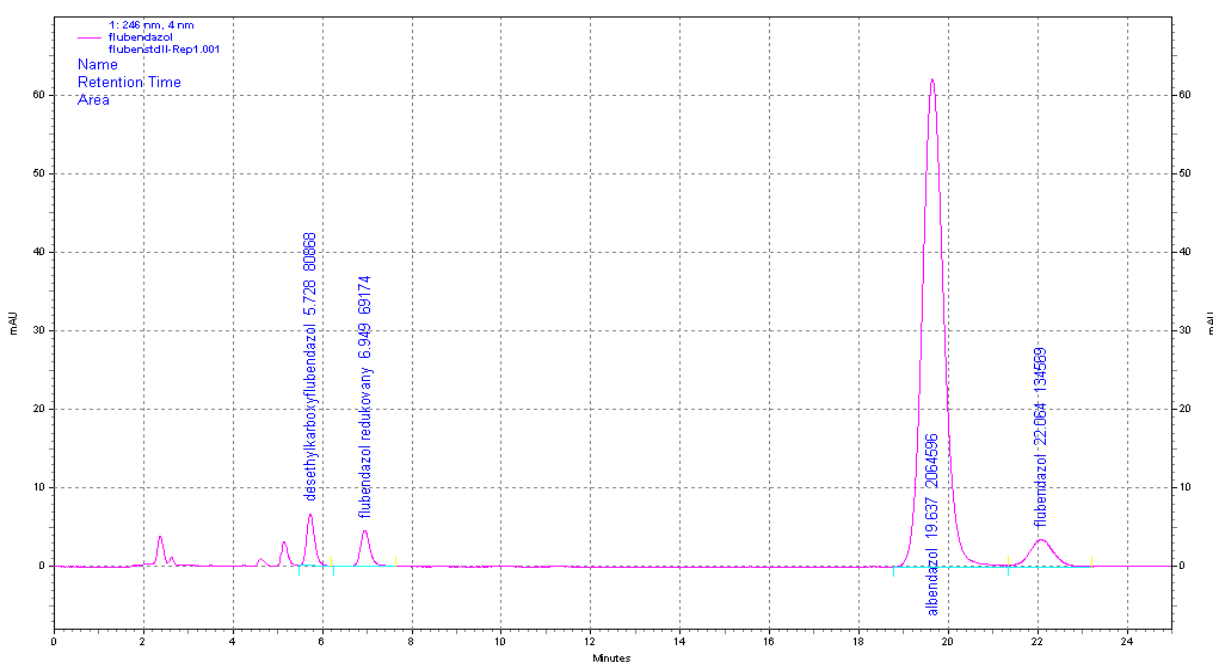
Obrázek 9 představuje vzorový chromatogram standardního vzorku.

Obrázky 10-12 znázorňují kalibrační přímky měření šesti, případně sedmi koncentračních úrovní kalibrace FLU a jeho metabolitů FLU-H a FLU-R při šesti opakování nástřiků každé koncentrační úrovně. Jednotlivé body na kalibračních přímkách představují průměr ze 6ti nástřiků.

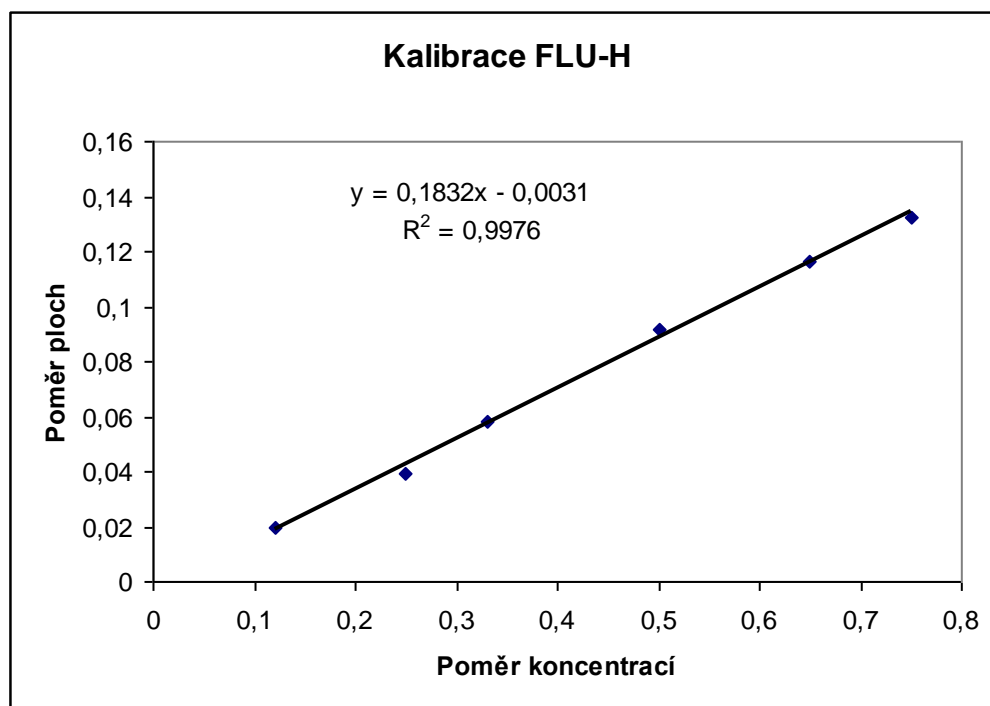
Tabulka 10: Výsledky kalibrace standardů pro spektrofotometrickou detekci, rovnice kalibračních přímek a příslušející koeficienty determinace.

Regresní rovnice	Analyt	Tvar regresní rovnice	Koeficient determinace R^2	Hodnoty koeficientů determinace
1	FLU-H	$y = 0,1832x - 0,0031$	R^2_{I}	0,998
2	FLU-R	$y = 0,1128x + 0,0027$	R^2_{II}	0,996
3	FLU	$y = 0,2356x + 0,0006$	R^2_{III}	0,999

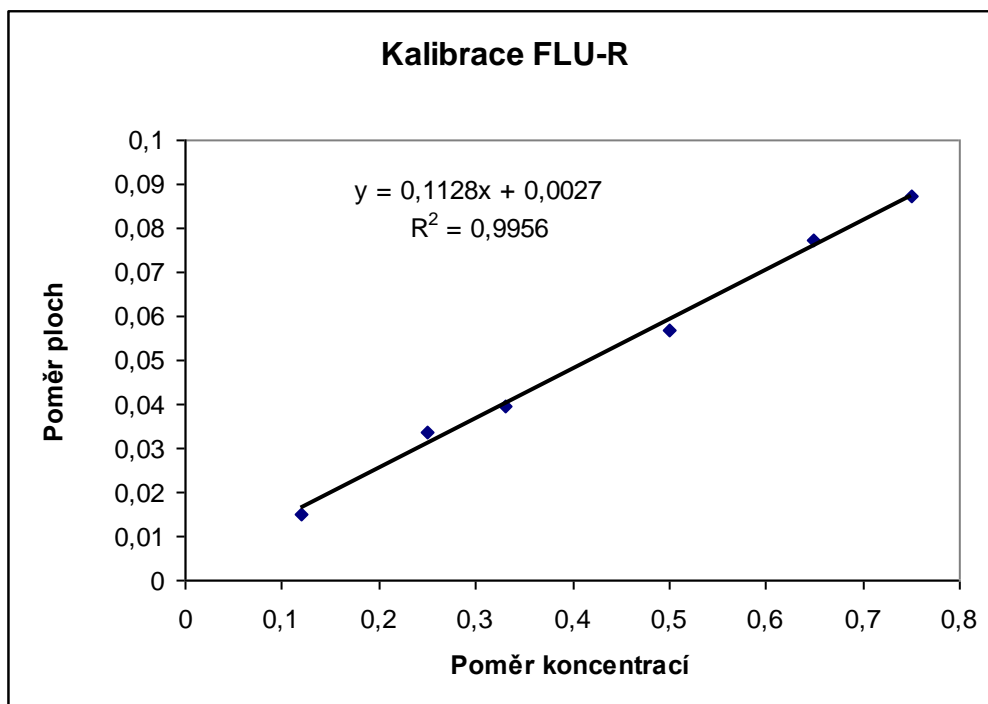
Obr. 9: Vzorový chromatogram standardu druhé koncentrační úrovně (2,5 $\mu\text{mol/l}$ analytů FLU-H, FLU-R a FLU, koncentrace ALB [IS] ve vzorku činí 10 $\mu\text{mol/l}$). První nástřík ze šesti nástříků druhé koncentrační úrovně použitých ke kalibraci chromatografické metody se spektrofotometrickou detekcí ($\lambda = 246 \text{ nm}$).



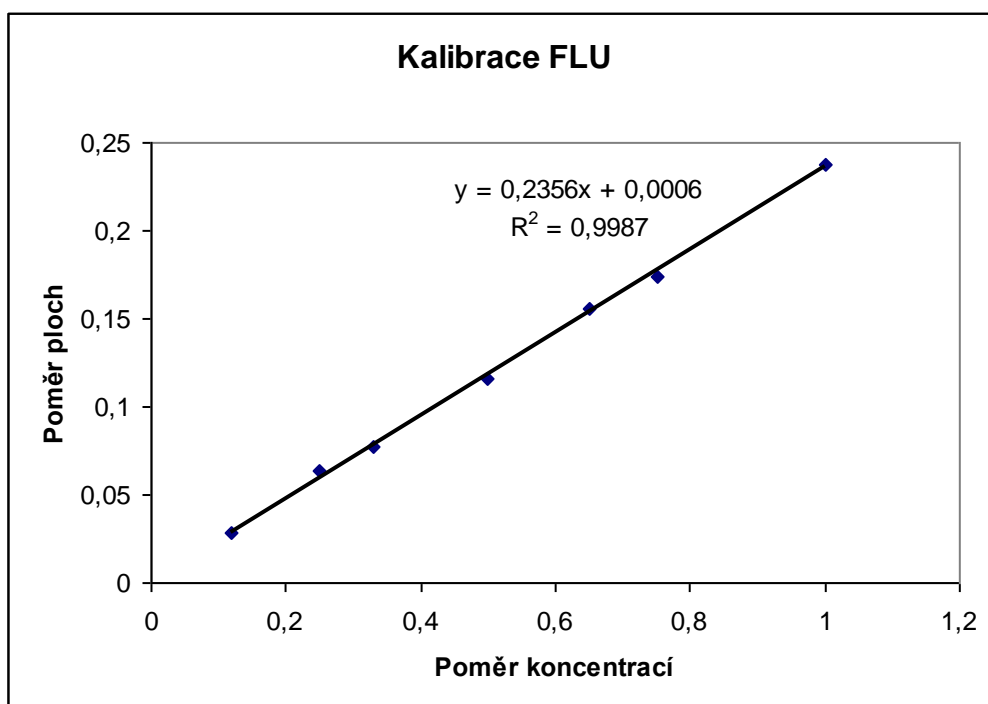
Obr. 10: Kalibrační přímka šesti koncentračních úrovní kalibrace: 1,2 $\mu\text{mol/l}$, 2,5 $\mu\text{mol/l}$, 3,3 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 6,5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ FLU-H při šesti opakovaných nástřiků každé koncentrační úrovně.



Obr. 11: Kalibrační přímka šesti koncentračních úrovní kalibrace: 1,2 $\mu\text{mol/l}$, 2,5 $\mu\text{mol/l}$, 3,3 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 6,5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R při šesti opakovaných nástřiků každé koncentrační úrovně.



Obr. 12: Kalibrační přímka sedmi koncentračních úrovní kalibrace: 1,2 $\mu\text{mol/l}$, 2,5 $\mu\text{mol/l}$, 3,3 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 6,5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$ FLU při šesti opakováních nástřiků každé koncentrační úrovně.



5. Výsledky hodnocení opakovatelnosti spektrofotometrické detekce standardního vzorku s přibližným obsahem 5 $\mu\text{mol/l}$ analytů

Byla hodnocena opakovatelnost chromatografické metody se spektrofotometrickou detekcí. Výsledky stanovení vyjadřují shodu výsledků zjištěných při analýze série 8mi vzorků připravených za stejných podmínek s přibližným obsahem 5 $\mu\text{mol/l}$ analytů FLU-H, FLU-R a FLU (vnitřní standard ALB byl obsažen v koncentraci 9,996 $\mu\text{mol/l}$). Přesné koncentrace hodnocených látek ve vzorcích před provedením LLE (viz. experimentální část 2.3.1. až 2.3.4. příprava základních roztoků, kde jsou uvedeny konkrétní navážky FLU-H, FLU-R a FLU/500 μl ; příprava standardních roztoků k hodnocení opakovatelnosti viz. experimentální část 2.4.2.) činily 5,249 $\mu\text{mol/l}$ FLU-H, 5,043 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R a 4,979 $\mu\text{mol/l}$ FLU a jsou uvedeny v tabulce 11.

Opakovatelnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka RSD_6 nalezených koncentrací jednotlivých analytů ve standardním vzorku. Hodnoty koncentrací byly vypočteny na základě znalosti velikosti ploch píků analytů a IS albendazolu. Získané výsledky shrnuje tabulka 11.

Správnost je v tabulce vyjádřena hodnotou výtěžnosti (recovery) R_1 , vypočítanou pomocí průměrů nalezených koncentrací a známých skutečných koncentrací analytů ve vzorcích.

Tabulka 11: Opakovatelnost měření standardního vzorku s obsahem přibližně 5 $\mu\text{mol/l}$ analytů FLU-H, FLU-R, FLU ve vzorku vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka nalezených koncentrací analytů po opakování analýzy 8mi vzorků připravených za stejných podmínek.

Opakování	Plocha píku FLU-H (5, 25 $\mu\text{mol/l}$)	Plocha píku FLU-R (5, 04 $\mu\text{mol/l}$)	Plocha píku FLU (4,98 $\mu\text{mol/l}$)	Plocha píku ALB (10,00 $\mu\text{mol/l}$)
1	184424	114304	211167	2027748
2	180983	111954	197124	1975263
3	185087	112361	200385	2004509
4	182612	111129	211478	2005391
5	181119	111011	206863	1981168
6	177655	109511	204404	1949172
7	175020	108243	202200	1916532
8	176398	108313	199938	1926945
Opakování	Koncentrace FLU-H ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace FLU-R ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace FLU ($\mu\text{mol/l}$)	
1	5,13	4,76	4,39	
2	5,17	4,78	4,21	

3	5,21	4,73	4,22
4	5,14	4,67	4,45
5	5,16	4,73	4,41
6	5,14	4,74	4,42
7	5,07	4,77	4,45
8	5,16	4,74	4,38
průměr	5,15	4,74	4,37
RSD ₆ (%)	0,10	0,25	0,27
R ₁ (%)	98,1	94,0	87,7

6. Vývoj metodiky fluorescenční detekce sledovaných analytů

6.1. Nalezení excitační a emisní vlnové délky léčiv a metabolitů

Byla změřena 2D emisní spektra analyzovaných látek (viz. 2.5.2) při $\lambda_{ex}=246$ nm, $\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{ex}=350$ nm v rozmezí 250-500 nm emisních vlnových délek. Dále byla změřena 3D spektra flubendazolu 100 μ M v MF a desethylkarboxyflubendazolu 100 μ M v MF.

Zatímco 2D emisní spektra analytů měřená při $\lambda_{ex}=246$ nm a $\lambda_{ex}=350$ nm nebyla hodnotitelná, při nastavení $\lambda_{ex}=300$ nm na spektrech emisní maxima patrná byla. Nalezené hodnoty vlnových délek emisních maxim léčiva ALB a metabolitu FLU-R uvádí tabulka 12.

Ve 3D spektrech flubendazolu a desethylkarboxyflubendazolu s výjimkou velmi slabé fluorescence kolem hodnoty 334 nm emisní vlnové délky nebyla nalezena žádná další maxima fluorescence. Fluorescence těchto látek nebyla již dále zkoumána.

Tabulka 12: *Vlnové délky emisních maxim ALB a FLU-R při nastavení $\lambda_{ex}=300$ nm.*

Analyt	λ_{em} (nm)
Albendazol	347
Flubendazol redukovaný	317

6.2. Hodnocení intenzity fluorescence léčiv a metabolitů

Byla hodnocena intenzita fluorescence analytů při vlnových délkách příslušejících jejich emisnímu maximu a dále při $\lambda_{em} = 320$ nm, která byla vybrána jako optimum pro chromatografickou detekci. Hodnoty intenzity fluorescence jednotlivých látek jsou zpracovány do tabulky 13.

Tabulka 13: Hodnoty intenzity fluorescence léčiv a metabolitů příslušející vlnovým délkám jejich emisních maxim (viz. tab. 11) a $\lambda_{em} = 320$ nm.

Analyt	Intenzita fluorescence při λ_{em} maxima	Intenzita fluorescence při $\lambda_{em} = 320$ nm
Albendazol	6,82831	0,36560
Flubendazol redukovaný	0,07263	0,07141

6.3. Hodnocení mebendazolu jako vnitřního standardu

Mebendazol byl zkoušen jako vnitřní standard pro chromatografické analýzy za daných chromatografických podmínek. Jeho retenční čas i odezva UV-detektoru byly prakticky stejné jako u albendazolu. Nakonec byl zvolen jako vnitřní standard albendazol, neboť vykazuje dostatečnou odezvu při spektrofotometrické i spektrofluorimetrické detekci, zatímco mebendazol nefluoreskuje.

