

UNIVERZITA KARLOVA

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Lenka Čechová

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Sledování distribuce látky BZ po intramuskulárním podání

Diplomová práce

Lenka Čechová

PharmDr. Nela Váňová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Lenka Čechová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Nele Váňové, Ph.D. za pomoc, rady a trpělivost v průběhu vedení mé diplomové práce. Nemale poděkování patří Ing. Davidu Hermanovi a kolegům z Katedry toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Brně, za pomoc při získávání a zpracování údajů pro experimentální část diplomové práce.

Podporováno dlouhodobým záměrem rozvoje organizace Zbraně hromadného ničení DZRO ZHN 1011 a MŠMT ČR, Specifický výzkum č. SV/FVZ201505.

Obsah

| | |
|--|----|
| ÚVOD..... | 14 |
| 1 Teoretická část..... | 15 |
| 1.1 Bojové otravné látky | 15 |
| 1.2 Psychicky a fyzicky zneschopňující otravné látky | 17 |
| 1.2.1 Anticholinergika..... | 18 |
| 1.2.1.1 BZ látka | 18 |
| 1.3 Farmakologické parametry | 21 |
| 1.4 Biologický materiál..... | 23 |
| 1.5 Úprava vzorku..... | 24 |
| 1.5.1 Přímý nástřik..... | 24 |
| 1.5.2 Přímá extrakce..... | 25 |
| 1.5.3 Srážení proteinů | 26 |
| 1.5.4 Extrakce z kapaliny do kapaliny | 27 |
| 1.5.5 Extrakce na tuhou fázi | 29 |
| 1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie | 33 |
| 1.6.1 Mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo..... | 34 |
| 1.6.2 Dávkovač vzorku | 35 |
| 1.6.3 Chromatografická kolona a stacionární fáze | 35 |
| 1.6.4 Detektor | 36 |
| 1.6.5 Softwarové vybavení s počítačem..... | 39 |
| 2 Cíle práce | 40 |
| 3 Experimentální část..... | 41 |
| 3.1 Chemikálie..... | 41 |
| 3.2 Přístrojové vybavení a software..... | 41 |
| 3.3 Spotřební materiál..... | 42 |
| 3.4 Metodická část | 43 |
| 3.4.1 LC/MS-MS | 43 |
| 3.4.2 Příprava roztoků..... | 43 |
| 3.4.3 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce z plazmy | 44 |
| 3.4.4 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce ze žluči | 44 |
| 3.4.5 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce mozku, jater a ledvin..... | 45 |
| 3.4.6 Projekt pokusu..... | 45 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.4.7 | Zpracování vzorků plazmy | 46 |
| 3.4.8 | Zpracování vzorků žluči | 46 |
| 3.4.9 | Zpracování vzorků mozku, jater a ledvin | 46 |
| 3.4.10 | Příprava vzorků pro kvantitativní stanovení látky BZ v biologickém materiálu..... | 46 |
| 3.4.11 | Příprava standardů látky BZ pro validaci | 47 |
| 4 | Výsledky | 51 |
| 4.1 | Optimalizace extrakce tělních tekutin a tkání..... | 51 |
| 4.2 | Validace LC-MS/MS metody pro stanovení látky BZ..... | 55 |
| 4.2.1 | Kalibrační přímky a linearita | 55 |
| 4.2.2 | Mez detekce a mez kvantifikace | 56 |
| 4.2.3 | Preciznost a přesnost | 57 |
| 4.2.4 | Matricový efekt | 59 |
| 4.2.5 | Diluční integrita | 60 |
| 4.2.6 | Carry-over efekt | 61 |
| 4.3 | Farmakokinetika látky BZ v tělních tekutinách a tkáních..... | 62 |
| 4.3.1 | Farmakokinetické parametry látky BZ v plazmě a mozku..... | 62 |
| 4.3.2 | Plazma | 63 |
| 4.3.3 | Žluč..... | 64 |
| 4.3.4 | Mozek | 65 |
| 4.3.5 | Játra | 66 |
| 4.3.6 | Ledviny | 67 |
| 5 | Diskuze..... | 68 |
| 5.1 | Optimalizace extrakce tělních tekutin a tkání..... | 68 |
| 5.2 | Validace LC-MS/MS metody pro stanovení látky BZ..... | 70 |
| 5.3 | Farmakokinetika látky BZ v tělních tekutinách a tkáních..... | 70 |
| 6 | Závěr | 72 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 73 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 74 |
| | SEZNAM VZORCŮ | 74 |
| | SEZNAM GRAFŮ..... | 75 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 76 |

Abstrakt

Bojová otravná látka 3-chinuklidinyl benzilát (látka BZ) patří do skupiny psychicky zneschopňujících látek s anticholinergní aktivitou. V dnešní době se však pro svou schopnost navozovat poruchy kognitivních funkcí (koordinace a paměť) využívá zejména pro vědecké účely při studiu Alzheimerovy choroby. I přes tuto skutečnost však není její farmakokinetika doposud podrobně prozkoumána.

Pro stanovení látky BZ v biologickém materiálu byla vyvinuta, optimalizována a validována LC-MS/MS metodika zpracování tělních tekutin (plazma, žluč) a tkání (mozek, játra, ledviny). Výslednou metodikou pro zpracování tělních tekutin byla extrakce na pevné fázi s využitím kolony C18 s elucí do metanolu a pro tělní tkáně to byla precipitace s acetonitrilem. Vlastní chromatografická separace byla prováděna na reverzní fázi, konkrétně na koloně Gemini NX-C18 o rozměrech 150 × 4,6 mm a velikosti částic 5 μm. Mobilní fáze se skládala z 10mM roztoku octanu amonného o pH 11 a metanolu v poměru 30 : 70. Eluce analytů byla prováděna v režimu isokratické eluce. Celková doba analýzy byla 5 minut. Hmotnostně-spektrometrická detekce byla prováděna lineární iontovou pastí za použití ionizace elektrosprejem.

Metodiky zpracování a chromatografické analýzy byly úspěšně aplikovány na reálné vzorky z *in vivo* experimentu. Potkaním samcům byla intramuskulárně aplikována látka BZ ve dvou dávkách (2 a 10 mg kg⁻¹). Maximální koncentrace látky BZ v plazmě byla naměřena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 0,1856 ± 0,018 μg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 1,973 ± 0,171 μg ml⁻¹). Nejvyšší hodnota koncentrace látky BZ ve vzorcích žluče byla naměřena ve vzorcích odebraných ve 30. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 0,094 ± 0,007 μg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 0,709 ± 0,083 μg ml⁻¹). Maximální koncentrace látky BZ v mozkové tkáni byla naměřena ve vzorcích odebraných v 5. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 0,277 ± 0,015 μg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 2,560 ± 0,221 μg g⁻¹). V jaterní tkáni byla maximální koncentrace látky BZ stanovena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 5,294 ± 0,274 μg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 49,011 ± 2,537 μg g⁻¹). Nejvyšší hodnoty koncentrace látky BZ v ledvinách byly stanoveny ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 3,119 ± 0,345 μg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 11,782 ± 2,147 μg g⁻¹). Pro plazmu a mozek byly vypočteny farmakokinetické parametry.

Získané výsledky poslouží ke stanovení optimálního dávkovacího režimu látky BZ v *in vivo* modelech poruch kognitivních funkcí využívaných na Katedře toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany.

Klíčová slova: látka BZ, 3-chinuklidinyl benzilát, psychicky zneschopňující otravné látky, Alzheimerova choroba, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, extrakční techniky, farmakokinetika

Abstract

The compound 3-quinuclidinyl benzylate (agent BZ) belongs to the group of incapacitating warfare agents with anticholinergic activity. Today, for its ability to induce functional cognitive impairment (i.e. coordination and memory disorders), the agent BZ is used mainly for scientific purposes in the study of Alzheimer's disease. Despite this fact, its pharmacokinetics has not been fully examined yet.

In order to determine the agent BZ in biological material, LC-MS / MS method and sample preparation procedure for body fluids (plasma, bile) and tissues (brain, liver, kidneys) were developed, optimized and validated. The sample preparation procedure for body fluid employed solid phase extraction using a C18 column eluted with methanol and for body tissues it was precipitation with acetonitrile. The chromatographic separation was performed on Gemini NX-C18 reverse phase column (150 × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of a 10mM solution of ammonium acetate at pH 11 and methanol in a ratio of 30 : 70. Elution of the analytes was performed under isocratic elution. The total analysis time was 5 minutes. Mass spectrometric detection was performed by a linear ion trap using electrospray ionization.