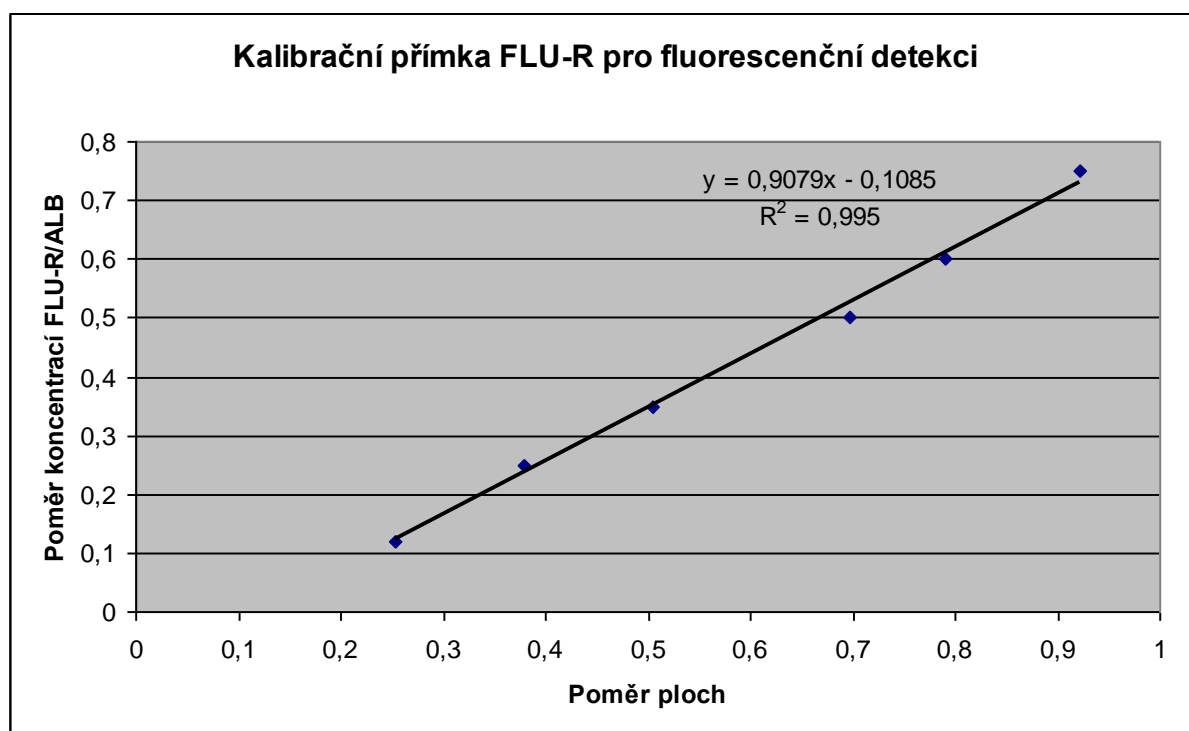
7. Stanovení kalibrační přímky pro spektrofluorimetrickou detekci

Lineární kalibrační přímka byla získána se standardními vzorky 0,075 $\mu\text{mol/l}$, 0,060 $\mu\text{mol/l}$, 0,050 $\mu\text{mol/l}$, 0,035 $\mu\text{mol/l}$, 0,025 $\mu\text{mol/l}$ a 0,012 $\mu\text{mol/l}$ redukovaného flubendazolu rozpuštěného v MF, jako vnitřní standard byl použit albendazol o koncentraci 0,100 $\mu\text{mol/l}$ (viz. 2.4.3.). Jednotlivé standardní vzorky analytů v reálném biologickém materiálu (cytosol) byly podrobeny LLE následované odpařováním dle postupu uvedeného v experimentální části (viz. 3.1.). Rekonstituce odparků standardů probíhala dle 3.5.1.II. U každé koncentrační hladiny léčiva ve vzorku bylo provedeno šest nástřiků a do kalibrační přímky byl zahrnut průměr šesti replikátů (jeden bod na kalibrační přímce). Byly hodnoceny plochy píků stanovovaných látek (FLU-R a vnitřního standardu ALB na chromatogramu). Získaná kalibrační data byla uložena do analytického software chromatografu a následně využívána pro kvantitativní hodnocení chromatogramů neznámých vzorků.

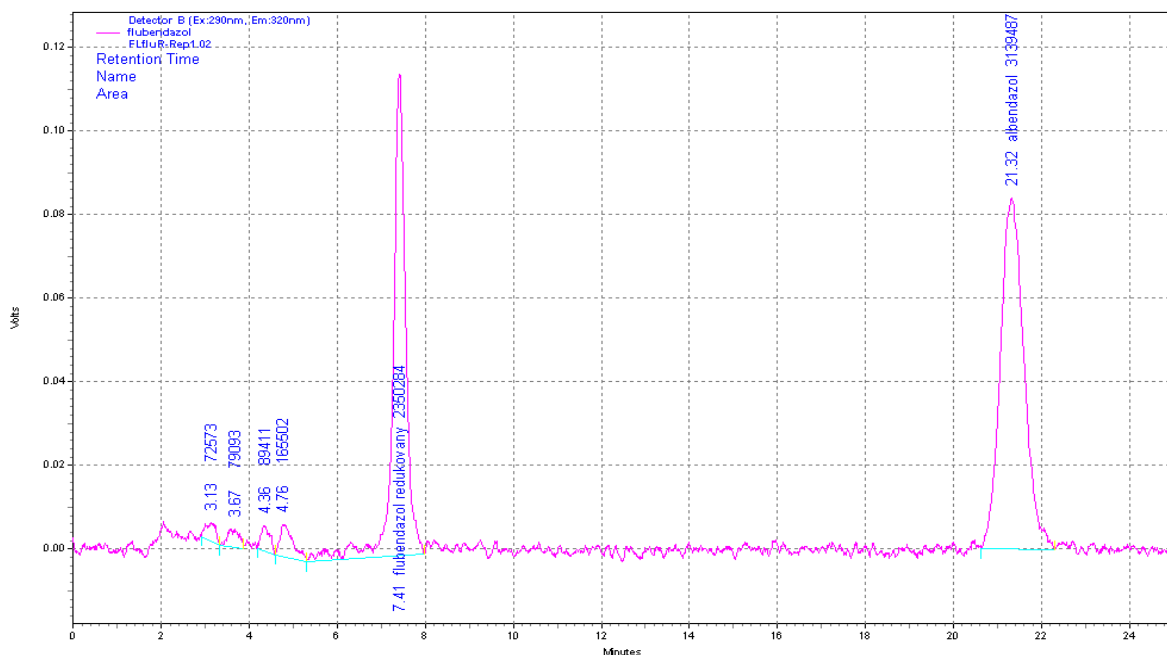
O výsledcích kalibrace vypovídá kalibrační přímka stanovení. Kalibrační přímka je charakterizována regresní rovnicí $y = 0,9079x - 0,1085$, kde y značí poměr koncentrací FLU-R a ALB [IS], hodnota x odpovídá poměru ploch FLU-R a ALB [IS], a koeficientem determinace $R^2 = 0,995$. Lineární kalibrační přímka FLU-R je vykreslena na obrázku 13.

Obrázek 14 představuje vzorový chromatogram standardního vzorku redukovaného flubendazolu o koncentraci 0,050 $\mu\text{mol/l}$. Na chromatografickém záznamu je dobře rozlišitelný pík redukovaného flubendazolu s retenčním časem $t_R = 7,41$ minut, počátek chromatogramu zaujímají málo separované píky polárních sloučenin z biologického materiálu.

Obr. 13: Kalibrační přímka šesti koncentračních úrovní kalibrace: 0,012 $\mu\text{mol/l}$, 0,025 $\mu\text{mol/l}$, 0,035 $\mu\text{mol/l}$, 0,050 $\mu\text{mol/l}$, 0,060 $\mu\text{mol/l}$ a 0,075 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R při šesti opakováních nástřiků každé koncentrační úrovně.



Obr. 14: Vzorový chromatogram standardního vzorku redukovaného flubendazolu, koncentrační hladina 0,050 µmol/l léčiva ve vzorku.



8. Výsledky hodnocení opakovatelnosti spektrofluorimetrické detekce standardního vzorku s přibližným obsahem 0,075 µmol/l analytu

Opakovatelnost chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka RSD_7 koncentrací osmi stejně připravených standardních vzorků redukovaného flubendazolu o přibližné koncentraci 0,075 µmol/l (přesné koncentraci 0,075642 µmol/l) ve vzorcích před provedením LLE (viz. experimentální část 2.3.1. a 2.3.4. příprava základních roztoků, kde jsou uvedeny konkrétní navážky ALB a FLU-R; příprava standardních roztoků k hodnocení opakovatelnosti viz. experimentální část 2.4.3.) činí 1,519 %.

Hodnoty ploch pod píky FLU-R a ALB, ze kterých byly získány hodnoty koncentrací, jsou zpracovány do tabulky 14.

Výsledky dokresluje obrázek 15 (vzorový chromatogram).

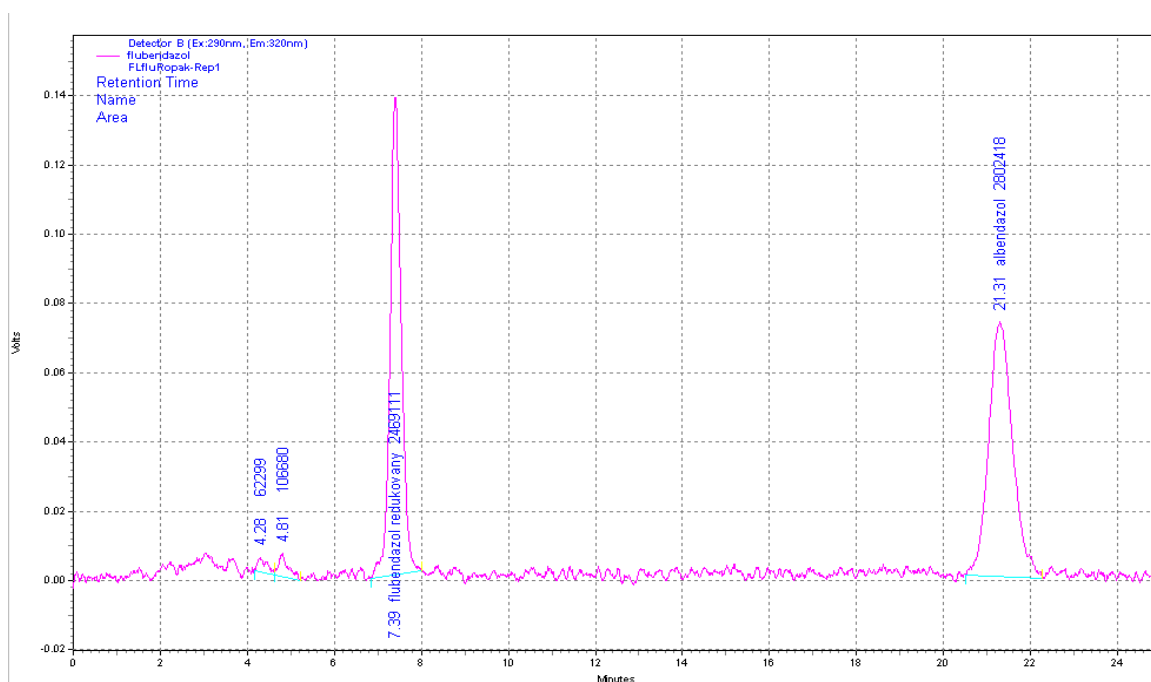
Součástí tabulky 14 je rovněž hodnota recovery R_2 vypočítaná z průměru nalezených koncentrací FLU-R ve vzorcích a množství FLU-R původně přítomného ve vzorcích 0,075642 µmol/l (viz. 4.1.4., experimentální část).

Tabulka 14: *Výsledky hodnocení opakovatelnosti spektrofluorimetrické detekce standardního vzorku s přibližným obsahem 0,075 µmol/l analytu: hodnoty ploch pod píky FLU-R a ALB (0,100 µmol/l) osmi nástrůků 8mi totožně připravených standardních vzorků redukovaného flubendazolu 0,075 µmol/l a vypočtená odpovídající koncentrace FLU-R ve vzorku, vypočtená relativní směrodatná odchylka nalezených koncentrací.*

Opakování (vzorek)	Plocha pod píkem FLU-R (75,64 nmol/l)	Plocha pod píkem ALB [IS] (99,62 nmol/l)	Odpovídající koncentrace FLU-R (nmol/l)
1	2469111	2802418	68,879
2	2512232	2793566	70,528
3	2453273	2861429	66,735
4	2481466	2648557	73,930
5	2451027	2816625	67,897
6	2369074	2641581	70,306
7	2443756	2663214	72,185

8	2397123	2485344	76,426
průměr	2447133	2714012	70,859
RSD ₇ (%)			1,52
R ₂ (%)			93,9

Obr. 15: Vzorový chromatogram z hodnocení opakovatelnosti chromatografie se spektrofluorimetrickou detekcí. Na chromatografickém záznamu je dobře rozlišitelný pík redukovaného flubendazolu s retenčním časem $t_R = 7,39$ minut, počátek chromatogramu zaujímají málo separované píky polárních sloučenin z biologického materiálu.



9. Výsledky chromatografického stanovení limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

Určení limitů vychází z metodiky Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL)^[31], některé validační parametry byly stanoveny podrobněji dle doporučení americké organizace Food and Drug Administration (FDA)^[32].

Nalezené limity byly ověřeny analýzou příslušných koncentrací hodnocených látek ve vzorku.

9.1. Limity detekce a kvantifikace pro hodnocení homogenizátů *Haemonchus contortus*

9.1.1. LOD a LOQ pro hodnocení homogenizátů *Haemonchus contortus* analyzovaných chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí

Oba limity byly počítány dle doporučení Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) z hodnot šumu v místě píku FLU-R na blankových chromatogramech vzorků AS-GS. Byly vypočítány koncentrační limity z rovnice: $y = 0,0022x$, kde y značí odhad směrodatné odchylky šumového signálu v místě FLU-R na blankovém chromatogramu, x odpovídající koncentraci látky. Rovnice: $y = 0,0022x$ byla získána vyhodnocením výšek píků analytu na chromatogramech kalibračních vzorků. LOD je pak $3x$ a LOQ $10x$. Limit detekce pro spektrofluorimetrické analýzy biologických vzorků *Haemonchus contortus* odpovídá koncentraci 0,17 nmol/l. Limit kvantifikace činí 0,59 nmol/l.

9.1.2. LOD a LOQ pro hodnocení homogenizátů *Haemonchus contortus* analyzovaných chromatografií se spektrofotometrickou detekcí

Obdobně jako v kapitole 9.1.1. byly vypočteny z hodnot signálů šumu (výška píku odpovídající signálu detektoru [mAU]) v místě píků FLU-H, FLU-R a FLU na blankových chromatogramech vzorků AS-GS příslušné limity. Limitní koncentrace pro chromatografická stanovení jsou zpracovány do tabulky 15.

Tabulka 15: *Koncentrační limity jednotlivých analytů pro chromatografická hodnocení se spektrofotometrickou detekcí homogenizátů Haemonchus contortus.*

Analyt	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
FLU-H	0,08	0,27
FLU-R	0,12	0,39
FLU	0,09	0,29

9.2. Výsledky chromatografického stanovení limitů detekce a kvantifikace biologických vzorků moči, plazmy, žluči

Oba limity byly určeny výpočtem z hodnot signálu šumu základní linie na blankovém chromatogramu v místech, kde jsou očekávány píky analytů. Vypočtená hodnota LOD a LOQ byla ověřena analýzou vzorků o příslušné koncentraci.

9.2.1. Limity detekce a kvantifikace analytů při chromatografickém stanovení v biologických vzorcích moči, plazmy, žluči se spektrofotometrickou detekcí

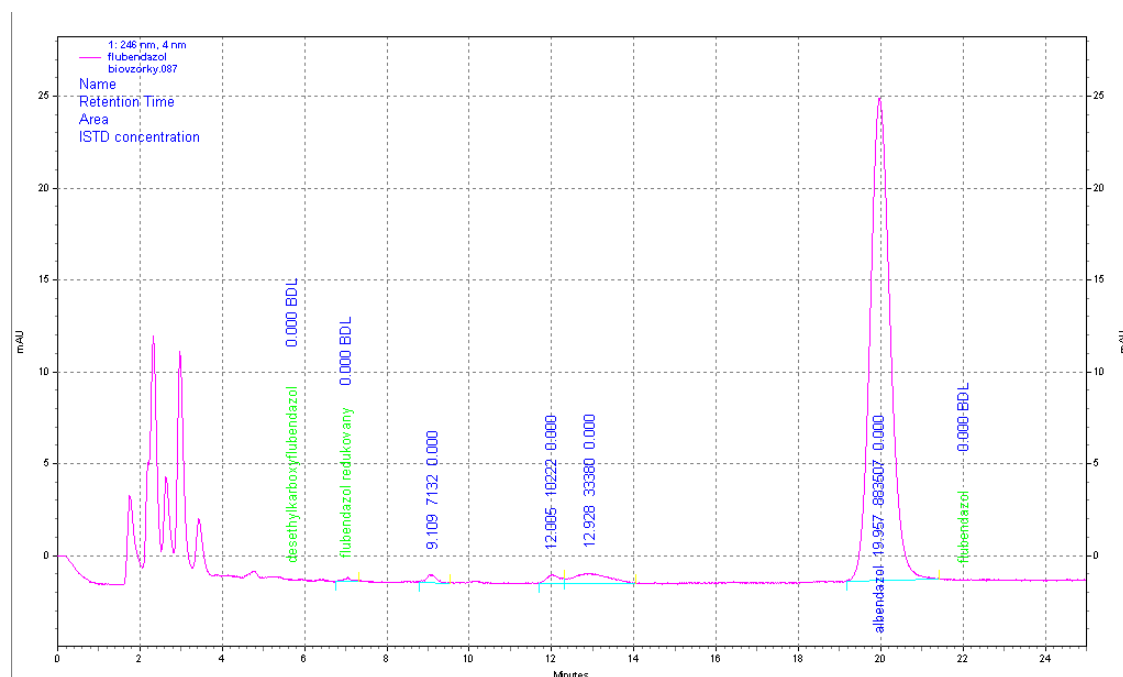
Vypočtené limitní koncentrace analytů ve vzorcích jsou zpracovány do tabulky 16.

Obrázek 16 představuje vzorový blankový chromatogram sloužící pro výpočet LOD a LOQ biologických vzorků plazmy. Obrázek 17 je vzorový chromatogram z analýzy, kterou se ověřovala hodnota LOQ FLU-R v plazmě vypočtená na základě chromatogramu z obrázku 16.