Sample preparation procedure and chromatographic analysis methods were successfully applied to real samples from the *in vivo* experiment. Male rats were administered with the agent BZ intramuscularly in two doses (2 a 10 mg kg⁻¹). The maximum concentration of the agent BZ was measured in plasma samples taken at 3 minutes (dose 2 mg kg⁻¹ c = 0,1856 ± 0,018 μg ml⁻¹, dose 10 mg kg⁻¹ c = 1,973 ± 0,171 μg ml⁻¹). The highest value of the concentration of the agent BZ in bile samples was measured in samples taken at 30 minutes (dose 2 mg kg⁻¹ c = 0,094 ± 0,007 μg ml⁻¹, dose 10 mg kg⁻¹ c = 0,709 ± 0,083 μg ml⁻¹). The maximum concentration of the agent BZ in brain tissue was measured in samples taken at 5 minutes (dose 2 mg kg⁻¹ c = 0,277 ± 0,015 μg g⁻¹, dose 10 mg kg⁻¹ c = 2,560 ± 0,221 μg g⁻¹). In liver tissue, the maximum concentration of the agent BZ was determined in samples taken at 3 minutes (dose 2 mg kg⁻¹ c = 5,294 ± 0,274 μg g⁻¹, dose 10 mg kg⁻¹ c = 49,011 ± 2,537 μg g⁻¹). The highest values of the concentration of the agent BZ in the kidneys were determined in samples taken at 3 minutes (dose

2 mg kg⁻¹ c = 3,119 ± 0,345 µg g⁻¹, dose 10 mg kg⁻¹ c = 11,782 ± 2,147 µg g⁻¹).
Pharmacokinetic parameters were calculated for plasma and brain.

The results obtained in this study will be used to determine the optimal dosing regimen of the agent BZ in *in vivo* models of cognitive impairment used at the Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health, University of Defence.

Key words: agent BZ, 3-quinuclidinyl benzylate, mentally incapacitating substances, Alzheimer's disease, high performance liquid chromatography, extraction techniques, pharmacokinetics

Seznam použitých zkratek

| | |
|------------------|---|
| 7-MEOTA | 7-metoxytakrin |
| ACN | Acetonitril |
| ACh | Acetylcholin |
| APCI | Chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| API | Ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | Fotoionizace za atmosférického tlaku |
| AUC | Plocha pod křivkou |
| BOL | Bojové otravné látky |
| BZ | 3-chinuklidinyl benzilát |
| C _{aq} | Koncentrace analytu ve vodné fázi |
| Cl | Clearance |
| C _{max} | Maximální koncentrace látky |
| CNS | Centrální nervový systém |
| C _M | Koncentrace látky v mobilní fázi |
| C _o | Koncentrace analytu v organické fázi |
| C _s | Koncentrace látky v stacionární fázi |
| CV | Variační koeficient |
| DCM | Dichlormetan |
| DEE | Dietyleter |
| EI | Elektronová ionizace |
| ECD | Amperometrický detektor |
| EMA | Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>) |
| ESI | Ionizace elektrosprejem |
| EtAc | Etylacetát |
| FLD | Fluorimetrický detektor |

| | |
|----------------|---|
| HCl | Chlorovodíková kyselina |
| HEB | Hematoencefalická bariéra |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| i. m. | Intramuskulární |
| i. v. | Intravenózní |
| IS | Vnitřní standard (<i>internal standard</i>) |
| K _D | Rozdělovací koeficient, distribuční konstanta |
| LC-MS | Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí |
| LLE | Extrakce z kapaliny do kapaliny (<i>liquid-liquid extraction</i>) |
| LLOQ | Nejnižší kvantifikovaná hodnota |
| LOD | Nejnižší detekovatelná hodnota |
| M | Molekula |
| MALDI | Ionizace desorpce laserem za účasti matrice |
| MeOH | Metanol |
| MF | Mobilní fáze |
| MIP's | Molekulárně vtištěné polymery |
| MRT | Průměrný retenční čas |
| MS | Hmotnostní spektrometr |
| PP | Proteinová precipitace (<i>protein precipitation</i>) |
| R ² | Koeficient determinace |
| RID | Refraktometrický detektor |
| SAX | Silná anion výměna (<i>strong anion-exchange</i>) |
| SCX | Silná kation výměna (<i>strong cation-exchange</i>) |
| SD | Směrodatná odchylka |
| SEM | Střední chyba průměru |
| SF | Stacionární fáze |

| | |
|-------------|---|
| SPE | Extrakce na tuhou fázi (<i>solid phase extraction</i>) |
| SRM | Monitorování vybraných reakcí (<i>selected reaction monitoring</i>) |
| $t_{1/2}$ | Biologický poločas eliminace |
| TCA | Trichloroctová kyselina |
| TFA | Trifluoroctová kyselina |
| t_{max} | Retenční čas |
| TOF | Analýza doby letu (<i>time of flight</i>) |
| UV | Ultrafialové záření |
| V_d | Distribuční objem |
| VIS | Viditelné záření |
| WAX | Slabá anion výměna (<i>weak anion-exchange</i>) |
| WCX | Slabá kation výměna (<i>weak cation-exchange</i>) |
| λ_z | Konstanta eliminace |

Úvod

Nedílnou součástí vývoje nových léčiv pro terapii poruch kognitivních funkcí je jejich testování na *in vivo* experimentálních modelech. Jednou z látek používaných k farmakologickému navození symptomů těchto onemocnění je 3-chinuklidinylbenzilát, označován také jako látka BZ, který původně patří mezi psychicky zneschopňující bojové otravné látky. Za účelem nastavení správného dávkovacího režimu látky BZ pro *in vivo* experimenty je třeba znát její farmakokinetické vlastnosti a distribuci do tkání, zejména do mozku. Významné postavení ve stanovení léčiv v biologickém materiálu zaujímají zejména chromatografické metody.

Tématem diplomové práce je sledování distribuce látky BZ v organismu po intramuskulárním podání. V teoretické části se práce zabývá látkou BZ z farmakologického i toxikologického hlediska, postavením chromatografických metod při sledování farmakokinetiky léčiv a zvláštní důraz je zde věnován metodám zpracování biologického materiálu a extrakčním technikám. Právě zpracování biologických matric je jednou z časově nejnáročnějších a na chybu zatíženou fází práce s analytem během jeho analýzy, a proto je nutné mu věnovat náležitou pozornost. Experimentální část se poté věnuje vývoji a optimalizaci metod pro zpracování vzorků tělních tekutin (plazma, žluč) a tkání (mozek, játra, ledviny) a extrakci látky BZ před vlastní analýzou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

1 Teoretická část

1.1 Bojové otravné látky

Bojové otravné látky (BOL) jsou syntetické sloučeniny, které usmrcují, dočasně zneschopňují nebo poškozující živé organismy. Mechanismus účinku BOL je založen na interakci s aktivní makromolekulou (bílkovina, nukleová kyselina), čímž dochází k narušení fyziologické funkce této makromolekuly a k poškození organismu (Bajgar, 2011). Pro dosažení maximálního efektu by měly být BOL nejlépe bezbarvé, bez zápachu, dobře použitelné v polních podmínkách a s rychlým patofyziologickým efektem (Kassa, 2003).

Otravné látky se rozdělují podle povahy poškození lidského organismu a z pohledu jejich bojového určení (Valášek, 2007). Síla jejich účinku je charakterizována fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi (Kassa, 2003). Setkáváme se takto s látkami smrtícími, zneschopňujícími nebo s BOL určenými k zasažení rostlinstva (Valášek, 2007). Rozdělení BOL podle povahy poškození exponovaného lidského organismu je uvedeno v tabulce 1. (Kassa, 2003; Valášek, 2007).

Tabulka 1. Skupiny BOL dle jejich mechanismu účinku

| <i>Název skupiny</i> | <i>Anglický název</i> | <i>Mechanismus účinku</i> | <i>Zástupce</i> |
|----------------------------|-----------------------|---|---|
| Nervově paralytické látky | nerve agents | irreverzibilně inhibují cholinesterázy, narušují přenos nervového vzruchu | tabun, sarin, soman, cyklosin, VX látka |
| Zpuchýřující otravné látky | blister agents | v místě kontaktu způsobují cytotoxický efekt s nekrózou | lewisit, yperity, fosgenoxim |
| Všeobecně jedovaté látky | cyanogen agents | narušují oxidativní procesy v buňce a její dýchání | kyanovodík, kyanidy, chlornan |

| | | | |
|--|-----------------------|--|---|
| Dusivé látky | lung damaging agents | poškozují membrány plicních alveolů a vyvolávají edém plic | fosgen, difosgen, chlorpikrin |
| Psychicky a fyzicky zneschopňující látky | incapacitating agents | narušují nervosvalovou koordinaci, vyvolávají poruchy vyšších nervových funkcí | látka BZ, LSD, fencyklidin, tremorogeny |
| Dráždivé látky | riot control agents | intenzivně dráždí senzitivní nervové zakončení spojené s výraznou bolestí | CS látka, CR látka, adamsit |

Účinnost otravné látky je specifikována její toxicitou. Ta se liší v závislosti na cestě průniku do organismu, rychlosti působení, ale také na celkovém stavu exponovaného organismu (Bajgar, 2011; Kassa, 2003; Patočka, 2004).