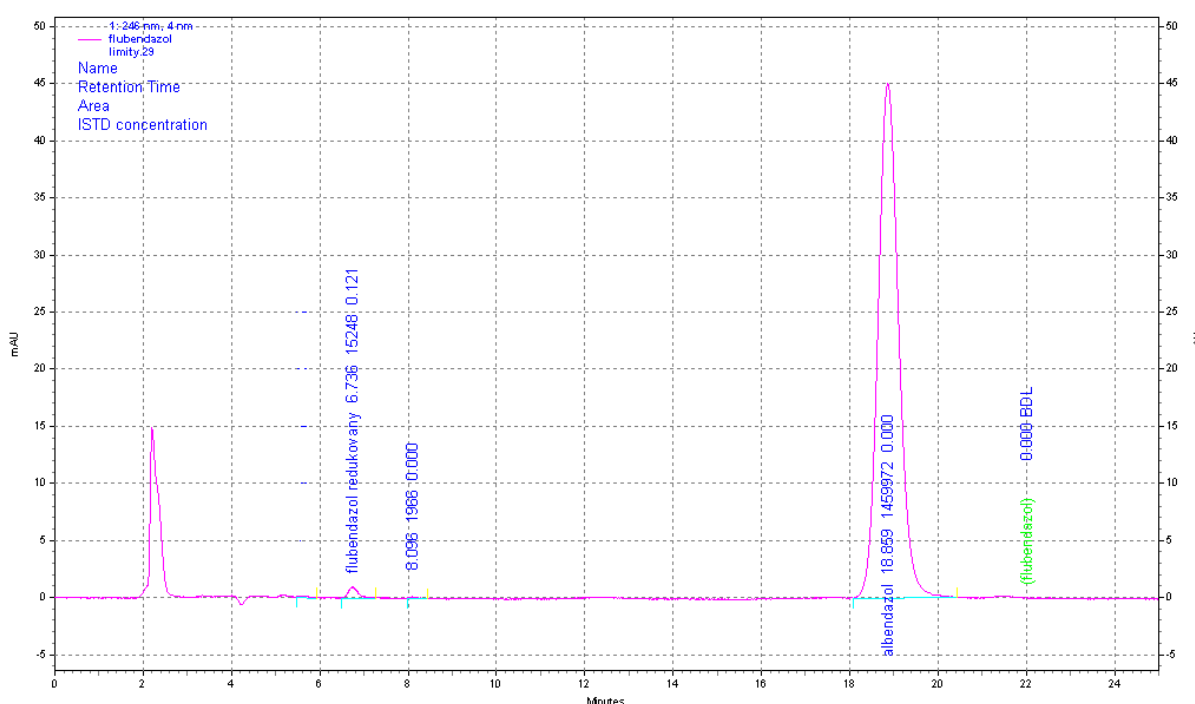
Tabulka 16: Vypočtené limitní koncentrace analytů ve vzorcích pro chromatografické analýzy biologického materiálu se spektrofotometrickou detekcí.

Analyt	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
MOČ		
FLU-H	2,8	9,3
FLU-R	2,7	9,1
FLU	1,8	6,1
PLAZMA		
FLU-H	0,11	0,36
FLU-R	0,20	0,67
FLU	0,14	0,46
ŽLUČ		
FLU-H	0,25	0,82
FLU-R	0,47	1,58
FLU	0,18	0,61

Obr. 16: Vzorový blankový chromatogram sloužící pro výpočet LOD a LOQ biologických vzorků plazmy. Spektrofotometrická detekce.



Obr. 17: Vzorový chromatogram z analýzy, kterou se ověřovala hodnota LOQ pro chromatografickou analýzu se spektrofotometrickou detekcí FLU-R v plazmě vypočtená na základě chromatogramu z obrázku 16.



9.2.2. Limity detekce a kvantifikace FLU-R při chromatografickém stanovení v biologických vzorcích moči, plazmy, žluči se spektrofluorimetrickou detekcí

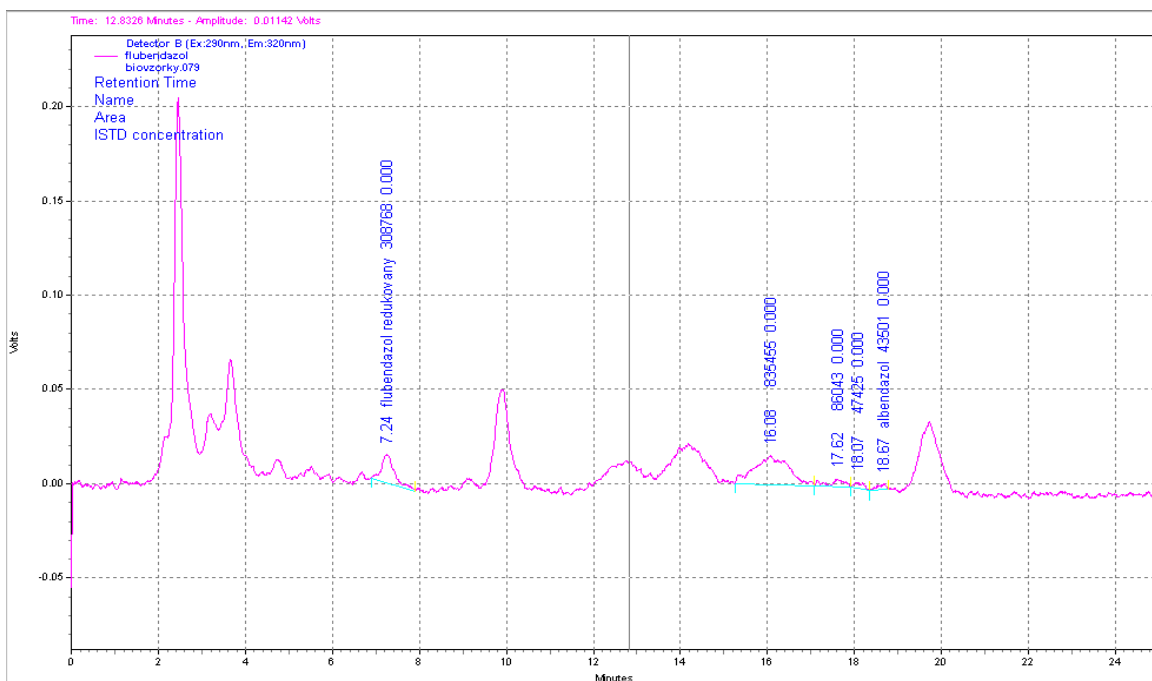
Vypočtené limitní koncentrace FLU-R ve vzorcích uvádí tabulka 17.

Obrázek 18 představuje vzorový blankový chromatogram sloužící pro výpočet LOD a LOQ biologických vzorků plazmy. Obrázek 19 je chromatogram z analýzy, kterou se ověřovala hodnota LOQ vypočtená na základě chromatogramu z obrázku 18.

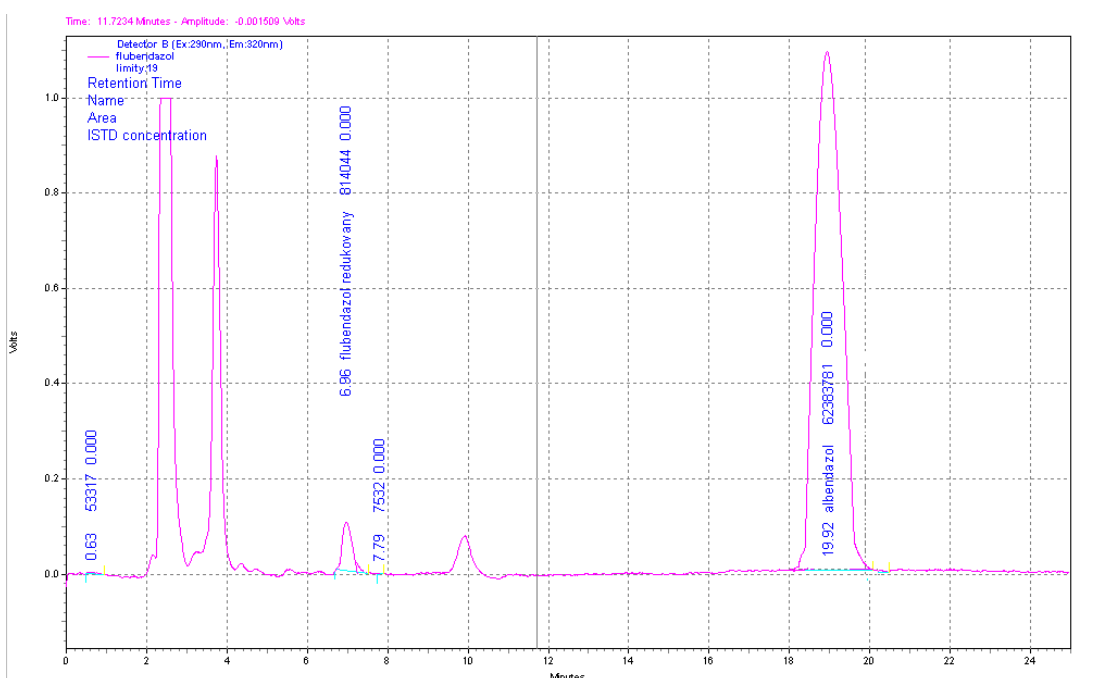
Tabulka 17: *Vypočtené limitní koncentrace FLU-R ve vzorcích pro chromatografické analýzy biologického materiálu se spektrofluorimetrickou detekcí.*

Biologický materiál	LOD (nmol/l)	LOQ (nmol/l)
MOČ	57,4	191,4
PLAZMA	0,8	2,7
ŽLUČ	2,1	7,0

Obr. 18: *Vzorový blankový chromatogram sloužící pro výpočet LOD a LOQ biologických vzorků plazmy. Spektrofluorimetrická detekce.*



Obr. 19: Vzorový chromatogram z analýzy, kterou se ověřovala hodnota LOQ analyzovaného FLU-R v plazmě vypočtená na základě chromatogramu z obrázku 18.



10. Výsledky stanovení flubendazolu a jeho metabolitu FLU-R ve vzorcích určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce

Byly analyzovány biologické vzorky (mikrosomální a cytosolová frakce homogenizátů *Haemonchus contortus*, roztoku NADPH; příprava viz. experimentální část 3.1.). K analýze byly dodány odparky bez přidaného vnitřního standardu.

Odparky byly rekonstituovány způsobem 3.5.1.II. uvedeným v experimentální části. ALB byl přidáván z důvodu ověření retenčních časů. Byl přidáván 1 μ l 0,100 mmol/l pro chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí. V případě chromatografických stanovení se spektrofotometrickou detekcí byl ALB [IS] (1 μ l 10 mmol/l) přidáván k již rekonstituovaným odparkům s přidaným 1 μ l 0,100 μ mol/l ALB. Kvantifikace byla prováděna vyhodnocením z kalibrační přímky, která byla získána jako závislost průměrné plochy píků příslušného analytu na chromatogramech kalibračních vzorků na koncentraci.

10.1. Výsledky chromatografického stanovení se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce

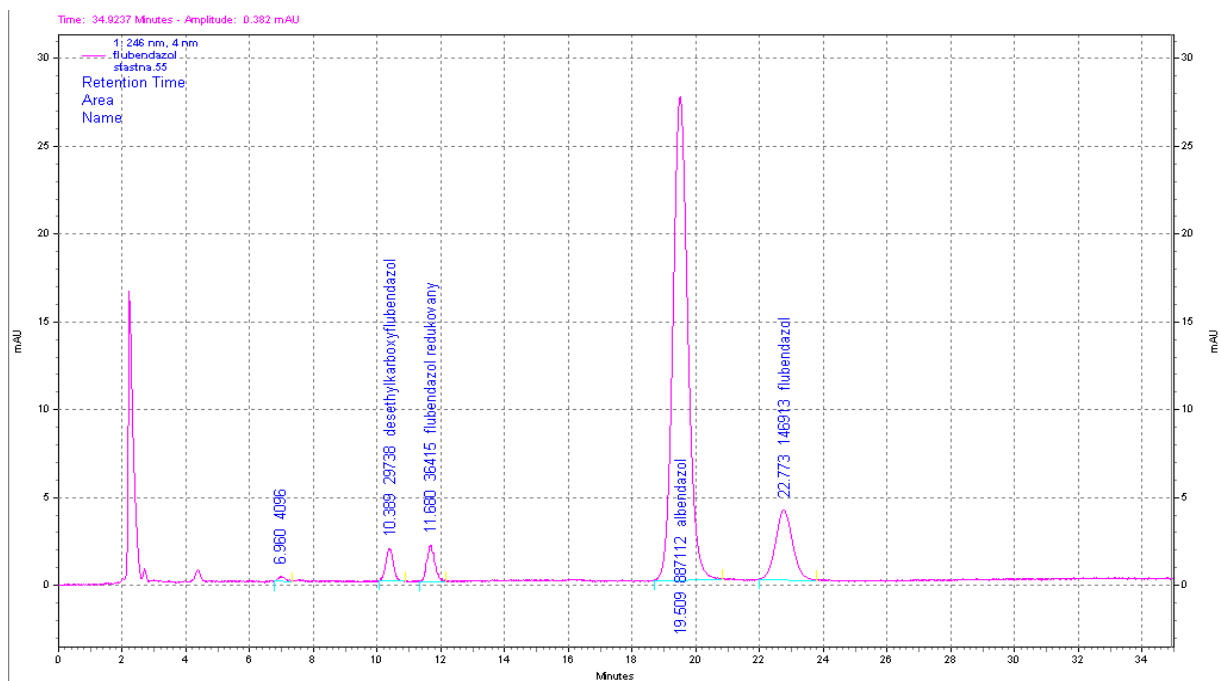
Byla stanovena koncentrace FLU. Výsledky dokládá tabulka 18. Nula uvedená v buňkách tabulky znamená, že analyt ve vzorku nebyl nalezen. Výsledky doplňuje vzorový chromatogram vzorku A1 na obrázku 20.

Tabulka 18: *Výsledky spektrofotometrického stanovení biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce.*

Vzorek	Plocha FLU	Koncentrace FLU ve vzorku (μ mol/l)
--------	------------	--

A1	157433	3,40
A2	104094	2,11
A3	116620	2,41
A4	100844	2,03
A5	169844	3,70
A6	148757	3,19
A7	0	0
A8	0	0
A9	89405	1,75
B1	148285	3,18
B2	165199	3,59
B3	135163	2,86
B4	129178	2,72
B5	172943	3,78
B6	256815	5,81
B7	0	0
B8	0	0
B9	67837	1,23
C1	139268	2,96
C2	166681	3,63
C3	161638	3,50
C4	166566	3,62
C5	191164	4,22
C6	159724	3,46
C7	0	0
C8	0	0
C9	94136	1,87

Obr. 20: Vzorový chromatogram z chromatografického stanovení se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce. Vzorek A1.



10.2. Výsledky chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce

Byla stanovena koncentrace FLU-R. Nalezené koncentrace jsou součástí tabulky 19. Obrázek 21 představuje vzorový chromatogram z tohoto stanovení (vzorek C2).

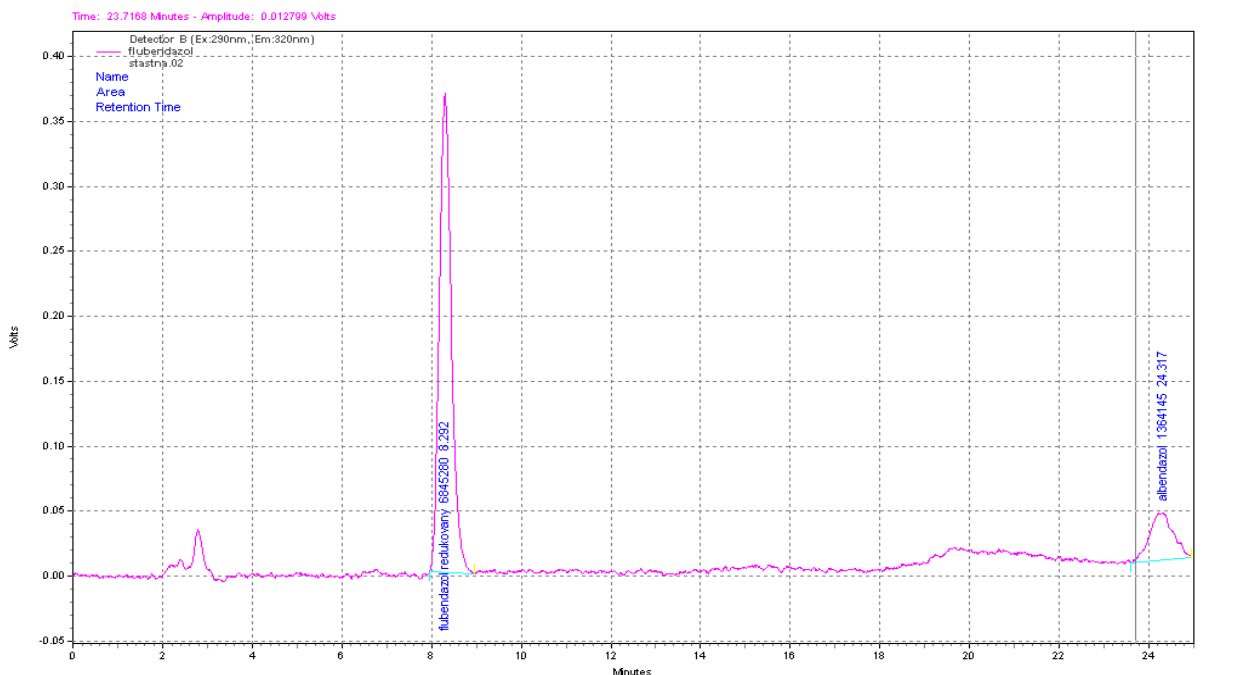
Vzorek C4 nebyl fluorescenčně hodnotitelný.

Tabulka 19: Výsledky chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce.

Vzorek	Plocha FLU-R	Koncentrace FLU-R ve vzorku (nmol/l)
A1	4985988	164,5
A2	5642077	189,3
A3	5888709	198,7

A4	837184	7,4
A5	905278	10,0
A6	820347	6,8
A7	0	0
A8	0	0
A9	141927	0
B1	3531320	109,4
B2	4502360	146,2
B3	3062864	91,6
B4	519503	0
B5	939902	11,3
B6	930506	10,9
B7	0	0
B8	0	0
B9	30614	0
C1	4427145	143,3
C2	6845280	234,9
C3	8030254	279,7
C4	-	0
C5	1243319	22,8
C6	1015185	14,1
C7	0	0
C8	0	0
C9	63975	0

Obr. 21: Vzorový chromatogram z chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků určených k testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce Vzorek C2.