1.2 Psychicky a fyzicky zneschopňující otravné látky

Psychicky zneschopňující otravné látky jsou po chemické stránce různorodou skupinou sloučenin. Lze je definovat jako BOL vyvolávající i ve velmi malých koncentracích u zdravého člověka závažné změny psychiky, avšak bez výrazného ovlivnění tělesných funkcí (Bajgar, 2011). Tyto změny se kvantitativně a kvalitativně projevují poruchou vnímání a paměti, emoční labilitou, či poruchou intelektových funkcí (Bajgar, 2006). Pro tyto látky se také vžila synonyma: psychotomimetika, psychodysleptika, halucinogeny, psycholytika, fantastika, psychedelika (Bajgar, 2011; Bajgar, 2006). Jejich toxicita je nízká, působí několikahodinové až několikadenní zneschopnění a smrtícího účinku dosahují až při vysokých koncentracích (Bajgar, 2011). Některé z nich se rovněž zneužívají jako návykové látky (LSD, amfetamin atd.). Psychicky zneschopňující BOL nejsou běžně dostupné ve formě chemické munice, avšak mohly by být zneužity pro některé speciální účely, včetně teroristického útoku. V současné době je potřeba tedy vybavit vojska účinným antidotním prostředkem proti těmto látkám, převážně proti látce BZ (Bajgar, 2006).

Psychotomimetika se rozdělují podle chemické struktury do 7 skupin (Bajgar, 2011):

- Kyselina D-lysergová a její deriváty – LSD
- Fenyletylaminy – meskalin, amfetamin, efedrin
- Indolalkylaminy – dimethyltryptamin, dietyltrypťamin, dimetylserotonin, bufotenin, psylocin a psylocybin
- Ostatní indolové deriváty – harmin, harmalin, ibogain
- Anticholinergika – atropin, skopolamin, benaktyzin, látka BZ
- Arylcyklohexylaminy – fencyklidin, adamantylfencyklidin
- Různorodá skupina – kannabis, kokain, arekolin.

Otravné látky fyzicky zneschopňující mají účinky na centrální nervový systém (CNS), kdy vyvolávají zvýšenou únavu, nervozitu, podrážděnost, posturální hypotenzi, poruchy vidění, parkinsonský třes, ovlivňují tělesnou termoregulaci a také způsobují poruchy pohybové koordinace. Mezi tyto látky se řadí akridiny, které u zvířat mohou způsobit ustrašenost či agresivitu, tremorogenní látky, zastoupené především látkou

tremorin, a lathyrogenní látky získávané ze semen *Lathyrus sativus*. Pro svoji velice nízkou toxicitu nejsou využitelné pro vojenské účely (Patočka, 2004).

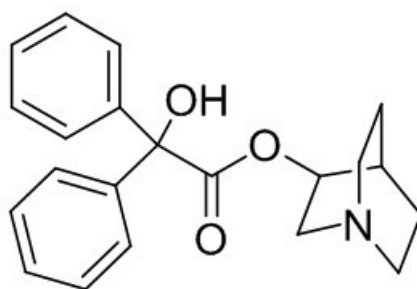
1.2.1 Anticholinergika

Anticholinergika jsou látky, které se vyznačují antagonistickým působením vůči acetylcholinu (ACh) v centrální a periferní nervové soustavě. Blokáda cholinergní neurotransmise zprostředkovaná muskarinovými a nikotinovými receptory ovlivňuje vegetativní funkce. Ze somatických příznaků se dostavuje snížená salivace, zrychlený tep a mydriáza. Anticholinergika působí i na psychomotorické funkce jedince a způsobují například změnu ve vnímání času a prostoru, poruchu kognitivních funkcí a halucinace (Martínková, 2007). Pro jejich schopnost navozovat kvalitativní poruchy vědomí se pro tyto látky také používá termín delirogeny. Vojensky významné delirogeny jsou kompetitivní a reverzibilní antagonisté muskarinových receptorů (Kassa, 2003).

Do skupiny klinicky aplikovaných anticholinergik patří atropin a skopolamin, dříve získávané z výtažků rostliny *Atropa belladonna*, které byly využívány k náboženským obřadům již ve Starověku (Fusek et al., 2015; Misik, 2013). K delirogenům řadíme i synteticky připravené deriváty kyseliny benzilové a glykolové, a to Ditrán, JB 336 a BZ látku (Patočka, 2004).

1.2.1.1 BZ látka

BZ látka je chemicky 3-chinuklidinyl benzilát (obrázek 1.), tvořící bílé krystaly slabě nahořklé chuti. Její hydrochloridová sůl je dobře rozpustná ve vodě a po převedení na aerosol je dlouhodobě stálá v terénu (Bajgar, 2011; Patočka, 2004; Novotny et al., 2011). Díky vysokému bodu varu 322 °C je výparnost této látky nepatrná (Patočka, 2004). Podobně jako přírodní alkaloidy atropin a skopolamin látka BZ kompetuje s acetylcholinem na muskarinovém receptoru v periferním i centrálním nervovém řečišti (Misik et al., 2014; Misik et al., 2016). Z vojenského hlediska se jednalo v minulosti o možnou substanci využitelnou pro zneschopnění bojeschopnosti nepřítele a ochromení činnosti velitelských struktur (Misik, 2013).



Obrázek 1. Chemická struktura látky BZ

V padesátých letech minulého století se látka BZ testovala jako potenciální neletální psychicky zneschopňující látka v americké armádě (Středa & Patočka, 2004). Na základě Konference o odzbrojení byly zásoby v USA do roku 1990 postupně zničeny (Bajgar, 2006). Původně byla látka zkoumána v medicíně pro terapii gastrointestinálních potíží jako spasmolytikum (Fusek et al., 2015; Misik, 2013). Již při velmi nízkých koncentracích se však objevují vedlejší účinky, a to převážně poruchy vidění, salivace, halucinace a dezorientace (Misik et al., 2014). V dnešní době se substance experimentálně používá pro identifikaci muskarinových receptorů v mnoha laboratorních technikách (Bajgar, 2011). Také slouží jako modelová látka pro navození poruch kognitivních funkcí, včetně klinických příznaků Alzheimerovy nemoci (Misik, 2013; Misik et al., 2016).

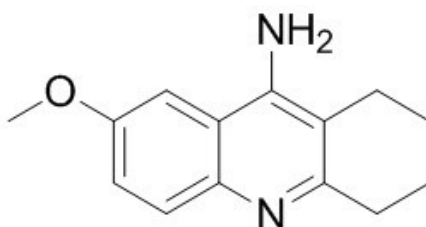
BZ substanci je možné podat orálně, inhalačně v podobě aerosolu, intravenózně a intramuskulárně. Předpokládá se dobrá distribuce do okolních tkání a snadný průchod přes biologické bariéry včetně hematoencefalické (HEB; Misik, 2013).

Symptomy po požití látky BZ se rozdělují do tří fází podle průběhu intoxikace, viz tabulka 2. (STANAG 2463AmedP-6).

Tabulka 2. Fáze průběhu intoxikace po požití látky BZ

| <i>Fáze</i> | <i>Čas</i> | <i>Symptomy</i> |
|-------------|---------------|---|
| Iniciální | 1 – 4 hodiny | tachykardie; snížení salivace; nevolnost; ataxie; rozmazané vidění; závratě; sedace až stupor |
| Delirantní | 4 – 12 hodin | porucha rovnováhy; dezorientace; neschopnost se pohnout; zhoršení motorické, paměťové a myšlenkové schopnosti |
| Letargická | 12 – 96 hodin | zvyšování aktivity; nepředvídatelné chování s deziluzí; halucinace; postupné vymizení všech příznaků |

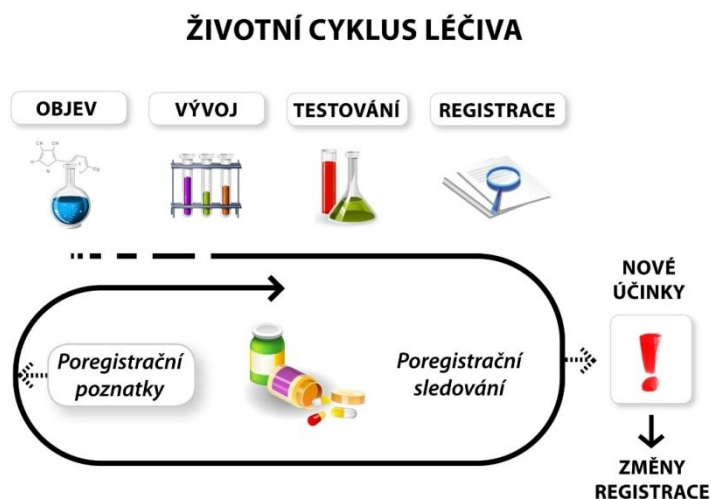
První pomocí při otravě látkou BZ je nasazení ochranné masky, opuštění kontaminovaného prostoru a poskytnutí lékařské pomoci. Farmakologická terapie intoxikace látkou BZ je založena na zvýšení hladiny ACh pomocí inhibitorů cholinesteráz (Patočka, 2004). Prvním používaným lékem byl fyzostigmin, vyznačující se dobrou aktivitou v CNS (Bajgar, 2011). Z důvodu nežádoucích efektů (arytmie, bradykardie, zvýšená sekrece) bylo od jeho užívání upuštěno. Takrin, antidotně velmi efektivní akridinový derivát, se rovněž klinicky nepoužívá z důvodu vysoké hepatotoxicity. Jeho 7-metoxy derivát (7-MEOTA), jehož struktura je na obrázku 2., již tento vedlejší účinek nemá, proniká do CNS a vyznačuje se minimální toxicitou. 7-MEOTA reversibilně inhibuje cholinesterázy, terapeutický účinek je dlouhodobý a není nutné opakované podávání (Fusek et al., 2015).