11. Výsledky stanovení flubendazolu a jeho metabolitů v biologických vzorcích *Haemonchus contortus*

Byly analyzovány biologické vzorky homogenizátů *Haemonchus contortus*. Odparky byly rekonstituovány způsobem uvedeným v experimentální části 3.5.1.II. V případě potřeby (nalezená koncentrace mimo kalibrační rozsah) byly rekonstituované odparky patřičně naředěny.

V případě chromatografických stanovení se spektrofotometrickou detekcí byly hodnoceny píky FLU a ALB. Metabolit FLU-H nebyl na chromatogramech detekovatelný.

Metabolit FLU-R byl hodnocen chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí.

Ke všem vzorkům byl před extrakcí přidán 1 μ l roztoku vnitřního standardu o koncentraci 10 mmol/l.

11.1. Chromatografická analýza se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků po inkubaci *Haemonchus contortus* s flubendazolem

V případě chromatografických stanovení se spektrofotometrickou detekcí byla stanovena koncentrace FLU. Výsledky dokládá tabulka 20 a dokresluje vzorový chromatogram na obrázku 22.

Tabulka 20: Výsledky chromatografického stanovení FLU v biologických vzorcích po inkubaci *Haemonchus contortus* s léčivem. Stanovení se spektrofotometrickou detekcí při 246 nm.

Vzorek	Plocha FLU	Koncentrace FLU (μmol/l)
1	234368	2,26
2	261285	2,30
3	518153	4,49
4	557864	4,68
5	0	0
6	0	0
7	96264	0,78
8	541937	4,79
9	183290	1,71
10	0	0
11	164317	1,43
12	103372	0,88
13	108184	0,90
14	113722	0,96
15	134193	1,01
16	108278	0,90
17	95152	0,70
18	436593	3,98
19	293260	2,38
20	285708	2,27
21	264748	2,20
22	299952	2,49
23	276268	2,33
24	389763	3,15
25	789004	7,13
26	536504	4,97
27	590160	5,16
28	563972	5,08
29	609458	5,34
30	599052	5,29

31	567693	4,88
39	0	0
40	0	0
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	0	0
46	0	0
47	0	0

11.2. Chromatografická analýza se spektrofluorimetrickou detekcí biologických vzorků po inkubaci *Haemonchus contortus* s flubendazolem

V případě spektrofluorimetrické detekce nastala komplikace, neboť bylo nutno stanovit koncentraci FLU-R ve vzorcích, které obsahovaly příliš vysoké množství vnitřního standardu. Kvantifikace musela být proto provedena z kalibrační přímky získané jako závislost průměrné plochy píků příslušného analytu na chromatogramech kalibračních vzorků na koncentraci.

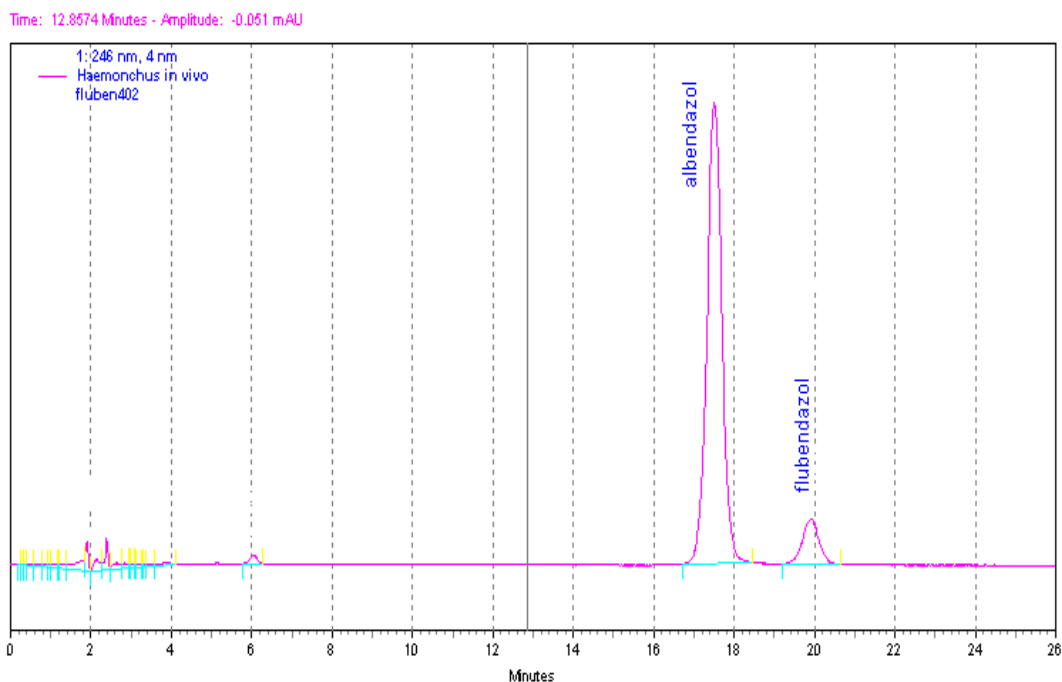
Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 21 a doplněny obrázkem 23.

Tabulka 21: Výsledky chromatografického stanovení FLU-R v biologických vzorcích po inkubaci *Haemonchus contortus* s flubendazolem. Stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí ($\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 320 \text{ nm}$).

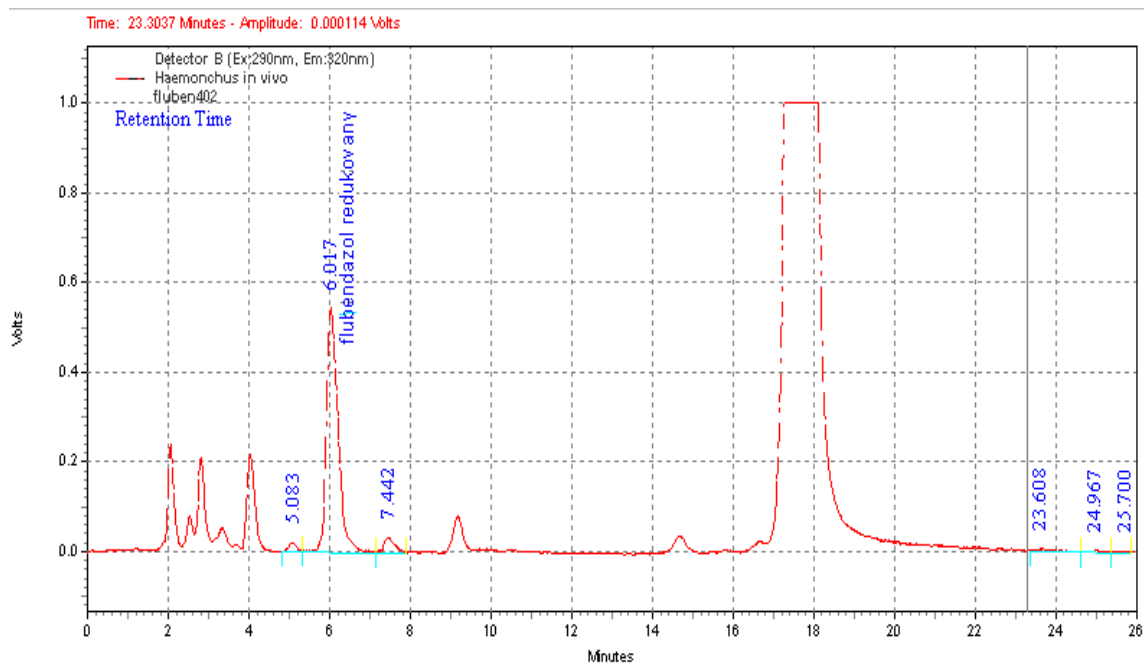
Vzorek	Plocha píku FLU-R	Koncentrace FLU-R (nmol/l)
1	7878746	153,9
2	6971298	123,5
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	2642115	42,7
13	3058270	48,8

14	2854677	45,9
15	3969262	58,0
16	3164521	50,4
17	3095630	43,3
18	0	0
19	7970358	130,3
20	5826044	91,8
21	5356609	88,1
22	8408980	140,8
23	7866144	133,8
24	12482387	205,4
25	0	0
26	10869728	205,3
27	12153699	216,6
28	13192056	242,6
29	0	0
30	13190444	237,8
31	0	0
39	0	0
40	0	0
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	0	0
46	0	0
47	0	0

Obr. 22: Vzorový chromatogram ze stanovení koncentrace FLU v homogenizátech *Haemonchus contortus* (spektrofotometrická detekce).



Obr. 23: Vzorový chromatogram ze stanovení koncentrace FLU-R v homogenizátech *Haemonchus contortus* (spektrofluorimetrická detekce).



12. Výsledky chromatografické analýzy biologických vzorků moči, plazmy, žluči

Před započítím analýzy flubendazolu a jeho metabolitů v neznámých biologických vzorcích byl posuzován vliv sloučenin obsažených v biologickém materiálu na hodnocení chromatogramů a to jak za podmínek spektrofotometrické detekce, tak analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí. Byl rovněž sledován vliv reextrakce vodou během LLE na množství interferujících polárních látek, které se objevovaly v chromatogramech.

K experimentům posloužily standardní vzorky s obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ FLU-H, FLU-R, FLU a 10 $\mu\text{mol/l}$ ALB [IS] v případě analýz se spektrofotometrickou detekcí a obsahem 0,025 $\mu\text{mol/l}$ FLU-H, FLU-R, FLU a 0,100 $\mu\text{mol/l}$ ALB [IS] v případě analýz se spektrofluorimetrickou detekcí v 1 ml příslušného biologického materiálu (moči, plazmy, žluči). Standardní vzorky byly zpracovány LLE dle 3.3.1 a 3.3.2. (LLE s reextrakcí vodou). Odparky po extrakci byly rekonstituovány postupem 3.5.1.II. uvedeným v experimentální části.

12.1. Výsledky chromatografické analýzy připravených standardních vzorků moči

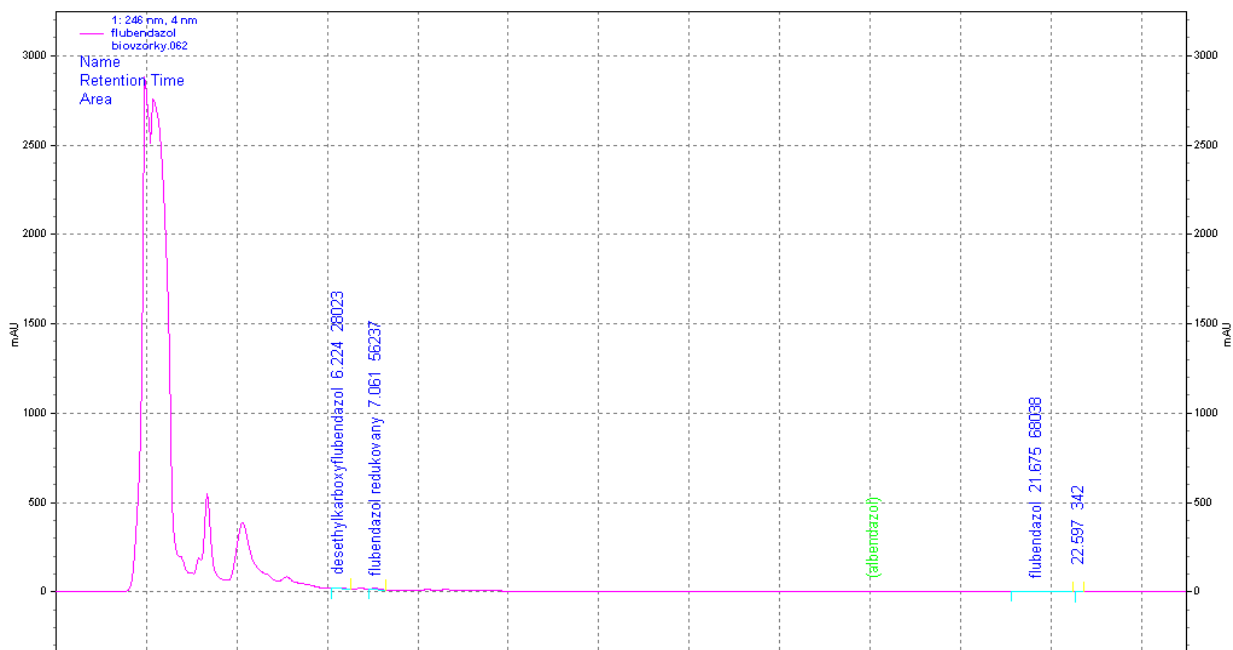
K analýzám bylo použito moči beráneků „A“ (zdravých, neléčených) 17 599 a 17 604.

Kromě ovlivnění vlastní chromatografie byl rovněž sledován vliv reextrakce vodou během LLE na množství interferujících látek, které se objevovaly v chromatogramech.

12.1.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků moči

Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardních vzorků s přidavkem moči demonstruje chromatogram na obrázku 24.

Obr. 24: *Chromatogram analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardního vzorku moči s obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorku. ALB [IS] byl obsažen v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.*

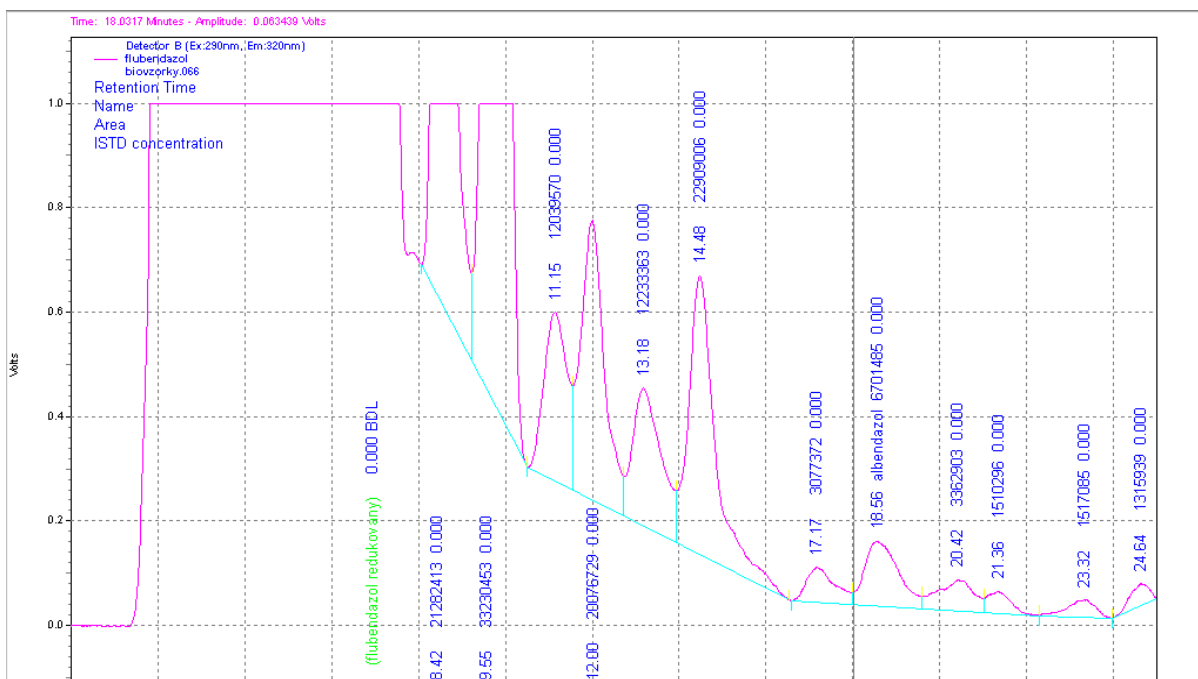


12.1.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků moči

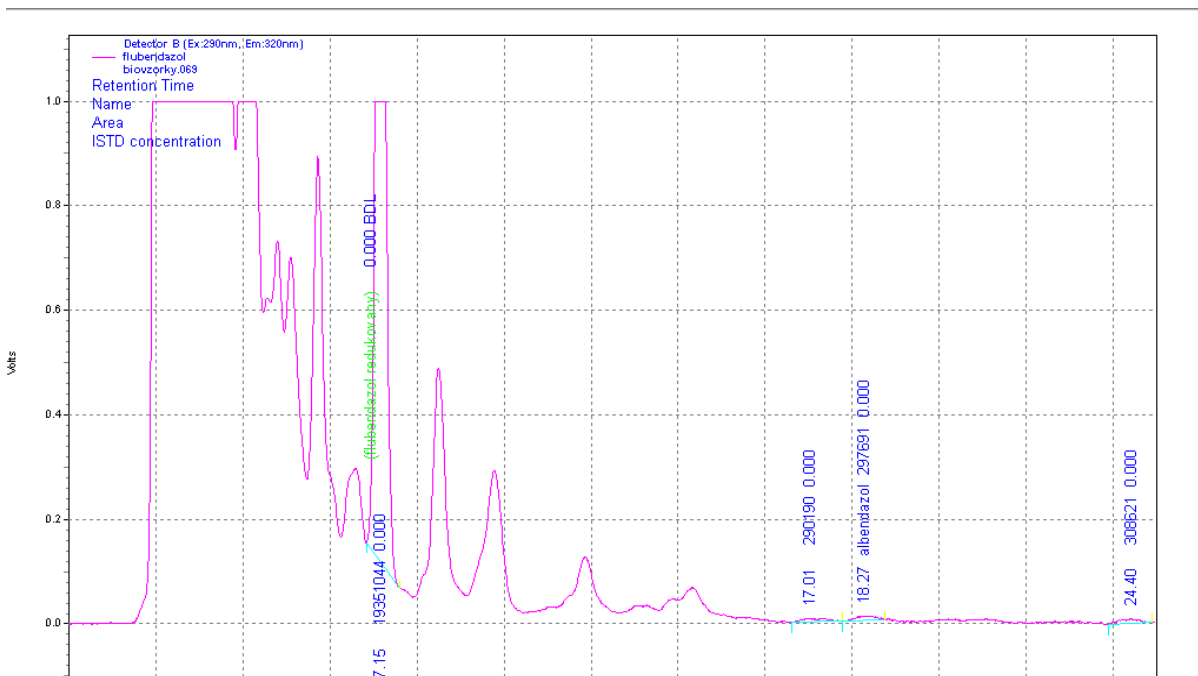
Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardních vzorků moči demonstrují chromatogramy na obrázcích 25, 26, 27. Chromatogram na obrázku 28 vypovídá o míře reextrakce nečistot ve vzorcích do vody.

Po proměření prvního chromatogramu, byl vzorek dále zředován: 10krát (obrázek 26) a 100krát (obrázek 27). Důvodem byla přítomnost fluoreskujících sloučenin ve vzorku, jejichž fluorescenční aktivita dalece přesahovala aktivitu stanovovaných analytů sledovaných ve standardních vzorcích s přidavkem biologického materiálu cytosolu.

Obr. 25: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku moči s obsahem 0,025 FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,100 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 26: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku moči s obsahem 0,0025 µmol/l FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,010 µmol/l.



Obr. 27: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku moči s obsahem 0,00025 µmol/l FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,001 µmol/l

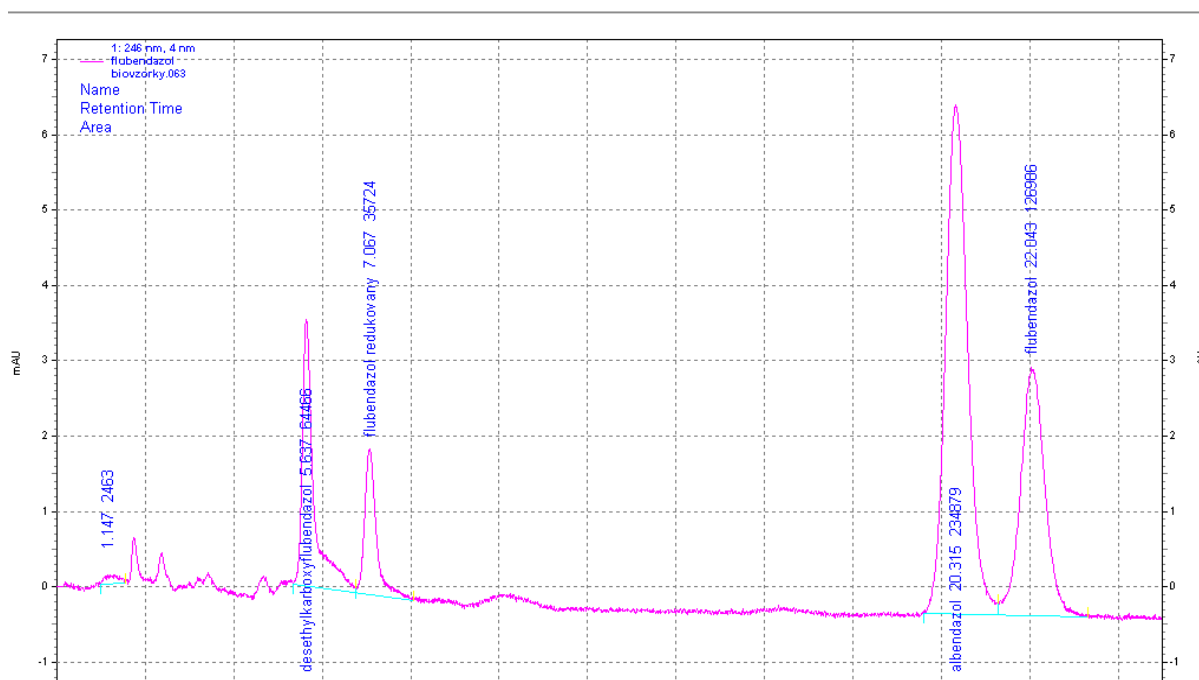
K analýzám bylo použito plazmy beránků „A“ (zdravých, neléčených) 17 599 a 17 604.

Kromě ovlivnění vlastní chromatografie byl rovněž sledován vliv reextrakce vodou během LLE na množství interferujících látek, které se objevovaly v chromatogramech.

12.2.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků plazmy

Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardních vzorků plazmy demonstruje chromatogram na obrázku 29.

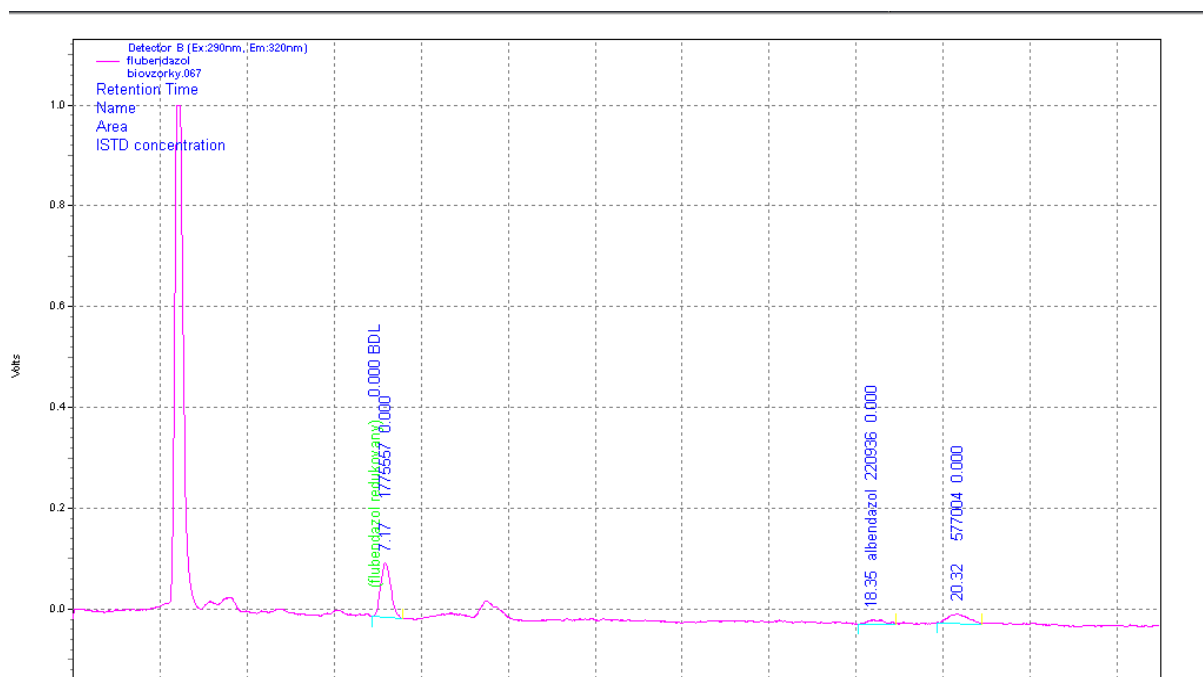
Obr. 29: Chromatogram analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardního vzorku plazmy s obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.



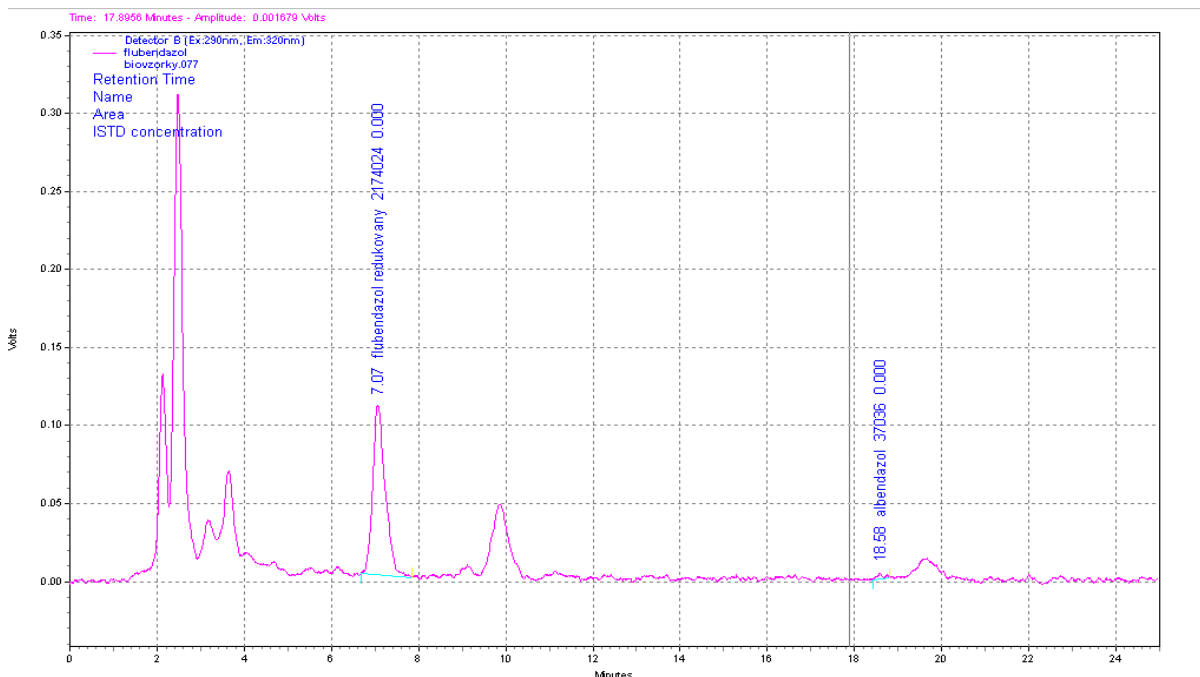
12.2.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků plazmy

Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardních vzorků plazmy demonstrují chromatogramy na obrázcích 30 a 31. Chromatogram na obrázku 31 vypovídá o míře reextrakce polárních součástí vzorku do vody.

Obr. 30: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku plazmy s obsahem 0,025 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,100 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 31: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku plazmy s obsahem 0,025 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,100 $\mu\text{mol/l}$. Vzorek podrobený reextrakci vodou.



12.2.III. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí neznámých vzorků plazmy

Chromatografická metoda se spektrofluorimetrickou detekcí byla použita ke stanovení FLU-R v reálných vzorcích ovčí plazmy. Vzorky byly zpracovávány postupem 3.3.3. uvedeným v experimentální části. Odparky vzorků rekonstituovány dle 3.5.1.II. Vzhledem k vysokým koncentracím, které leží mimo kalibrační rozsah byly vzorky ředěny 20x (prvních 6) nebo 10x (poslední dva). Nalezené koncentrace jsou zpracovány do tabulky 22.

Tabulka 22: Výsledky spektrofluorimetrického stanovení koncentrací FLU-R v neznámých vzorcích plazmy.

Vzorek plazmy	Nalezená koncentrace
---------------	----------------------

	FLU-R (nmol/l)
17605	176,2
17606	126,5
19073	127,0
19076	171,8
22196	151,6
22197	139,0
22198	74,4
22199	88,8

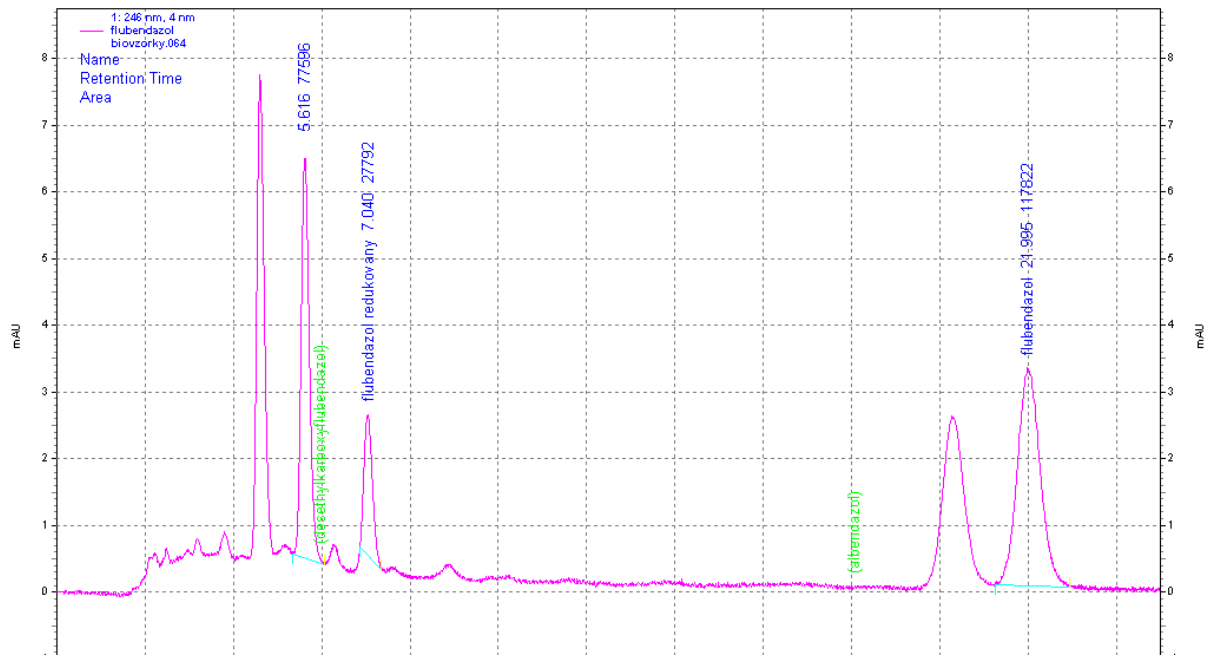
12.3. Výsledky chromatografické analýzy připravených standardních vzorků žluči

K analýzám bylo použito žluči beránka „A“ (zdravý, neléčený) 17 598.

12.3.I. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí připravených standardních vzorků žluči

Výsledky chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardních vzorků žluči demonstruje chromatogram na obrázku 32.

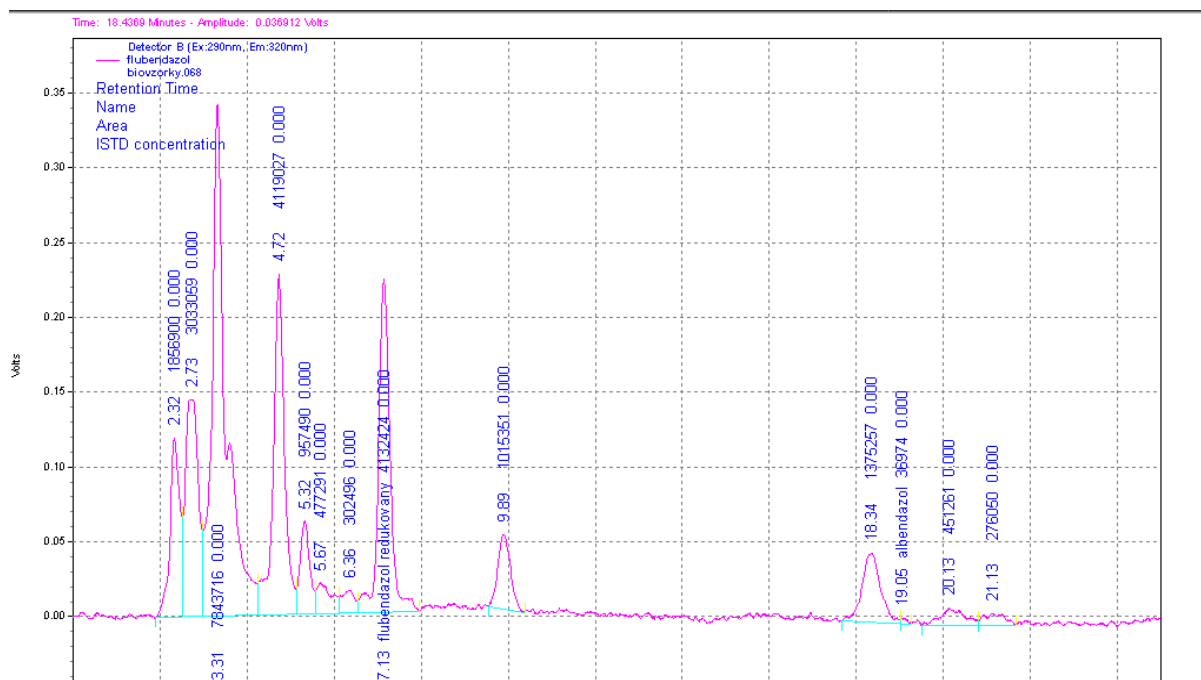
Obr. 32: *Chromatogram analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardního vzorku žluči s obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.*



12.3.II. Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí připravených standardních vzorků žluči

Výsledky chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku žluči demonstruje chromatogram na obrázku 33.

Obr. 33: Chromatogram analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí standardního vzorku žluči s obsahem 0,025 µmol/l FLU-R ve vzorku. ALB [IS] je obsažen v koncentraci 0,100 µmol/l.



Diskuse

1. Optimalizace rychlosti průtoku MF kolonou

Během předběžných experimentů byl posuzován vliv rychlosti průtoku MF kolonou 250 x 3 mm na chromatografickou analýzu. Výsledky optimalizace dokumentují obrázky 2 a 3 uvedené ve výsledkové části.

Vyšší průtok MF 1,0 ml/min vedl sice k výraznému zkrácení času analýzy, zároveň však neposkytoval dobré rozdělení především píků FLU-H a FLU-R až na nulovou linii. Průtokové rychlosti 0,85 ml/min, 0,76 ml/min a 0,70 ml/min vedly k chromatogramům s jen malými rozdíly v retenčních časech analytů při dostatečném rozdělení chromatografovaných píků až na nulovou linii.

Za optimální byla zvolena průtoková rychlost 0,70 ml/min MF kolonou, při které se nalezené retenční časy maxim píků jednotlivých analytů nejvíce přiblížily retenčním časům, jak je získal Nobilis^[30], který se analýze FLU a jeho metabolitů věnoval jako první na koloně 250 x 4 mm se stejnou stacionární fází, které byla použita v této práci.

2. Optimalizace složení rozpouštědla používaného při rekonstituci odparků

Na počátku vývoje chromatografické metody pro stanovení flubendazolu a jeho metabolitů (FLU-H a FLU-R) bylo nutné zvolit optimální postup pro rekonstituci odparků biologických vzorků zamýšlených k analýze. Předběžné chromatografické experimenty probíhaly se spektrofotometrickou detekcí a sledovaly dopad rozpouštědel použitých k rekonstituci na kvalitu a čitelnost chromatogramů, na míru separace jednotlivých analytů (FLU, FLU-H, FLU-R a ALB [IS]) v modelových vzorcích.