Obrázek 2. Struktura 7-MEOTA

1.3 Farmakologické parametry

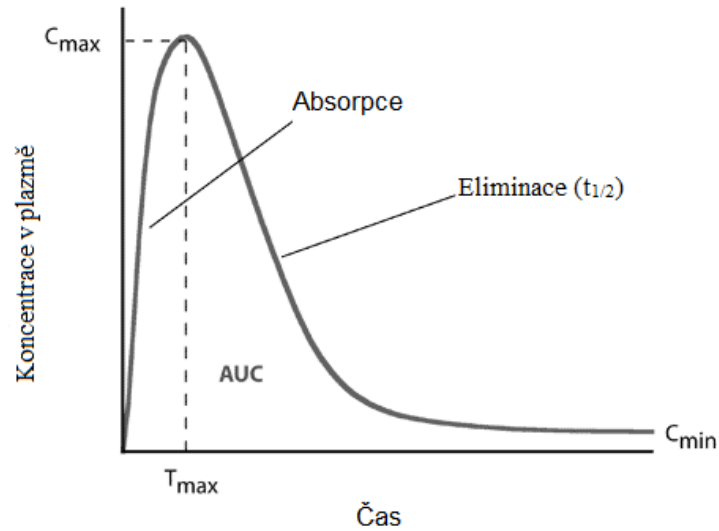
Před samotným uvedením nového léku na trh se provádí povinné testování za účelem stanovení jeho účinnosti a bezpečnosti (obrázek 3.). Rozděluje se na preklinickou fázi, která probíhá bezprostředně po vývoji léčiva, a na ní navazující klinickou fázi (Gad, 2008). Preklinické testy se dělí v závislosti rozdílné úrovně vývoje na *in vitro*, probíhající v izolovaných buňkách, tkáních a orgánech, a *in vivo*, které probíhají na zvířecích modelech (Martínková, 2007). Účelem *in vitro* testování je vyřadit potenciální léčiva s vysokou toxicitou a nedostatečnou terapeutickou účinností, čímž je zároveň snížen počet pokusných zvířat potřebných v *in vivo* experimentech (Součková et al., 2015).



Obrázek 3. Životní cyklus léčiva (Životní cyklus léku, 2008)

V rámci *in vivo* hodnocení se studium zaměřuje zejména na farmakokinetické parametry, kdy se zkoumá absorpce, distribuce a eliminace léčiva z organismu (Urso et al., 2002). Mezi základní sledované farmakokinetické parametry patří maximální koncentrace látky (C_{max}), čas dosažení C_{max} (t_{max}), plocha pod křivkou (AUC) a biologický poločas eliminace ($t_{1/2}$), při kterém koncentrace látky klesne o 50 % (Gad, 2008). Hodnoty C_{max} a t_{max} je možné rovnou vyčíst z farmakokinetické křivky (obrázek 4.). Po intravenózním podání (i. v.) jsou C_{max} a t_{max} dosaženy ihned. Při intramuskulárním podání (i. m.) se veličiny C_{max} a t_{max} mění v závislosti na typu tkáně.

Hodnota AUC se získá po sečtení plochy pod křivkou a $t_{1/2}$ se zjistí po proložení křivky exponenciální funkcí (Urso et al., 2002).



Obrázek 4. Farmakokinetický profil (Pharmacokinetic profile of tacrolimus, 2019)

Z důvodu lepšího porozumění farmakokinetiky léčiva jsou zavedeny i další parametry. Jedná se o clearance (Cl), což je množství krve/tkáně očištěné od látky za jednotku času. Systémová neboli celková Cl léčiva je součet jednotlivých Cl v játrech, ledvinách a ostatních tkáních, kde by se látka mohla zdržovat (Nassar, 2009). Dalšími parametry jsou distribuční objem (Vd), který specifikuje, v závislosti na fyzikálních vlastnostech látky, jaké množství léčiva se bude více zdržovat v určitých tkáních, a biodostupnost, což je podíl podané látky v nezměněné podobě, jež vstoupí do systémového řečiště (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995; Urso et al., 2002).

1.4 Biologický materiál

Při sledování farmakokinetiky zkoumané látky v rámci preklinických a klinických testů se v určitých časových intervalech odebírají vzorky relevantního biologického materiálu (Nassar, 2009). Může se jednat o tělní tekutiny, jako jsou krev, plazma, moč, žluč a sliny, nebo se zkoumají odebrané části tkání, například mozek, játra nebo ledviny (Alampanos et al., 2019; Kole et al., 2011). Jednotlivé druhy biologického materiálu se liší nejen náročností a invazivností odběru, ale také způsobem jejich zpracování (Lee, 2012; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Analýza biologického materiálu se rozděluje na kvalitativní, zaměřující se na určení analytu, a kvantitativní, vyjadřující koncentraci látky v dané matrici. Nejen z důvodu komplexního charakteru matrice je nutné použít vysoce citlivé a selektivní analytické metody (Alampanos et al., 2019).

Většina reálného biologického materiálu je velice komplikovaná pro přímou analýzu a bez předchozí úpravy je nekompatibilní s chromatografickými přístroji (Kataoka, 2003; Alampanos et al., 2019; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Důvodem je zpravidla vysoký obsah proteinů a balastních interferujících látek (Nováková & Douša, 2013a; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Jejich přítomnost může ovlivnit či úplně znemožnit vlastní analýzu sledovaného analytu, je-li navíc ve stopové koncentraci oproti ostatním složkám matrice (Slack & Snow, 2007; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Úprava biologického materiálu je kritickým a časově nejnáročnějším krokem manipulace se vzorkem, který ovlivňuje citlivost, selektivitu a reprodukovatelnost analýzy (Medvedovici et al., 2018). Kromě odstranění nežádoucích látek z matrice, může také sloužit k zakoncentrování analytu, je-li přítomen ve velmi nízkých koncentracích (Nováková & Douša, 2013a; Alampanos et al., 2019). U velkého počtu vzorků a měření se musí jednat o takový postup úpravy, který bude na jednu stranu dostatečně efektivní, na druhou stranu co nejméně časově náročný (Nováková & Vlčková, 2009). Výsledná selektivita celé analýzy je značně ovlivněna vlastní úpravou vzorku, ale také sběrem vzorků, chromatografickou separací a následnou detekcí (Nováková & Douša., 2013a).

1.5 Úprava vzorku

Postupy pro úpravu vzorku se zpravidla dělí na konvenční a moderní metody. Konvenční přístupy jsou široce rozšířeny a rutinně využívány ve většině laboratoří, pro svou nenáročnost, velmi dobrou reprodukovatelnost a kompatibilitu s celou řadou biologických vzorků (Nováková, 2013; Nováková & Vlčková, 2009).

Mezi nejpoužívanější konvenční metody pro úpravu vzorku patří:

- Přímé nastříknutí (popřípadě se zředěním)
- Přímá extrakce
- Srážení proteinů (protein precipitation – PP)
- Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction – LLE)
- Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction – SPE)

U výběru metody pro zpracování vzorku hrají důležitou roli fyzikální a chemické vlastnosti sledované látky, například stabilita, rozpustnost, disociační konstanta, molekulární hmotnost, iontové interakce, vazba analytu na proteiny atd. (Slack & Snow, 2007). Cílem zpracování je dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti extrakce analytu, tedy snažit se o jeho minimální ztrátu, ke které může dojít během úpravy vzorku a zároveň zajistit reprodukovatelnost výsledků (Nováková & Douša, 2013b).

Druhou skupinou metod jsou moderní techniky. Vycházejí převážně z konvenčních metod (PP, LLE, SPE), jejich hlavními přednostmi jsou menší spotřeba vzorku a rozpouštědel a zkrácení doby úpravy. (Nováková & Douša, 2013b; Alampanos et al., 2019). Mezi moderní techniky patří mikroextrakce do kapalné fáze nebo tuhé fáze, extrakční techniky s vysokou selektivitou, jako je například MIPs – molekulárně vtištěné polymery, a on-line techniky, které jsou jednou ze součástí chromatografického systému (Nováková & Vlčková, 2009). Moderní techniky jsou v současné době předmětem výzkumu (Kole et al., 2011).