Postupně byly hodnoceny chromatogramy po rekonstituci pouze acetonitrilem, po rekonstituci vzorků směsí ACN : fosforečnanový pufr (0,025 M, pH = 3,07) a také vliv dimethylsulfoxidu aplikovaného přímo na odparky před rekonstitucí výše zmíněnými rozpouštědly.

Testování vlivu DMSO se opíralo o známou špatnou rozpustnost FLU (< 10 mg/l) ve vodě, ale i jeho nízkou rozpustnost v dalších polárních rozpouštědlech (ethanol). Rozpustnost FLU v dimethylsulfoxidu, která činí asi 15 g/l, byla pro uvažované experimenty považována za dostatečnou (dle ČL

2002 by byl FLU v DMSO hodnocen jako mírně rozpustný). Teoretickým základem pro testování vlivu aplikace DMSO přímo na odparky vzorků byl potom předpoklad, že přijatelná rozpustnost FLU v DMSO příznivě ovlivňuje průběh rekonstituce odparků s uvažovaným analytem. Zároveň však byla zvažována druhá strana mince použití DMSO – jeho negativní působení na běh chromatografických analýz, kdy látky přítomné v analyzované směsi vyznačující se vyšší eluční silou nežli používaná MF způsobují rozmývání chromatografických zón, zhoršují retenci analytů na koloně. Zmíněné teoretické předpoklady potvrdil mj. i chromatogram získaný z analýzy po rekonstituci odparku pouze ACN (obr. 4) a chromatografování s použitím MF ACN: fosforečnanový pufr (0,025M, pH = 3,07) 3:7 (v/v) (obr. 5 a 8). ACN se pro rekonstituci odparků ukázal jako nepoužitelný, neboť chromatografické zóny jednotlivých analytů byly vzájemně jen stěží rozlišitelné. Naopak rekonstituce odparků používanou MF znamenala získání kvalitních chromatogramů.

Výsledky hodnocení vlivu DMSO na rekonstituci odparků vzorků MF a jejich následnou chromatografickou analýzu byly však příznivé, chromatografické píky jednotlivých analytů byly rozdělené až na základní linii a přijatelně ostré. Původní obavy z výrazného elučního působení aplikovaného DMSO se ukázaly jako přehnané. Kladnou roli zde zřejmě hraje použití jen minimálních objemů DMSO při rekonstituci. Výsledky dokumentují obr. 6, 7, bohužel bez patrného píku vnitřního standardu ALB.

Vnitřní standard ALB nebyl v prvotních experimentech hodnotitelný, ačkoli byl přidáván do vzorků pro předběžnou analýzu. Obtíže byly způsobeny s nejvyšší pravděpodobností použitím starší šarže substance (oxidovaná, zvlhlá) na přípravu vzorků, protože s použitím jiné, novější šarže, byl ALB nacházen na chromatogramech bez problémů v podobě píku s t_R kolem 19 min (viz. obr. 8 a další ve výsledkové části).

Současně s posuzováním tvaru a rozdělení chromatografických píků až na nulovou linii byl hodnocen vliv přidávaného DMSO na kvantifikaci analytů FLU-H a FLU-R přítomných ve vzorcích v ekvivalentních množstvích hodnocením ploch pod píky. Stanovení koncentrací metabolitů FLU-H a FLU-R ve vzorcích nebyla prováděna, ve fázi předběžných experimentů se jevila jako zbytečná. V úvahách o výhodách a nevýhodách různých způsobů rekonstituce odparků vzorků plně postačovalo relativní posouzení ploch píků.

Jak vyplývá z tabulky 7 ve výsledkové části, přítomnost DMSO ve vzorcích zvýšila plochu pod píky FLU-H, výsledky s FLU-R však nebyly homogenní a nelze proto zobecňovat příznivý vliv přídavku DMSO na kvantifikaci (větší píky na chromatogramu jsou přesněji integrovány).

Rovněž byl z tabulky 7 odhadován dopad rekonstituce pouze složkami MF (ACN a fosforečnanovým pufrům) na kvantifikaci chromatogramů. Rekonstituce pouze MF vedla k nejnižším hodnotám ploch FLU-H avšak nejvyšším hodnotám ploch FLU-R, které spolu s nejnižšími hodnotami relativních směrodatných odchylek pro FLU-H i FLU-R (RSD_4) nakonec přispěly k rozhodnutí rekonstituovat odparky uvažovaných biologických vzorků pouze MF bez aplikace DMSO.

Vzorky 4 a 5 uvedené v tabulce 7 byly zředěvány 2krát MF a pro srovnání se zbylými vzorky v tabulce bylo použito dvojnásobku nalezených ploch. Důvodem k jejich zředěvání MF byly pilotní pokusy zaměřené opět na hodnocení vlivu DMSO aplikovaného na odparky před rekonstitucí MF a na posouzení vlivu ředění vzorků MF na výsledky kvantifikace. V rámci tabulky 7 je tak možné vedle srovnání vlivu přidaného 0,5 μ l DMSO k odparku následně zředěvanému MF zároveň pozorovat pozitivní dopad ředění testovaných vzorků na kvantifikaci. Velikosti ploch FLU-H ředěných vzorků 4 a 5 po korelaci (zdvojnásobení pro srovnatelnost) významně převyšují plochy nalezené u ekvivalentního vzorku 6 s přidaným 0,5 μ l DMSO, jenž však nebyl ředěn. Hodnoty ploch FLU-R ve vzorcích 4 a 5 (tab. 7) jsou rovněž vyšší než nalezená plocha vzorku 6, avšak rozdíl není tak výrazný jako pro analyzovaný FLU-H. Vysoká hodnota RSD_3 pro FLU-H v tabulce 7 (13,4 %) ovšem pozitivně ředění značně oslabuje. Vzorky po rekonstituci byly proto při analýzách ředěny pouze tehdy, když byla jejich koncentrace nad horní hranicí kalibračního rozsahu.

Rekonstituci bez použití DMSO nahrává i hodnocení retenčních časů jednotlivých analytů na chromatogramech po rekonstituci bez (tabulka 6 – nízké hodnoty RSD_1 retenčních časů všech analytů s nejvyšší hodnotou pro analyzovaný FLU-R rovnou 0,10 %) a s (tabulka 8 – hodnoty RSD_5 retenčních časů jednotlivých analytů s nejnižší hodnotou pro FLU-R rovnou 0,90 % a nejvyšší hodnotou pro analyzovaný FLU 1,17 %) použitím DMSO aplikovaného přímo na odparky vzorků. Výsledky nehovoří přímo pro jeho uplatnění během rekonstituce, proto bylo dále pracováno s rekonstitucí pouze MF.

K rozhodnutí přispěla rovněž úvaha o zvýšení pracnosti rekonstituce s použitím DMSO aplikace přímo na odparky vzorků, neboť přídavek organického rozpouštědla byt' v tak nepatrném množství jako je 0,5 nebo 1,0 μl představuje další krok navíc během úpravy vzorků pro jejich následnou chromatografickou analýzu. Práce bez přídavku DMSO s pouhou rekonstitucí odparků pouze MF, jejíž výhody nakonec převážily, nejen šetří laboratorní čas, ale mohla by v budoucnu dále přispět k eventuální automatizaci celé techniky rekonstituce.

Konečně pro zvolený postup hovoří rovněž hodnoty rozlišení chromatografických píků jednotlivých analytů vypočítané z tabulky 6 (rekonstituce pouze používanou MF). Rozlišení pro píky FLU-H a FLU-R R_{S1} totiž činí 1,94 a hodnota rozlišení pro píky ALB a FLU R_{S2} je rovna 1,60, přičemž za dokonalé je považováno rozlišení $\geq 1,5$, jak je uvedeno ve stati věnované chromatografickým separačním metodám v současně platném lékopise^[10, 11].

3. Optimalizace techniky rekonstituce odparků

Součástí optimalizace rekonstituce odparků bylo také sledování vlivu její techniky na chromatografickou analýzu. Odparky byly rekonstituovány bez a s použitím ultrazvukového generátoru (působení 25 kHz po dobu 1,5 nebo 5 min). Byl rovněž posuzován vliv pořadí přidávaných součástí MF na výsledky chromatografie. K hodnocení sloužilo porovnání ploch pod píky analyzovaného FLU-H. Výsledky dokumentuje tabulka 9 uvedená ve výsledkové části.

Jako nejlepší se ukázala rekonstituce odparku, která probíhala ve sledu: aplikace 300 μl ACN k odparku a následná 5 min sonifikace, přidání 700 μl fosforečnanového pufru (0,025 M, pH = 3,07) a opětovná 5 min sonifikace roztoku. V takto rekonstituovaném odparku bylo chromatografií zjištěno největší množství analyzovaného FLU-H odpovídající největší nalezené ploše (vzorek D, tabulka 9) ze čtyř různě zpracovávaných vzorků s obsahem stejného množství FLU-H v původním odparku.

Uvedený sled rekonstituce odparků byl proto používán během všech pozdějších chromatografických analýz standardních i neznámých biologických vzorků.

4. Stanovení kalibračních přímek pro spektrofotometrickou detekci

Výsledky kalibračních měření dokládá tabulka 10 a obrázky 9, 10, 11, 12 uvedené ve výsledkové části.

Kalibrační přímky jsou charakterizovány regresními rovnicemi 1-3 (viz. tabulka 10) a koeficienty determinace, které jsou rovněž součástí tabulky 10. Hodnota koeficientu determinace kalibrační přímky FLU činí 0,999, přičemž srovnatelné hodnoty koeficientů determinace pro následné kvantifikace látek jsou běžně požadovány pro publikování výsledků analýz v současné analytické literatuře (např. Journal of Chromatography A).

Hodnoty koeficientů determinace kalibračních přímek FLU-H (0,998) a FLU-R (0,996) sice ukazují na poněkud menší shodu kalibračních dat a příslušných regresních rovnic ale byly považovány za dostačující pro následné kvantifikace analytů v biologických vzorcích analyzovaných v rámci rigorózní práce.

Mírné odchylky hodnot koeficientů determinace od hodnoty 1,000 mohou být způsobeny použitým biologickým materiálem přítomným ve standardních vzorcích měřených během kalibrace metody, neboť tento materiál (cytosol potkaních samců kmene Wistar) pocházel od více laboratorních zvířat. Interindividuální variabilita v rámci jednoho druhu zvířat, kmene i chované skupiny (samozřejmě je chov za standardních podmínek pro všechna laboratorní zvířata) je však nedílnou součástí experimentů v rámci biomedicínských aplikací, kterou experimentátor může ovlivnit pouze zčásti.

5. Hodnocení opakovatelnosti chromatografických analýz se spektrofotometrickou detekcí

Opakovatelnost byla hodnocena stanovením koncentrací analytů FLU, FLU-H a FLU-R v sérii 8mi vzorků připravených stejným způsobem a vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka těchto koncentrací pro jednotlivé analyty. Hodnoty relativních směrodatných odchylek jsou součástí tabulky 11 uvedené ve výsledkové části.

Z tabulky 11 je patrné, že nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo u analyzovaného FLU-H (hodnota RSD_6 činí 0,10 %), nejhorší u analyzovaného FLU (RSD_6 rovná 0,27 %). Zjištěná hodnota RSD_6 pro FLU-R představuje 0,25 %.

Získaná data vypovídají o mírném trendu zhoršování opakovatelnosti analýz pro analyty, které se během chromatografické analýzy eluují později, a jejichž píky se nacházejí relativně daleko od počátku chromatogramu. Celkově byla však prokázána výborná opakovatelnost analýz.

Obecně během chromatografování často dochází k větším výkyvům retenčních časů (sekundárně i kvantifikace) později eluovaných složek, což je dáno zřejmě vlivem analytů, které se na chromatogramu objevují dříve. První eluované analyty totiž mohou částečně ovlivnit sorpční kapacitu kolonového sorbentu, přičemž v průběhu analýzy není mezi jednotlivými eluovanými látkami dostatečný prostor (doba), po který by mohlo docházet k ekvilibraci poměrů na kolonovém sorbentu jako je tomu mezi jednotlivými analýzami. Nedostatečná reaktivace molekul sorbentu v běhu jednotlivé analýzy, kdy FLU-R vychází z kolony krátce po FLU-H a FLU v závěsu za ALB, tak může přispívat k zhoršení opakovatelnosti uvažovaných FLU a FLU-R.

Tabulka 11 dále dokumentuje nalezení nižších koncentrací analyzovaných FLU-H (průměr nalezených koncentrací činil 5,15 $\mu\text{mol/l}$), FLU-R (průměr 4,74 $\mu\text{mol/l}$) a FLU (průměr 4,37 $\mu\text{mol/l}$) ve vzorcích než původně (před extrakcí LLE) přítomná množství 5,25 $\mu\text{mol/l}$ FLU-H, 5,04 $\mu\text{mol/l}$ FLU-R a 4,98 $\mu\text{mol/l}$ FLU. Odchylky mohou být způsobeny navázáním analytů na biologický materiál (cytosol potkaních samců kmene Wistar), přičemž FLU-H, stejně jako FLU-R a FLU mohou být vázány na polárnější součásti matrice, proto přecházejí v menším množství do extrakčního činidla a jsou nalézány při stanovení v nižších koncentracích. Mechanismy vazebných interakcí benzimidazolů na složky matrice přitom nejsou zcela jasné a v případě potřeby by byla tato problematika ještě dále studována.

Výsledky dosažené během hodnocení opakovatelnosti metody se spektrofotometrickou detekcí lze doplnit posouzením správnosti stanovení, jež vyjadřuje shodu experimentálně zjištěných výsledků s nominální hodnotou přidaného standardu látky. Správnost se obvykle vyjadřuje jako výtěžnost R v procentech (viz. 4.1.4., experimentální část). Hodnoty správnosti pro uvažované analyty R_1 jsou součástí tabulky 11 uvedené ve výsledkové části. Byly vypočítány jako stonásobek podílu chromatografií nalezené průměrné koncentrace látky a koncentrace původně přítomné ve vzorku před provedením LLE.

Z hodnot správnosti uvedených v tabulce plyne, že nejlépe může být použitou chromatografickou analýzou se spektrofotometrickou detekcí stanovován metabolit FLU-H (R_1 rovno 98,1 %). Na nálezu menší správnosti u analytů FLU-R (R_1 rovno 94,0 %) a FLU (R_1 rovno 87,7 %) se zřejmě opět podílí fakt, že zmíněné látky se objevují na chromatogramech později než analyzovaný FLU-H, a že FLU-H ovlivňuje retenci zmíněných později eluovaných benzimidazolů (viz. také předchozí kapitola diskuse).

Kromě vlivů vlastní chromatografie připadá v úvahu dopad provedení LLE na analýzu a míra interakce jednotlivých látek s biologickou matrix, přičemž není jasné proč právě FLU, nejlipofilnější z analytů, podle diskutovaných výsledků (nejnižší hodnota R) během LLE pravděpodobně nejméně přechází do organického ethylacetátu. Mechanismy interakcí s biologickou matrix jednotlivých studovaných látek však zůstávají otevřenou otázkou, jak již bylo zmíněno.

6. Vývoj metodiky fluorescenční detekce analytů

Jak je uvedeno v kapitole 6 výsledkové části, byla měřena a zkoumána 2D emisní spektra uvažovaných analytů (FLU a jeho metabolitů, ALB a mebendazolu) a také 3D emisní spektra FLU a FLU-H při několika zvolených excitačních vlnových délkách a v rozmezí 250-500 nm emisních vlnových délek.

Zatímco analyty ALB a FLU-R vykázaly při nastavení $\lambda_{ex} = 300$ nm uspokojivou intenzitu fluorescence a byly nalezeny hodnoty jejich emisních maxim při uvedené excitační vlnové délce (viz. tabulka 12 ve výsledkové části), fluorescence FLU a FLU-H ani za podmínek 3D projekce spekter s výjimkou

velmi slabé fluorescence kolem hodnoty 334 emisní vlnové délky pozorována nebyla. Fluorescence FLU ani FLU-H proto nebyla dále zkoumána.

Zajímavé je, že fluorescenci za uvedených podmínek vykázal metabolit flubendazolu FLU-R, který se od parentní látky liší relativně málo (pouze hydrogenací karbonylu). Fluorescenci FLU přitom zřejmě zamezuje přítomnost karbonylové skupiny v molekule látky, která způsobuje snadný přechod z excitovaného singletního stavu do stavu tripletního mezisystémovým přechodem, který je v daném případě řádově rychlejší než fluorescence^[33]. Atom fluoru zřejmě nemá na fluorescenci vliv. To lze usuzovat právě díky fluorescenci FLU-R.