1.5.1 Přímý nástřik

Nejjednodušší formou úpravy vzorku je přímé nastříknutí do chromatografického systému. Vzorek je možné před vlastní analýzou přefiltrovat s pomocí komerčně dostupných filtrů (například stříkačkové/syringe filtry nebo filtrační destičky), kdy se odstraní mechanické nečistoty. Filtr je nutné vybírat také na základě interakcí s matricí

vzorku, aby nedošlo k jeho poškození (Nováková & Douša, 2013b). Nevýhodou filtrace může být možná adsorpce analytu na membránu filtru a přenos možných interferujících látek do filtrátu (Smith, 2003).

Metoda přímého nástřiku je vhodná pro analyty o nízké molekulové hmotnosti (environmentální analýza vod, analýza vody na přípravu injekcí apod.; Slack & Snow, 2007). V případě hodně koncentrovaného vzorku (například moč, žluč) je možné jej před analýzou naředit (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

1.5.2 Přímá extrakce

Přímá extrakce je úprava vzorku založena na převedení analytu z matrice pevného skupenství do kapalného skupenství. Při tomto procesu existují dva limitující faktory: rozpustnost analytu a přenos hmoty mezi skupenstvími. Tyto faktory mohou být ovlivněny zvýšením teploty a tlaku, kdy je narušena povrchová rovnováha mezi analytem a matricí, a kdy se zvýší rychlost difúze a disoluční kapacita použitých extrakčních rozpouštědel (Nováková & Douša, 2013b). Rozmělnění a homogenizace matrice s analytem je dalším důležitým rysem, jenž ovlivňuje účinnost extrakce (Slack & Snow, 2007). Ztráty během extrakce jsou zpravidla způsobeny adsorpcí analytu na jemně mletý materiál matrice (Nováková & Douša, 2013b).

Volba organického rozpouštědla je závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech analyzované látky, na typu matrice a dalších postupech přečištění extraktu. V praxi se používají polární rozpouštědla, a to směsi voda – polární rozpouštědlo (například metanol, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran apod.) nebo pufr (octanový, fosforečnanový, chloridový atd.) – organické rozpouštědlo. Nepochární nebo slabě polární rozpouštědla (například hexan, chloroform, etylacetát, benzen, dietyleter apod.) jsou využívána při extrakci nepolárních látek, jako jsou lipidy (Nováková & Douša, 2013b).

Před vlastní analýzou je nutné provést oddělení tuhé matrice od kapalně fáze extraktu pomocí filtrace, dialýzy nebo odstředěním (Nováková & Douša, 2013b). Pro urychlení přímé extrakce se využívá vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Vandenburg et al., 1998). Nejen že se zkrátí čas úpravy vzorku, ale zároveň je použito menší množství rozpouštědel než při extrakci za normálních podmínek (Nováková & Douša, 2013b).

Superkritická fluidní extrakce je typ přímé extrakce, kdy se místo organických rozpouštědel použije kapalina v nadkritickém stavu teploty a tlaku. Nejčastěji využívanou kapalinou je oxid uhličitý, má nízkou kritickou teplotu, je cenově dostupný a bezpečný (Chen et al., 2008; Nováková & Douša, 2013b).

1.5.3 Srážení proteinů

Precipitace je typ úpravy vzorku založený na odstranění proteinů z matrice (Nováková & Douša, 2013b). Obecně je možné odstranit proteiny pomocí vnějšího stresu, například teplem nebo chemickými látkami (Kole et al., 2011; Medvedovici et al., 2018). Metoda PP je vhodná u analýzy nízkomolekulárních látek, u studia makromolekul by došlo k jejich nežádoucímu znehodnocení (Daykin et al., 2002).

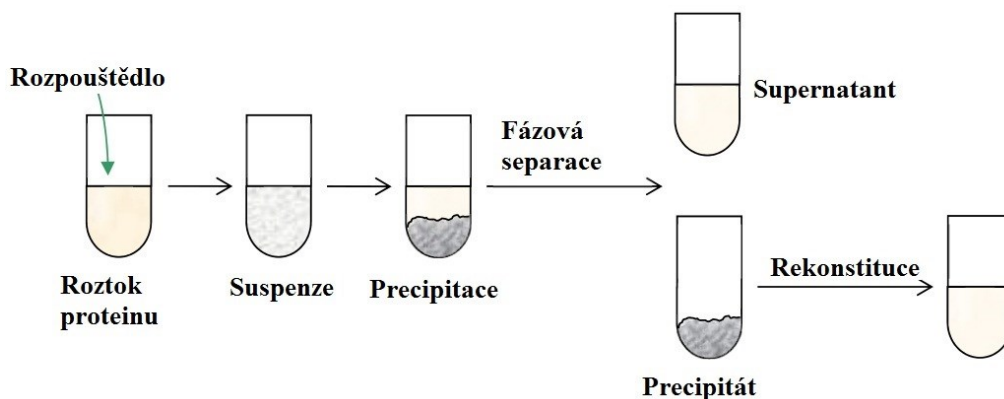
Pro srážení se nejčastěji využívají organická rozpouštědla, nebo roztoky silných kyselin uvedených v tabulce 3. nebo lze provést například enzymovou deproteinaci (Nováková & Douša, 2013b). U organických rozpouštědel je také možné použít činidla zlepšující srážení, jako jsou soli těžkých kovů (síran zinečnatý, wolframian sodný apod.; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Tabulka 3. Extrakční rozpouštědla a silné kyseliny používané při PP

| <i>Organické rozpouštědlo</i> | <i>Silné kyseliny</i> |
|-------------------------------|-------------------------------|
| metanol (MeOH) | trichloroctová kyselina (TCA) |
| aceton | chlorovodíková kyselina (HCl) |
| acetonitril (ACN) | trifluoroctová kyselina (TFA) |
| etylacetát (EtAc) | chloristá kyselina |
| dichlormetan (DCM) | fosforečná kyselina |
| dietyleter (DEE) | |

Po odstředění vzorku s rozpouštědlem je čistý supernatant analyzován či nejdříve odpařen do sucha a rozpuštěn v námi zvoleném objemu rozpouštědla, mobilní fáze nebo její součásti (tzv. zakoncentrování; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Metoda (obrázek 5.) je snadná, rychlá a při správném nastavení je efektivní z hlediska výtěžnosti (nedochází k výrazné ztrátě analytu; Nováková, 2013). Nevýhodou PP je naředění vzorku a možná ztráta analytu díky vazbě na precipitát. Zároveň také

nedochází k odstranění dalších potenciálně interferujících endogenních látek a může vznikat nečistý supernatant (Nováková & Vlčková, 2009; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).



Obrázek 5. Schéma deproteinace (Scheme of precipitation of polyelectrolyte/protein complexes, 2019)

Důležitými faktory při výběru vhodné precipitační techniky je vazebnost sledované látky na proteiny, ale také interference rozpouštědla s analytem při detekci (Nováková & Douša, 2013b).

1.5.4 Extrakce z kapaliny do kapaliny

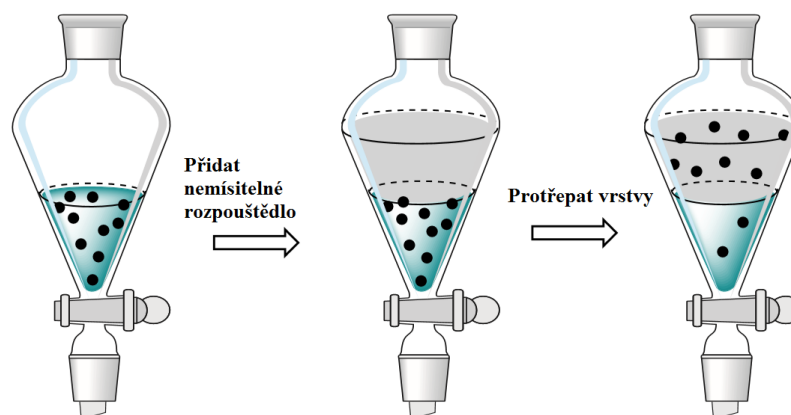
Jedná se o obecně používaný princip úpravy vzorku založený na separaci analytu mezi dvě nemísitelné fáze, hydrofilní a lipofilní (Slack & Snow, 2007; McDowall et al., 1986). Celý proces se řídí rozdělovacím koeficientem voda/oktanol, tedy Nernstovým distribučním zákonem (vzorec 1.) a také objemem obou fází (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Harvey, 2019).

$$K_D = \frac{C_o}{C_{aq}}$$

Vzorec 1. Nernstův distribuční zákon (K_D – rozdělovací koeficient, C_o – koncentrace analytu v organické fázi, C_{aq} – koncentrace analytu ve vodné fázi)

Ke vzorku ve vodném prostředí je přidáno organické rozpouštědlo v určitém poměru, viz obrázek 6. Poté je analyt ze vzorku extrahován třepáním a z oddělených vrstev je pak odebrána fáze zájmu (zpravidla organická fáze; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Extrakci je možné provést několikrát za sebou za účelem

zvýšení její výtěžnosti (Harvey, 2019). Požadavky na použité organické rozpouštědlo zahrnují zejména nemísitelnost s vodou, těkavost, inertnost vůči analytu, obdobnost polarity s analyzovanou složkou a odpovídající čistota (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).