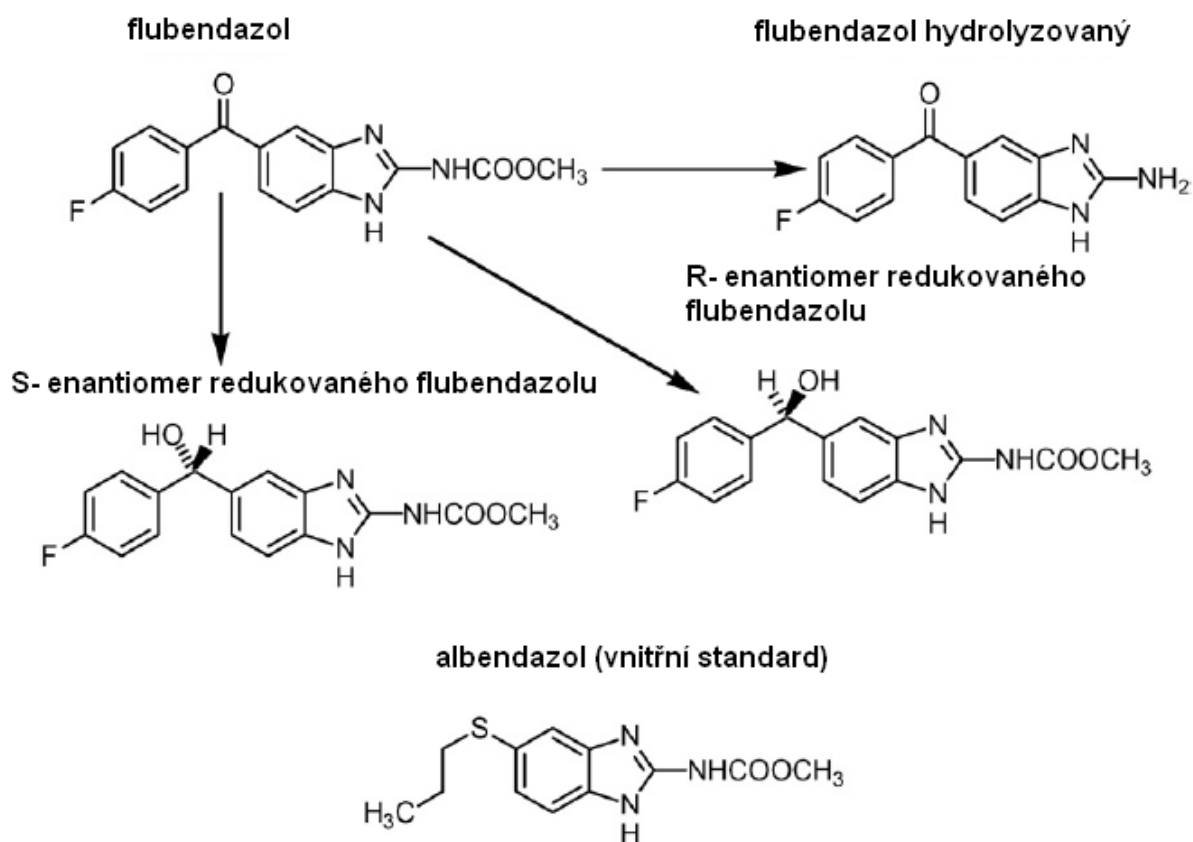
Protože spektrofluorimetricky detekované chromatografické analýzy probíhají při nastavení jediné excitační a emisní vlnové délky na fluorescenčním detektoru, bylo nutné nalézt kompromis pro používané vlnové délky a dvě chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí analyzované látky FLU-R a ALB [IS].

Především s ohledem na již dříve publikovaná data chromatografie vnitřního standardu ALB byla vybrána pro nastavení na fluorescenčním detektoru chromatografu excitační vlnová délka 290 nm a emisní vlnová délka 320 nm, kterou používali pro detekci ALB a jeho metabolitů např. Batsiaz a Delis^[34].

Při nastavení uvedených vlnových délek na fluorimetru vykazoval nejen ALB, ale i FLU-R uspokojivou intenzitu fluorescence dostatečnou pro chromatografická stanovení. Výsledky sledování intenzity fluorescence analytů ALB a FLU-R dokumentuje tabulka 13 uvedená ve výsledkové části.

Kapitola 6 výsledkové části zmiňuje rovněž testování mebendazolu coby vnitřního standardu pro chromatografické analýzy za daných chromatografických podmínek. Mebendazol jako vnitřní standard pro chromatografii se spektrofotometrickou detekcí používal např. Ramanathan et al. při stanovování benzimidazolů v plné krvi^[35]. Protože však mebendazol nefluoreskoval, byl dále jako vnitřní standard pro chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí používán ALB.

Obr. 34: Chemická struktura analyzovaných benzimidazolů, struktura vnitřního standardu albendazolu.



7. Stanovení kalibrační přímky pro spektrofluorimetrickou detekci

Kalibrační přímka pro chromatografické analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí byla stanovena na šesti koncentračních úrovních analyzované látky. Tato přímka je charakterizována regresní rovnicí $y = 0,9079x - 0,1085$ (kde hodnota y značí poměr koncentrací FLU-R a ALB, hodnota x odpovídá poměru ploch FLU-R a ALB [IS]) a koeficientem determinace $R^2 = 0,995$.

Hodnota koeficientu determinace podobně jako v případě FLU-H a FLU-R se drobně odchyľuje od hodnoty ideální. Důvodem odchylky v tomto případě je patrně skutečnost, že jsou stanovovány velice nízké koncentrace, což způsobuje větší míru šumu kalibračních dat. Zde je možné uvažovat o vyšším

vlivu nepřesností při přípravě kalibračních vzorků i o zvýšeném vlivu příměsí z biologického materiálu, které v určité míře vzorek obsahuje i po provedených předseparacích (LLE). Přesnost chromatografické analýzy (separace a kvantifikace hodnocených látek) je však ve velmi úzkém vztahu k předseparačnímu kroku LLE, a proto právě mírně variabilní průběh LLE je zřejmě nejvíce zodpovědný za uvedenou odchylku. V úvahu samozřejmě připadají další nepřesnosti: chyby vnesené experimentátorem při manipulaci se vzorky (i přes veškerou snahu provádět jednotlivé laboratorní úkony stále stejným způsobem), odchylky všech součástí chromatografu (byl používán relativně opotřebovaný přístroj s řadou sériových aj. analýz za sebou), které mohou negativně přispívat k odchýlení hodnot korelačního (determinačního) koeficientu kalibrační přímky od ideální hodnoty.

8. Hodnocení opakovatelnosti chromatografických analýz se spektrofluorimetrickou detekcí

Opakovatelnost byla hodnocena stanovením koncentrací analytu FLU-R v sérii 8mi vzorků připravených stejným způsobem a vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka těchto koncentrací (ozn. RSD_7). Hodnota relativní směrodatné odchylky nalezených koncentrací FLU-R je součástí tabulky 14 uvedené ve výsledkové části. RSD_7 FLU-R stanovovaného chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí činí 1,52 %.

Průměr všech nalezených koncentrací FLU-R 8mi opakování činí 70,859 nmol/l analytu ve vzorku. Nalezení nižších koncentrací analytu ve většině z testovaných vzorků je zřejmě způsobeno interferencí s biologickou matrix vzorku již dříve diskutovanou ve spojitosti s opakovatelností chromatografických analýz se spektrofotometrickou detekcí (viz. kapitola 5 diskuse).

Podobně jako v hodnocení opakovatelnosti metody se spektrofotometrickou detekcí byla posuzována správnost chromatografie se spektrofluorimetrickou detekcí. Byla vyjádřena jako výtěžnost R_2 v procentech (viz. 4.1.4., experimentální část). Hodnota správnosti pro uvažovaný FLU-R R_2 je součástí tabulky 14 uvedené ve výsledkové části. Byla vypočítána jako stonásobek podílu chromatografií nalezené průměrné koncentrace látky (70,859 nmol/l) a koncentrace původně přítomné ve vzorku (75,642 nmol/l) před

provedením LLE. Správnost za daných chromatografických podmínek odpovídá 93,9 %. Zde je pozoruhodná shoda hodnot recovery pro FLU-R při obou způsobech detekce.

9. Limity detekce a kvantifikace chromatografických metod

Limity, jejichž stanovení vycházelo z metodiky SÚKL^[31] a doporučení americké FDA^[32], byly ověřeny analýzou příslušných koncentrací analytů ve vzorku.

Konkrétní stanovené hodnoty LOD a LOQ pro biologické materiály, se kterými bylo nakládáno v rámci řešení rigorózní práce, a ve kterých probíhala chromatografická analýza se dvěma způsoby detekce, jsou uvedeny ve výsledkové části 9.1. a 9.2.

Zjištěné limity je možné porovnat s hodnotami, které byly stanoveny jinými autory. Pracovní skupina M. Issara^[41] stanovovala UMF-087, ale mj. i FLU v lidské plazmě chromatografií se spektrofotometrickou detekcí. Issar et. al stanovili limit kvantifikace FLU v plazmě na 20 ng/ml, jež je po přepočtu ($M_r \text{ FLU} = 313,3 \text{ g.mol}^{-1}$) roven 63,8 nmol/l. Uvedená hodnota je asi 7krát nižší než limit kvantifikace dosažený v práci.

Nobilis et al.^[30] stanovili limit kvantifikace chromatografie se spektrofotometrickou detekcí pro FLU na 0,50 nmol/ml a pro jeho metabolity FLU-H a FLU-R na 0,25 nmol/ml, což po přepočtu odpovídá limitním koncentracím 0,50 $\mu\text{mol/l}$, resp. 0,25 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorcích. Uvedené limity však byly stanoveny v modelových vzorcích, které neobsahovaly biologický materiál. Nelze je tedy dost dobře porovnávat s výsledky dosaženými v rigorózní práci či limity, jak je získali Issar et al.

Chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí metabolitu FLU-R bylo dosaženo limitu kvantifikace látky v ovčí plazmě 2,7 nmol/l, který je významně nižší než všechny dříve uvedené. Stanovený limit vypovídá o vysoké citlivosti v rámci rigorózní práce vyvinuté chromatografické metody, která je vhodná pro zjišťování velmi nízkých koncentrací FLU-R v biologických materiálech.

Zjištěné limitní koncentrace (viz. výsledková část, kap. 9) jsou srovnatelné s limity dosaženými při použití HPLC metod využívajících separaci na kolonách 250 x 4 mm (5 µm). Tyto limity byly pro dané účely dostačující.

10. Testování vlivu použitých organických rozpouštědel na průběh extrakce

V rámci rigorózní práce byla řešena mj. také problematika předseparační úpravy vzorků biologického materiálu uvažovaného pro následné HPLC analýzy.

Během přípravných experimentů tak byla testována tři extrakční media s obsahem organických rozpouštědel (acetonitrilu, terc-butylmethyletheru a ethylacetátu) pro extrakci kapalina-kapalina (LLE) FLU a jeho metabolitů.

Myšlenka používat pro extrakci analyzovaných látek z biologického materiálu právě LLE vycházela především ze zkušeností předchůdců, kteří se zabývali předseparací a chromatografickou analýzou FLU dříve. A ačkoli se pro úpravu vzorků nabízela rovněž izolační metoda extrakce na pevných fázích (solid phase extraction – SPE) se svými nespornými výhodami především ve snadné automatizaci izolace, pro nedostatek zkušeností s SPE benzimidazolů v dosud publikované analytické literatuře byla raději optimalizována technika LLE.

SPE ve vztahu k benzimidazolům publikoval např. Mottier^[36] a jeho kolegové. Skupina však využívala SPE na C₁₈ Supelclean kolonkách k finálnímu očištění vzorků od zbytků biologické matrix po předchozí LLE ethylacetátem a methanolem, ne tedy k vlastní extrakci lipofilních analytů. Vývoj izolační metody SPE FLU a jeho metabolitů by si vyžádal řadu rozsáhlých experimentů, které by zřejmě samy o sobě daly vzniknout samostatné diplomové či rigorózní práci, jako tomu bylo např. při optimalizaci SPE amlodipinu z biologických vzorků pro HPLC^[37] řešené svého času na půdě FaF UK HK.

Výběr testovaných organických rozpouštědel pro LLE FLU a jeho metabolitů společně s vnitřním standardem ALB se opíral zejména o v současnosti nejfrekventněji citované látky. Z nich byl nejčastěji k extrakcím

kapalina-kapalina benzimidazolů používán ethylacetát (např. již zmiňovaný Mottier et al.^[36], Batziasz a Delis^[34], Balisz^[40]). Nobilis et al.^[30] používal k LLE vedle ethylacetátu také diethylether, nejlepších výsledků však dosáhl po LLE benzimidazolů s terc-butylmethyletherem. Skupina kolem Ramanathana^[35] extrahovala FLU, UMF-078 a jeho metabolit UMF-060 diethyletherem, který však nebyl do předběžných testů v rámci rigorózní práce zahrnut. Dusi et al.^[38] stanovoval HPLC se spektrofotometrickou detekcí benzimidazoly v krmivech pro drůbež a prasata po extrakci krmiv dimethylformamidem. Ani dimethylformamid nebyl pro práci zkoušen.

Kromě zmíněných rozpouštědel: ethylacetátu (nejčastěji citován) a terc-butylmethyletheru (testován s ohledem na příznivé výsledky Nobilise^[30]) byl testován rovněž acetonitril a to především s ohledem na následné chromatografické analýzy s předpokládaným použitím látky v MF.

Pokud by totiž po proběhnutí LLE byly zbytkové koncentrace ACN případně přítomné v extraktech, nemusely by vzhledem ke složení MF způsobovat zvýšení šumu na chromatogramech. Proběhlé experimenty však použití ACN coby extrakčního činidla vyloučily.

Konečně někteří experimentátoři se obešli bez jakékoliv předseparace vzorků biologického materiálu. Příkladem je práce kolektivu El-Enanyho^[39], v níž byl stanovován FLU v lidské plazmě a moči bez předchozí izolace analytu ovšem polarograficky. Polarografická stanovení však na rozdíl od HPLC (především riziko zanášení chromatografických kolon nečistotami z biologické matrice) nejsou tolik náročná na čistotu analyzovaných vzorků. Toto je samozřejmě jejich nesporná výhoda oproti stanovením HPLC, zčásti však oslabená nižší dosahovanou citlivostí stanovení při použití polarografických metod.

Výsledky chromatografického stanovení se spektrofotometrickou detekcí FLU a chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí metabolitu FLU-R ve vzorcích určených k testování vlivu použitého extrakčního činidla a LLE techniky na chromatografickou analýzu dokumentují tabulky 18 a 19 uvedené ve výsledkové části. Kvantifikace vzorků byla prováděna vyhodnocením z kalibrační přímky, která byla získána jako závislost průměrné

plochy příslušného analytu na chromatogramech kalibračních vzorků na koncentraci. ALB byl přidáván k odparkům vzorků z důvodu ověření jeho retenčního času.

Vnitřní standard ALB byl opakovaně nacházen na chromatogramech v místě svého předpokládaného retenčního času, jehož hodnota kolísala v rozmezí 0,25 jednotek minuty kolem hodnoty 19,35 minut.

Z tabulky 18 uvedené ve výsledkové části je patrné, že všechny extrakční technologie poskytují poměrně nekonstantní výsledky analýz bez ohledu na použitou frakci homogenizátu *Haemonchus contortus* (mikrosomální frakce – vzorky 1-3; cytosolová frakce – vzorky 4-6), která zastupovala biologický materiál ve vzorcích. Z výsledků tabulky 18 však zároveň vyplývá, že tři extrakční činidla jsou v podstatě srovnatelná (nalezené hodnoty koncentrací FLU v neslepých vzorcích kolísají kolem hodnoty 3,5 $\mu\text{mol/l}$).

Jako optimální pro průběh extrakce LLE před následnou HPLC analýzou FLU a jeho metabolitů tak byla nakonec vybrána extrakce s použitím organického rozpouštědla ethylacetátu, s nímž má pracoviště největší zkušenosti. Technologie extrakce s octanem ethylnatým je detailně popsána v experimentální části (viz. kapitola 3.2.).

Ve vzorcích všech tří sad A-C označených čísly 7 a 8 nebyl analyzovaný FLU ani FLU-R (spektrofluorimetrická detekce) nalezen. Stanovení nulové koncentrace analytů v uvedených vzorcích je třeba vnímat pozitivně, neboť se jednalo o vzorky slepé, potvrzující důvěryhodnost analytické metody.

Tabulka 19 výsledkové části představuje nalezené koncentrace FLU-R v jednotlivých vzorcích tří sad (A-C) analyzovaných během testování tří způsobů extrakce. Kvantita FLU-R, jež tabulka 19 uvádí, se vzájemně velmi liší a do úvah o výhodnosti jednotlivých extrakčních činidel používaných v rámci LLE pro následné HPLC analýzy nebyla zahrnuta.

Odlišná množství metabolitu stanovená ve vzorcích chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí vypovídají pouze svojí podstatou o existenci redukce FLU v analyzovaných vzorcích. Přičemž ve vzorcích označených čísly 1-6 (vzorky s obsahem mikrosomů nebo cytosolu homogenizátu *Haemonchus contortus*, červa disponujícího enzymy metabolizujícími benzimidazolová anthelmintika) byla pravidelně, tj. ve všech sadách, nacházena vyšší množství

FLU-R než ve vzorcích označených číslem 9 (vzorky bez biologického materiálu s potenciálem enzymové aktivity).

Kvanta FLU-R nalezená ve všech vzorcích se nacházejí velmi vysoko nad limitem kvantifikace stanoveným pro hodnocený biologický materiál, jehož hodnota je rovna 0,59 nmol/l.

Vzorek C4 nebyl fluorescenčně hodnotitelný. Chyba nastala v rámci běhu noční sekvence analýz, kdy došlo k poruše na autosampleru. Vzorek C4 byl znehodnocen a dále nebyl použitelný. Jeho analýza tudíž opakována nebyla, výsledky získané s ostatními vzorky sady C při chromatografii se spektrofotometrickou detekcí, byly považovány za dostačující s ohledem na výše zmíněné pouhé stvrzení redukční aktivity biologického materiálu homogenizátu *Haemonchus contortus*.

11. Stanovení flubendazolu a jeho metabolitu FLU-R v biologických vzorcích *Haemonchus contortus*

K analýze byly dodány biologické vzorky v podobě odparků homogenizátů červa *Haemonchus contortus* po LLE. Ke vzorkům byl před LLE přidán vnitřní standard ALB v množství předepsaném pro HPLC analýzu se spektrofotometrickou detekcí. Výsledky stanovení sumují tabulky 20 (stanovení FLU v neznámých biologických vzorcích 1-47 chromatografií se spektrofotometrickou detekcí) a 21 (stanovení metabolitu FLU-R ve stejných vzorcích chromatografií se spektrofotometrickou detekcí) uvedené ve výsledkové části. Vzorové chromatogramy jsou uvedeny na obr. 22 a 23.

Z chromatogramů na obr. 22 a 23 je patrné, že nebyl detekován metabolit FLU-H a metabolit FLU-R byl přítomen ve velmi nízké koncentraci. Přesto byl učiněn pokus o výpočet koncentrací FLU-R pomocí ploch na chromatogramu získaném spektrofotometrickou detekcí. Získané koncentrace ovšem nevykazovaly očekávaný trend a držely se přibližně konstantní. To mohlo být způsobeno interferencí s neznámou příměsí z biologického materiálu, což potvrzovalo spektrum píku FLU-R a takto získané koncentrace byly vyhodnoceny jako nespolehlivé. Proto byly koncentrace FLU-R vyhodnoceny z chromatogramu detekovaného spektrofotometricky. Jak je vidět z obr. 22, nebylo možné použít k tomuto vyhodnocení plochu vnitřního standardu ALB.