Obrázek 6. Extrakce z kapaliny do kapaliny (Schematic of extraction, 2019)

Lepší výtěžnosti je možné dosáhnout změnou organického rozpouštědla, zvýšením objemu organické fáze, opakováním extrakce a v případě ionizovatelných látek upravením pH vodné části, popřípadě přidáním iontově-párového činidla (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). U LLE je možná derivatizace, tedy převedení na derivát analytu, je provedena za účelem zlepšení extrakce nebo detekce analytu (Davis et al., 2008). Všeobecně nejsou stanovena přesná pravidla a rozdělení rozpouštědel podle sledovaného analytu, je zde velká rozmanitost ve složení extrakční směsi rozpouštědel, které jsou uvedeny v tabulce 4. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013b).

Pomocí LLE je možné oddělit polární sloučeniny od nepolárních, rozdělit jednotlivé sloučeniny na základě pH. Pro látky s nízkou koncentrací ve vzorku, kde je velké množství komponent z matrice, je možné využít metodu tzv. zpětné extrakce, kdy druhá extrakce proběhne z organické fáze zpět do vodné (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Například dojde k odstranění jak bazických, tak neutrálních látek na rozdíl od jednokrokové LLE.

Další výhodou této úpravy může být zakoncentrování, sjednocení prostředí s mobilní fází nebo odstranění lipofilních látek ze vzorku, které by mohly narušit chromatografickou analýzu (Slack & Snow, 2007).

Tabulka 4. Typy rozpouštědel u LLE

| <i>Vodné rozpouštědlo</i> | <i>Organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou</i> | <i>Organické rozpouštědlo mísitelné s vodou (nevhodné pro LLE)</i> |
|---------------------------|---|--|
| voda | hexan | etanol |
| iontově-párové činidlo | dietyler | aceton |
| chelatační činidlo | chloroform | kyselina octová |
| bazický roztok | alkohol s C6 uhlíkem a více | dioxan |
| kyselý roztok | keton s C6 uhlíkem a více | acetonitril |
| | toluen | dimetylsulfoxid |

Metoda LLE je vhodná pro malé i velké množství vzorku, nevyžaduje žádnou speciální instrumentaci, je dobře reprodukovatelná. Rizikem tohoto typu úpravy vzorku je vznik emulze (nedostatečné rozdělení obou fází od sebe), je relativně pracná a ne příliš vhodná pro polární látky (Nováková & Vlčková, 2009; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Někdy je zapotřebí provést tzv. rekonstituci, tedy vzniklý odparek po extrakci rozpustit v mobilní fázi (Nováková & Douša, 2013b; Henion et al., 1998).

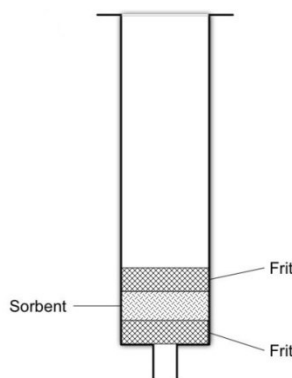
1.5.5 Extrakce na tuhou fázi

Výkonná a dominantní metoda úpravy vzorku je extrakce na tuhou fázi (Nováková & Douša, 2013b). Separace je založena na mechanismu retence látky, kdy je analyt zachycen na stacionární fázi, přes kterou protéká mobilní fáze. Metodu je možné použít pro čištění látky, derivatizaci, zakoncentrování stopových množství látky nebo k výměně rozpouštědel, kdy je analyt převeden z organického do vodného prostředí. Retence je uskutečněna díky hydrofobním, dipólovým interakcím, vodíkovým můstkům, elektrostatickým a π interakcím (Klouda, 2003). Podmínkou úspěšné extrakce je tedy vyšší afinita analytu k tuhé fázi než k matici vzorku v kapalném skupenství (Nováková & Douša, 2013b).

Praktické provedení extrakce spočívá v nanesení kapalného vzorku na SPE kolonku, kde je zachycen materiálem sorbentu. Interferující a nežádoucí příměsi mohou

být odstraněny promytím rozpouštědly. Poté je analyt z kolonky znovuzískán pomocí elučního rozpouštědla a vzniká tzv. eluát (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Sorbenty jsou tvořeny částicemi o velikosti od 5 μm až 250 μm a uzavřeny v kolonce o objemu 0,01 ml – 200 ml (SPE Cartridges, 2019) polyetylenovými či polytetrafluorovými fritami (obrázek 7.). Průtok mobilní fáze přes sorbent je zajištěn vakuem u výstupu z kolonky nebo tlakem na jejím vstupu (Klouda, 2003). Komerčně dostupné sorbenty se dělí na základě chemických vlastností analytu na polární, nepolární, iontově-výměnné (tabulka 5.) a tzv. mixed-mode sorbenty, využívající nejméně dvě metody interakce mezi SF a analytem pro získání lepší separace (Nováková & Douša, 2013b; Nováková & Vlčková, 2009).



Obrázek 7. Kolonka SPE (Disposable cartridge for SPE, 2012)

Tabulka 5. Rozdělení SPE produktů podle analytu

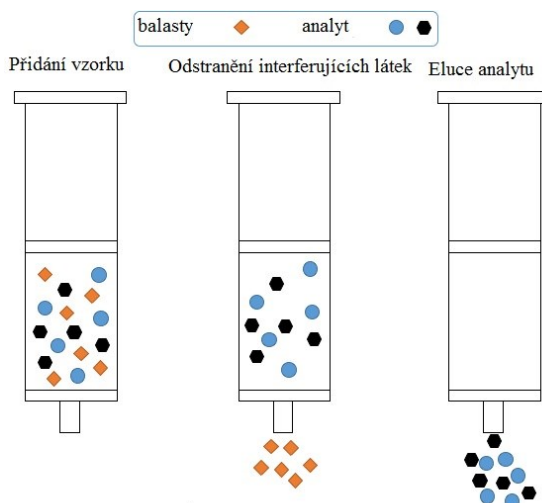
| Matrix | <i>Hydrofilní (biologický vzorek, voda)</i> | | <i>Lipofilní (olej, hexanový extrakt tkáně)</i> | |
|---------|---|-----------------------------|---|---|
| Fáze | Reverzní fáze | Iontově-výměnná separace | | Normální fáze |
| Analyt | nepolární až středně polární látky | silný kation silný anion | slabý kation slabý anion | středně polární až polární látky |
| Sorbent | C18, C8, C4, NH ₂ | SCX/SAX | WCX/WAX | silikagel, hliník, diol, kyanid, florisil |

C18, C8, C4 – uhlíkaté zbytky na silikagelu, NH₂ – amonný zbytek na silikagelu; WCX – slabá kation výměna, WAX – slabá anion výměna, SCX – silná kation výměna, SAX – silná anion výměna

Obvyklý postup SPE po výběru vhodného sorbentu zahrnuje **úpravu extraktu** – cílem tohoto kroku je případné naředění vzorku a odstranění pevných částic, které by mohly ucpat a poškodit fritu SPE kolonky (Nováková & Douša, 2013b).

Primární zásady pro úspěšnou SPE týkající se správného zacházení se sorbentem a vzorkem v průběhu extrakce jsou (obrázek 8.):

- **Kondicionace** – aktivace funkčních skupin sorbentu a příprava pro vlastní extrakci. Během kondicionace je nutné zamezit vyschnutí sorbentu a zaručit dokonalou mísitelnost následujících rozpouštědel.
- **Ekvilibrace stacionární fáze** – cílem je ustanovit rovnováhu a vytvořit prostředí podobné ke vzorku, který bude poté nanášet (Nováková & Douša, 2013b). U fyziologických tekutin se používá odpovídající pufr, u vzorků v organickém rozpouštědle by se kolonka měla upravit tentýž rozpouštědlem. Zároveň dojde k vymytí přebytečných zbytků solvatačního rozpouštědla ze sorbentu z předchozí kondicionace.
- **Aplikace vzorku** – jedná se o fázi nanášení vzorku do kolonky (Klouda, 2003). Během tohoto kroku se kontroluje rychlost průtoku, která je značně variabilní (Nováková & Douša, 2013b).



Obrázek 8. Schéma SPE – aplikace, vymytí balastů a eluce analytu (SPE bind and elute strategy, 2019)

- **Vymytí balastů** – odstranění interferujících látek pomocí promývacích činidel, ve kterých je analyt minimálně rozpustný. Pro odstranění solí a ve vodě rozpustných interferujících látek je často používána čistá voda. Při iontové výměnné SPE jsou promývací činidla volena podle hodnoty pH a iontové síly, jejich složení musí být v každém případě dostatečně optimalizováno (Nováková & Douša, 2013b).
- **Eluce analytu** – eluce analytu probíhá za kontroly rychlosti průtoku, aby došlo k veškerému vymytí látky do zvoleného rozpouštědla (Klouda, 2003). Při eluci je sledován eluční profil, což je závislost množství analytu (koncentrace v %) na objemu elučního činidla. Tvar tohoto profilu je závislý na výběru mobilní (eluční činidlo) a stacionární (typ sorbentu) fáze (Nováková & Douša, 2013b).

Metoda SPE má oproti dříve uvedeným úpravám mnoho výhod, a to vysoká výtěžnost, selektivita, zakoncentrování vzorku, nižší spotřeba rozpouštědel, dobrá automatizace a široké využití díky rozsáhlé škále sorbentů na trhu (Nováková, 2013). Negativní pohled je upírán na cenu a časovou náročnost (Alampanos et al., 2019).

1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda založena na rozdílné distribuci látek mezi dvě nemísitelné vrstvy, mobilní fází (MF, pohyblivou) a stacionární fází (SF, nepohyblivou; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Na základě mechanismu separace můžeme HPLC rozdělit na adsorpční (separace založena na rozdílné adsorpci látek na povrch SF – silikagel), rozdělovací (principem je rozdílná rozpustnost látky ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách), iontově-výměnnou (separace je založena na rozdílné afinitě analytu k SF – iontoměníči), gelovou (separace na základě rozdílné velikosti, kdy molekuly větší než póry z porézního gelu nejsou zadrženy) a afinitní (využití specifických ligandů, které na základě biologických reakcí například enzymatických izolují analyt – protein nebo DNA – ze složitě biologického materiálu; Klouda, 2003; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

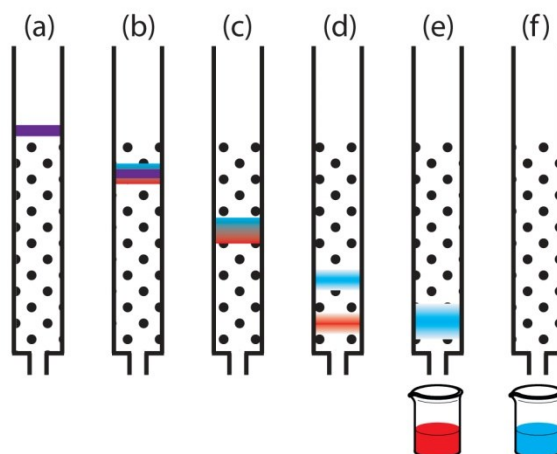
Distribuci látek mezi MF a SF lze popsat distribuční konstantou, viz vzorec 2.

$$K_D = \frac{C_S}{C_M}$$

Vzorec 2. Rovnice distribuční konstanty (C_S je koncentrace látky v SF a C_M je koncentrace látky v MF)

Čím větší je distribuční konstanta látky, tím větší je setrvání její molekuly v SF tzv. retence (Klouda, 2003; Nováková & Douša, 2013a). Ta je nejčastěji charakterizována retenčním časem, tedy časem dosažení maxima eluční křivky od nástřiku vzorku na kolonu (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013a).

Separace (obrázek 9.) a retence/eluce látek je ovlivněna typem SF a složením MF. Dělení látek může být buď v režimu isokratické eluce, kdy složení MF je konstantní v čase a je vhodná pro látky podobných fyzikálně-chemických vlastností, nebo gradientové eluce, kdy je složení MF programově měněno během eluce a využívá se pro směsi látek s výraznými odlišnostmi v retenci, isokratická eluce by pro takovéto látky byla časově náročná (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013a).

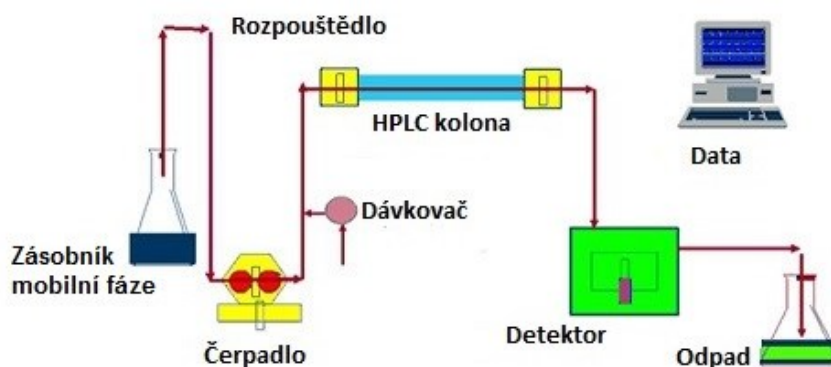


Obrázek 9. Princip separace na analytické koloně (Progress of a column chromatographic separation of a two-component mixture, 2019)

Po hardwarové stránce je HPLC systém složen z těchto základních částí (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015):

- Zásobník mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo
- Dávkořadač vzorku
- Prostor s chromatografickou kolonou
- Detektor
- Softwarové vybavení s počítačem

Základní blokové schéma chromatografu je uvedeno na obrázku 10.



Obrázek 10. Blokové schéma HPLC systému (HPLC systems, 2013)

1.6.1 Mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo

Mobilní fáze je do systému přiváděna ze zásobníku, kde jsou umístěny speciální filtry zamezující průchod suspendovaných tuhých částic do systému (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Před vstupem do systému musí být MF odplyněna (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Tato předúprava může odstranit problémy během separace, jako je například kolísání základní linie a s ní spojené snížení citlivosti detekce, neopakovatelné retenční časy nebo nestabilita provozu čerpadel (Nováková & Douša, 2013a). Odplynění se provádí buď probubláváním heliem, jež je přímo přiváděn do zásobníku MF, nebo vakuovým degaserem, kdy MF prochází přes polopropustnou kapiláru umístěnou ve vakuové komoře, která propouští pouze plyny (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

Vysokotlaké čerpadlo má důležitou roli v udržení bezpulzního stabilního průtoku MF. Pro gradientovou eluci jsou dva způsoby mísení rozpouštědel, a to za nízkého nebo vysokého tlaku. Při nízkotlakém gradientu jsou rozpouštědla mísená před vstupem do chromatografického čerpadla. Tento typ mísení zajišťuje lepší reprodukovatelnost tvorby gradientu. Při mísení za vysokého tlaku je potřeba použít více čerpadel, kdy jsou jednotlivé složky mobilní fáze míseny až za čerpadly (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). Výhodou oproti nízkotlakému gradientu je menší mrtvý objem systému (objem chromatografu od čerpadla až po výstup z kolony) a rychlejší nástup gradientu (Cvačka, 2010; Nováková & Douša, 2013a).

1.6.2 Dávkovač vzorku

Nadávkování vzorku o přesném a námi zvoleném objemu do chromatografického systému je zajištěno díky dávkovači vzorku. Přesnost a způsob dávkování vzorku má vliv na účinnost separace, kdy může docházet k rozmývání píku analytu vlivem mimokolonového příspěvku (Nováková & Douša, 2013a). V současnosti se využívají dávkovače založené na principu přepínacích ventilů ve smyčkovém uspořádání (Klouda, 2003). Automatizace je základním požadavkem u výběru nového dávkovače k přístrojovému vybavení do analytické laboratoře. Komerčně dostupné automatické dávkovače mají rozmezí dávkovacích smyček od 0,2 μ l do 2 ml.

1.6.3 Chromatografická kolona a stacionární fáze

Chromatografická analytická kolona představuje SF v HPLC systému. Skládá se z těla (sorbent a plášť z nerezové oceli) a koncovky. Konvenční analytické kolony jsou rozdělené podle typu sorbentu, podle velikosti částic u náplňových kolon (1 až 10 μ m), podle délky kolony (10 až 30 mm) a podle vnitřního průměru (2,1 až 5 mm). Dále je

můžeme dělit na základě způsobu výroby, na náplňové a monolitické. Vnitřní povrch kolony musí odolat vysokému tlaku a chemickému působení MF (Klouda, 2003; Nováková & Douša, 2013a).

SF se rozděluje podle polaritý fáze (polární, nepolární a amfoterní), podle módu separace (normální, reverzní, ionexy, atd.) a podle chemického složení SF (anorganické oxidy, chemicky vázané zbytky na bázi silikagelu, polymery, grafitový uhlík). V současnosti se v analýze léčiv stále nejvíce uplatňují reverzní fáze (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013a).

U reverzního módu separace (tj. u kolon s nepolární stacionární fází) je polární silikagel chemicky modifikován navázáním různých funkčních skupin, které zásadně ovlivňují interakce s analyty a tím i jejich retenci (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013a). Při separaci na klasické reverzní fázi je retence látek ovlivněna zejména délkou navázaného alkylu (2-30 uhlíků), nejčastěji se však setkáváme s oktadecylovým zbytkem (C18). Fenylové a alkylfenylové funkční skupiny pak vykazují vyšší afinitu k aromatickým látkám a aminosloučením. Pro separaci polárnějších látek lze pak využít kolony s vázanými aminopropylovými nebo kyanopropylovými skupinami (Neue et al., 2007; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Nováková & Douša, 2013a).