Jeho pík je příliš velký a při použité citlivosti přesahuje možnosti detektoru. To je způsobeno výše zmíněnou skutečností, že ke vzorkům byl ALB přidán v množství předepsaném pro HPLC analýzu se spektrofotometrickou detekcí. Proto bylo použito postupu popsaného ve výsledkové části a koncentrace FLU-R vypočítány z kalibrační přímky získané jako závislost průměrné plochy píků příslušného analytu na chromatogramech kalibračních vzorků na koncentraci. Zde je třeba poznamenat, že byly analyzovány jedinečné vzorky, proto nebylo možno zopakovat jejich LLE s přidáním ALB v množství vhodném pro spektrofluorimetrickou detekci. Při hodnocení takto získaných výsledků je následně nutné mít na paměti, že díky použitému postupu vyhodnocení není eliminován vliv možných chyb během celého zpracování vzorků, zejména při LLE a při rekonstituci.

Jiným možným postupem, který ovšem zatím nebyl patrně nikdy oficiálně použit, je vyhodnocovat koncentraci analytu detekovaného spektrofluorimetricky s použitím plochy píku vnitřního standardu detekovaného spektrofotometricky. Zde je nutností paralelní snímání chromatogramů z obou detektorů pro konkrétní nástřik vzorku a stejným postupem změřená kalibrační přímka. Předběžné pokusy s takovýmto vyhodnocením byly následně prováděny^[43].

Výsledky stanovení FLU-R chromatografií se spektrofluorimetrickou detekcí v biologických vzorcích po inkubaci červa s FLU dokresluje vzorový chromatogram (obr. 23, výsledková část). Na chromatografickém záznamu je dobře rozlišitelný pík FLU-R s retenčním časem $t_R = 6,017$ min. Počátek chromatogramu zaujímají málo separované píky fluoreskujících sloučenin biologické matrix. Největší pík, který překračuje rozsah detekce, patří ALB.

Při porovnání různých chromatogramů uvedených ve výsledkové části, je možné pozorovat větší či menší posuny retenčních časů sledovaných analytů. Tyto posuny byly způsobeny s nejvyšší pravděpodobností zhoršením separačních vlastností kolonového sorbentu po množství proběhlých chromatografických analýz, i když byl tento pečlivě reaktivován po každé sérii analýz čítající proměření maximálně 60ti vzorků. Tato domněnka byla potvrzena a separační kolona musela být vyměněna. Použití předkolony bylo samozřejmostí během všech analýz. Navíc se později ukázalo, že k posunům

retenčních časů přispěla rovněž technická závada na směšovači mobilní fáze chromatografu.

12. Hodnocení vlivu sloučenin obsažených v biologických materiálech (moč, plazma, žluč) uvažovaných pro HPLC stanovení FLU a jeho metabolitů na průběh chromatografických analýz a diskuse chromatografického stanovení se spektrofluorimetrickou detekcí FLU-R v neznámých vzorcích plazmy

Součástí testování použité HPLC metody flubendazolu a jeho metabolitů v neznámých biologických vzorcích získávaných ze zvířat (samci a samice ovce domácí, *Ovis ammon* f. *aries*, plemeno merinolandshaf) bylo posuzování vlivu sloučenin obsažených v různých druzích biologického materiálu na hodnocení chromatogramů a to jak za podmínek spektrofotometrické detekce, tak analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí. V určitých případech byl sledován vliv reextrakce vodou během LLE na množství interferujících polárních látek, které se objevovaly v chromatogramech.

Obrázek 24 uvedený ve výsledkové části představuje chromatogram analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardního vzorku moči s původním obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ sledovaných analytů ve vzorku (FLU, FLU-H a FLU-R). Vnitřní standard ALB byl obsažen v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Chromatogram není téměř hodnotitelný. Chromatografický software detekoval určité změny nulové linie v místě očekávaných píků jednotlivých analytů s výjimkou ALB, který na chromatogramu nebyl nalezen vůbec. Počátek chromatogramu zaujímají málo separované součásti biologické matrix, které se předchozí LLE nepodařilo oddělit.

Fakt, že na chromatogramu nejsou píky analytů téměř patrné, může být způsoben interakcí analytů s polárními složkami obsaženými v moči (nízkomolekulární bílkoviny prošlé po ultrafiltraci plazmy do moči, odlupující se epitelové buňky močového měchýře a močové trubice zvířat, bakterie osidlující urinární trakt zvířat). Možnost vazby lipofilních benzimidazolů na polární substance popsali ve své práci např. Coulet et al. ^[42]. Skupina přitom řešila problém vazby benzimidazolu na biologickou matrix použitím bazické hydrolyzy

k uvolnění residuí thiabendazolu z tkáňových proteinů zvířat. Vedle toho je možné, že i přes provedenou LLE se do nástřiku dostaly interferující látky z biologického materiálu v koncentraci, která enormně zvyšuje pozadí na chromatogramu.

Obrázky 25, 26, 27 a 28 (vzorek podrobený reextrakci vodou) uvedené ve výsledkové části demonstrují masivní interferenci biologické matrix moči s HPLC stanovením FLU-R se spektrofluorimetrickou detekcí v uvažovaném biologickém materiálu. Zmíněné obrázky chromatogramů umožňují sledovat, že ani dalším ředěním vzorků, stejně jako reextrakcí materiálu vodou (teoretický předpoklad očištění analytu od polárních aj. součástí matrix), se nepodařilo eliminovat pík interferující složky, který se na chromatogramech objevoval při t_R FLU-R uvažovaného pro následující analýzy.

S ohledem na získané chromatogramy bylo HPLC stanovení FLU a jeho metabolitů v moči zvířat posouzeno za daných chromatografických podmínek, stejně jako za podmínek modifikovaného postupu LLE, jako nemožné. HPLC a LLE metoda by však mohla být pro uvažované analýzy v moči dále optimalizována.

Obrázek 29 výsledkové části představuje chromatogram analýzy se spektrofotometrickou detekcí standardního vzorku plazmy s obsahem 2,5 $\mu\text{mol/l}$ analytů ve vzorku, na němž jsou zřetelné píky všech čtyř sledovaných látek. Vnitřní standard ALB byl přítomen v koncentraci 10,0 $\mu\text{mol/l}$. Píky FLU-H a FLU-R, stejně jako píky ALB A FLU nalezené na chromatogramu nejsou však rozdělené až na základní linii, rozlišení píků nemůže být za daných podmínek separace diskutováno. Problematická je rovněž koeluze FLU-H s některou ze součástí plazmové matrix, o níž vypovídá chvost píku chromatografovaného FLU-H.

Spolu s nedostačujícími chromatografickými charakteristikami píků z uvedené analýzy a požadavkem na vysokou citlivost metody (očekávané koncentrace analytů v reálném biologickém materiálu se nacházely pod limitem kvantifikace stanoveným pro chromatografii se spektrofotometrickou detekcí analytů v plazmě, viz. kapitola 9.2.1, tabulka 16 výsledkové části) bylo od HPLC stanovení se spektrofotometrickou detekcí FLU a jeho metabolitů v plazmě za daných chromatografických podmínek upuštěno.

Výsledky hodnocení interference plazmy v HPLC stanoveních se spektrofotometrickou detekcí však byly v porovnání s předešlými relativně uspokojivé. Na chromatogramech z obrázků 30 a 31 uvedených ve výsledkové části je dobře patrný pík FLU-R, jehož plocha odpovídá 0,025 $\mu\text{mol/l}$ analytu ve vzorku. Pík vnitřního standardu ALB však spektrofotometricky detekován nebyl.

Vzhledem k tomu, že ALB běžně fluoreskoval za daných chromatografických podmínek se spektrofotometrickou detekcí v původně analyzovaných standardních vzorcích s obsahem cytosolové frakce homogenizátu jater potkaních samců, lze jeho nepřítomnost na chromatogramech přisoudit především biologické matrix plazmy.

ALB jako lipofilnější z analýze podrobované dvojice (FLU-R a ALB) zřejmě ve větší míře interaguje s některými lipofilními součástmi plazmy (v úvahu připadají lipoproteiny plazmy, volné mastné kyseliny přítomné v plazmě savců), přičemž interakce pravděpodobně negativně ovlivňuje schopnost ALB fluoreskovat.

ALB může samozřejmě interagovat také s polárními sloučeninami ve vzorcích, viz. již zmíněný Coulet et al. ^[42].

Vedle předchozích úvah se pro nenalezení ALB na chromatogramech analytickým software nabízí ještě jiné vysvětlení, totiž, že látka na chromatogramech je (obr. 30 a 31), ale v posunutém retenčním čase ($t_R = 19,51$ min na obr. 30 a 20,32 min na obr. 31).

Pokud byl FLU-R v následných HPLC stanoveních se spektrofotometrickou detekcí ve vzorcích plazmy kvantifikován, dělo se tak s ohledem na zmíněné obtíže stanovení ALB alternativní metodou z kalibrační přímky získané jako závislost průměrné plochy píků FLU-R na chromatogramech kalibračních vzorků na koncentraci.

Výsledky chromatografického stanovení FLU-R v neznámých vzorcích plazmy jsou zpracovány do tabulky 22 uvedené ve výsledkové části. Všechny nalezené koncentrace se nacházejí nad limitem kvantifikace 2,7 nmol/l stanoveným pro chromatografické analýzy se spektrofotometrickou detekcí biologických vzorků plazmy. Naopak žádná z nalezených koncentrací FLU-R

nedosahuje limitu detekce stanoveného pro chromatografii se spektrofotometrickou detekcí v plazmě, jehož hodnota činí 0,20 $\mu\text{mol/l}$.

Obrázky 32 a 33 uvedené ve výsledkové části demonstrují chromatogramy z analýz FLU a jeho metabolitů ve žluči - dva používané způsoby detekce.

Na obou chromatogramech je patrná interference matrix žluči se stanovovanými látkami, píky analytů nedosahují až na nulovou linii. Není možné hodnotit rozlišení píků.

S ohledem na výše zmíněné výsledky experimentů chromatografie ve vzorcích žluči, HPLC stanovení FLU a jeho metabolitů v biologickém materiálu žluči nebylo prováděno.

Během analýz ve žluči byl mj. pozorován posun retenčních časů jednotlivých analytů nacházených na chromatogramech z obrázků 32 a 33 (týká se však částečně rovněž předchozích diskutovaných chromatogramů) ve srovnání s časy nacházenými v počátečních chromatografických analýz a během kalibrace standardů pro dva způsoby detekce.

Posun retenčních časů v uvažovaném období byl způsoben poruchou směšovače MF chromatografu, která již byla zmiňována. V čase řešení zadání rigorózní práce však tento směšovač nebyl vyměněn ani opraven, v analýzách bylo pokračováno s vědomím o možném posunu retenčních časů látek.

Závěr

Cílem této rigorózní práce bylo stanovit flubendazol a jeho hlavní metabolity desethylkarboxyflubendazol a flubendazol redukovaný v biologickém materiálu parazita *Haemonchus contortus* a parazitem experimentálně infikovaných ovcí domácích.

Během práce byla na základě experimentů optimalizována extrakce kapalina-kapalina studovaných látek z biologického materiálu, otestováno několik organických rozpouštědel pro její provedení a optimalizována technika rekonstituce odparků vzorků získávaných po extrakci. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po extrakci ethylacetátem, odparky byly rekonstituovány s použitím ultrazvukového generátoru.

Dále byla optimalizována chromatografická metoda se spektrofotometrickou detekcí analytů a zcela nově byla vyvinuta a vyzkoušena spektrofluorimetrická detekce flubendazolu redukovaného při chromatografických analýzách.

Flubendazol a jeho metabolity byly stanovovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzních fázích (HPLC-RP) s použitím chromatografické kolony LiChroCART (250 mm x 3 mm, 5 μm) a mobilní fáze acetonitril:fosfátový pufr (pH 3,07;0,025 M) 3:7 (v/v). Optimální průtoková rychlost MF byla určena na 0,7 ml.min⁻¹. Analýza se spektrofotometrickou detekcí se dělá při 246 a 300 nm. Pro chromatografickou analýzu flubendazolu redukovaného se spektrofluorimetrickou detekcí byly nalezeny: excitační vlnová délka 290 nm a emisní vlnová délka 320 nm. Jako vnitřní standard byl zvolen albendazol a používán ke kvantifikaci látek ve vzorcích při obou způsobech detekce.

Za výše uvedených podmínek byl stanoven flubendazol a jeho metabolity v biologických vzorcích homogenizátů *Haemonchus contortus* a byl stanoven flubendazol redukovaný v plazmě ovcí domácích, což bylo předmětem zadání rigorózní práce.

Do budoucna by mohla být rozvíjena především automatizace metod, dále zlepšován způsob stanovení flubendazolu a jeho metabolitů z moči a žluči ovcí.

Věřím, že dosažené výsledky, zejména pak nalezení nového vysoce citlivého HPLC stanovení flubendazolu redukovaného, přispějí k dalšímu rozvoji poznání mechanismů rezistence parazitů k používaným anthelmintikům.

Použitá literatura:

[1] R. Karlíček a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha (1998).

[2] O. Mikeš: Základní typy chromatografie. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha (1980).

[3] O. Mikeš, J. Štamberg, M. Hejtmánek, K. Šebesta: Ionově výměnná chromatografie. In: O. Mikeš a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha (1980).

[4] V. Tomášek: Gelová chromatografie. In: O. Mikeš a kol. : Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha (1980).

[5] J. Turková: Afinitní chromatografie. In: O. Mikeš a kol. : Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha (1980).

[6] J. Klimeš a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha (2002).

[7] B. Meloun: Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonové chromatografii. In: O. Mikeš a kol. : Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha (1980).

[8] J. Klíma, J. Grafnetterová: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha (1987).

[9] J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha (1984).

[10] Český lékopis 2002, Grada, Praha (2002).

[11] Český lékopis 2005, Grada, Praha (2005).

- [12] J.Churáček, P. Jandera: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha (1993).
- [13] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler: Fundamentals of analytical chemistry – Seventh Edition, Orlando, Florida, USA (1997).
- [14] P. Jandera: Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie. In.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha (1993).
- [15] J. Klimeš a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha (2004).
- [16] Věstník SÚKL 1/94, Validace analytických metod v kontrole léčiv.
- [17] V. Center: Validace analytických metod, EffiChem ([http:// www.effichem.cz](http://www.effichem.cz))
- [18] R.D. McDowall, Review: Sample preparation for biomedical analysis, J. Chromatogr., 492, 3 (1989).
- [19] C.F. Poole, S.A. Schuette: Contemporary practice of chromatography, Part A, Elsevier, Amsterdam, 429 (1984).
- [20] G. Schill: In: Separation methods for drugs and related organic compounds, Sweedish Academy of Pharmaceutical Science, Stockholm, 1 (1978).
- [21] J. Sochor: ústní sdělení, seminář „Monitorování lékových hladin“ (2004).
- [22] T. Kassai, I. B. Wood, N. K. Amaral, K. Bairden, J. L. Duncan, J. B. Malone, J. A. Pankavich, R. K. Reinecke, O. Slocombe, S. M. Taylor, et al.: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine), Veterinary Parasitology, Vol. 58, Issue 3, 181-213 (1995).

- [23] N.C. Sangster: Anthelmintic resistance: past, present and future, *Int J Parasitol.* 29(1), 115-124 (1999).
- [24] L. Skálová: Návrh grantové agentury České republiky, část C - zdůvodnění návrhu (2005).
- [25] J. Lamka, L. Ducháček: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha (1998).
- [26] Albencare, Vm 13158/4003 – PRT 1B, Summary of Product Characteristics, (1998).
- [27] Albex, Vm 11990/4016, Summary of Product Characteristics (2002).
- [28] L. Moreno, L. Alvarez, L. Mottier, G. Virkel, S. Sanchez Burni, C. Lanusse: Integrated pharmacological assessment of flubendazole focus in sheep: disposition kinetics, liver metabolism and parasite diffusion ability, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27, 299-308 (2004).
- [29] M. Kuběnová: Rigorózní práce, Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové (2007).
- [30] M. Nobilis, T. Jira, M. Lísa, M. Holčapek, B. Szotáková, J. Lamka, L. Skálová: Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 1149, 112-120 (2007).
- [31] J. Šabartová: Validace analytických metod v kontrole léčiv. Kontrolní metody, *Věstník SÚKL* 1 (1994).

[32] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001; <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

[33] Guilbault: Practical Fluorescence, Marcel Dekker, ISBN 0824783560 (1990).

[34] G.C. Batzias, G.A. Delis: Reversed –phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminosulphone in sheep plasma, J. Chromatogr. B 805, 267-274 (2004).

[35] S. Ramanathan, N.K. Nair, S.M. Mansor, V. Navaratnam: Determination of the antifilarial drug UMF-078 and its metabolites UMF-060 and flubendazole in whole blood using high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B 655, 269-273 (1994).

[36] L. Mottier, L. Alvarez, C. Lanusse: Quantitative chromatographic determination of several benzimidazole anthelmintic molecules in parasite material, J. Chromatogr. B 798, 117-125 (2003).

[37] M. Soukupová: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové (2006).

[38] G. Dusi, V. Gamba, E. Faggionato: Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection, J. Pharm. Biomed. An. 38, 375-379 (2005).

[39] N. El-Enany, F. Belal, M. Rizk: Polarographic determination of flubendazole in spiked human urine and plazma, Il Farmaco 58, 613-617 (2003).

- [40] G. Balizs: Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 727, 167-177 (1999).
- [41] M. Issar, N.V. Nagaraja, J. Lal, J.K. Paliwal, R.C. Gupta: Determination of antifilarial compound UMF-078 and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 724(1), 147-155 (1999).
- [42] M. Coulet, C. Eeckhoutte, G. Larrieu, J.F. Sutra, L.A. Hoogenboom, M.B. Huveneers-Oorsprong, H.A. Kuiper, J.V. Castell, M. Alvinerie, P. Galtier: Comparative Metabolism of Thiabendazole in Cultured Hepatocytes from Rats, Rabbits, Calves, Pigs, and Sheep, Including the Formation of Protein-Bound Residues, *J Agric Food Chem.* 46(2), 742-748 (1998).
- [43] V. Kubíček: Osobní sdělení (2007).