1.6.4 Detektor

Po rozdělení látek na chromatografické koloně je analyt s MF přiveden do detektoru, kde je snímán rozdíl signálu oproti čisté MF. Detektory se dělí na koncentrační, závislý na koncentraci analytu, a hmotnostní, kdy detektor reaguje na změnu hmotnostního toku. Další dělení je na destrukční a nedestrukční, kdy může být analyt dále vychytáván a zpracován, případně znovu analyzován. Ideální detektor by měl být vysoce citlivý, univerzální, specifický, spolehlivý a nezávislý na změně MF (gradientová eluce; Klouda, 2003; Nováková & Douša, 2013a).

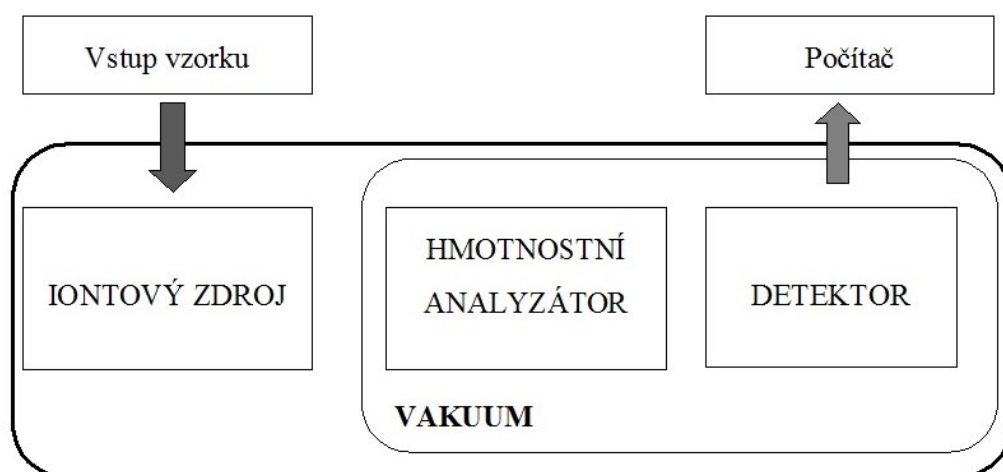
Při výběru detektoru je důležité vzít v potaz jeho citlivost a selektivitu (tabulka 6.). U hmotnostního spektrometru se dále sleduje hmotnostní rozsah (maximální měřitelná hodnota m/z), rozlišení, účinnost, rychlost, citlivost a lineární rozsah (Cvačka, 2010; Nováková & Douša, 2013a).

Tabulka 6. Přehled, selektivita a citlivost detektorů (Klouda, 2003; Nováková & Douša, 2013a; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)

| <i>Detektor</i> | <i>princip</i> | <i>selektivita</i> | <i>citlivost</i> |
|---------------------------------------|--|--------------------------------|------------------|
| Spektrofotometrický (UV, UV/VIS) | absorpce záření (UV/VIS) analytem | selektivní | vysoká |
| Fluorimetrický (FLD) | měření sekundárního emisního záření pocházející z fluorescence analytu (u látek přirozeně nefluoreskujících lze využít derivatizace) | velmi selektivní | velmi vysoká |
| Amperometrický (elektrochemický, ECD) | sledování závislosti elektrické veličiny (elektrodotový potenciál - coulometrické, proud - amperometrický) na koncentraci sledované látky pouze pro látky schopné oxidace/redukce | velmi selektivní | velmi vysoká |
| Refraktometrický (RID) | měření rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a indexu lomu MF v referenční cele | neselektivní univerzální | malá |
| Vodivostní | měření elektrické vodivosti roztoku v průtokové cele mezi dvěma elektrodami se střídavým napětím | neselektivní | vysoká |
| Hmotnostní spektrometr (MS) | stanovení analytu na základě poměru hmotnosti k náboji analytu | univerzální a velmi selektivní | velmi vysoká |

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickými detektory patří v analýze léčiv v biologickém materiálu mezi nejpoužívanější. Tyto detektory jsou velmi specifické, univerzální, citlivé a jsou kompatibilní s řadou chromatografických technik a biologických matric. Poskytují informace i o struktuře látek s většími molekulovými hmotnostmi a je možné měření směsí analytů najednou. Látky jsou po zavedení vzorku nejprve ionizovány (neutrální molekuly jsou převedeny na ionty), poté jsou rozděleny podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a nakonec detekovány, viz obrázek 11. (Klouda, 2003; Nováková & Douša, 2013a; Hansen

& Pedersen-Bjergaard, 2015). Koelucí matrice dochází k ovlivnění ionizace analytu, tzv. matricový efekt (matrix effect; George et al., 2018). Potlačení ionizace tzv. ion suppression může být způsobeno reakcí mezi dalšími metabolity a analytem, kdy vznikají málo těkavé až netěkavé látky, které omezují tvorbu ionizované kapky. Druhým typem je zvýšení účinnosti tzv. ion enhancement způsobené možnou fragmentací matrice či metabolitů před ionizací, nebo dojde k silnému navázání analytu na matrici (Klapková et al., 2011). Zmírnění matricových efektů je možné docílit optimalizací celé metody, včetně složení MF (Gosetti et al., 2010; Van Eeckhaut et al., 2009). Pro vyhodnocení se proto nejčastěji používá metoda vnitřního standardu (internal standard, IS), kdy jsou během měření stejné podmínky jak pro vzorek, tak pro jeho analog (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Klapková et al., 2011).



Obrázek 11. Schematické znázornění hmotnostního spektrometru

- **Pro ionizaci vzorku** jsou na trhu dostupné ionizační techniky měkké (*API* – ionizace za atmosférického tlaku, která se dále dělí na: ESI – ionizace elektrosprejem, APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku; *MALDI* – ionizace desorpcí laserem za účasti matrice), kdy vznikají při ionizaci protonované $[M + H]^+$ /deprotonované $[M - H]^-$ molekuly bez rozsáhlé fragmentace, a tvrdé (EI – elektronová ionizace), u kterých dochází k uvolnění valenčního elektronu za vzniku molekulárního iontu M^+ s rozsáhlou fragmentací vzorku (Nováková & Douša, 2013a; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015). U metody ESI je větší

nebezpečí vzniku matricových efektů (Klapková et al., 2011; Henion et al., 1998; Van Eeckhaut et al., 2009).

- **Analyzátor** má za úkol rozdělit ionty podle poměru m/z a následně je urychlit k detektoru. Novodobé analyzátory pracují na základě 5 základních principů: zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický analyzátor), oscilace iontů v kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí (kvadrupól, trojitý kvadrupól, lineární iontová past), doby letu iontů v prostoru bez pole (TOF – time of flight), absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (iontová cyklotronová past) a rozdělení iontů na základě různé frekvence harmonických oscilací (orbitrap; Nováková & Douša, 2013a; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).
- **K detekci** je poté možné použití elektronového násobiče, fotonásobiče nebo mikrokanálové destičky (Klouda, 2003; Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015).

1.6.5 Softwarové vybavení s počítačem

Data z detektoru jsou sbírána a kvalitativně/kvantitativně vyhodnocena softwarem. Díky softwarovému vybavení je možná větší automatizace přípravných kroků před samotnou analýzou vzorků a zároveň pohodlné zpracování výsledků, kdy jsou programy na ovládání HPLC systému kompatibilní s office programy.

2 Cíle práce

- Vývoj a optimalizace extrakčních metod pro látku BZ z biologického materiálu (plazma, žluč, mozek, játra a ledviny).
- Aplikace výsledných metod na reálné vzorky od potkanů, kterým byla aplikována látka BZ.
- Stanovení základního farmakokinetického profilu látky BZ.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- MeOH, ACN, aceton, TCA, octan amonný – MerckKGaA (Darmstadt, Německo) s čistotou pro LC-MS
- Roztok amoniaku (hydroxid amonný), sůl atropinu sulfátu monohydrátu – Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Látka BZ – syntetizována na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Brně (Hradec Králové, ČR) – čistota ~ 90% stanovena pomocí HPLC (Herman et al., 2020; Misik et al., 2016)

3.2 Přístrojové vybavení a software

K navažování byla použita váha Sartorius CPA225D-0CE.

Výrobek ultračisté vody typ 06 AquaOsmotic pracující na bázi reverzní osmózy (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika).

Na homogenizaci tělních tkání byl použit tyčový homogenizátor TURAX T25 s dispergačním nástavcem S 25 N-18 G (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) a sonikátor UP50H Compact Lab Homogenizer (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany).

Třepání bylo provedeno na termotřepače MTC-100 Thermo Shaker Incubator (Hangzhou MIU Instruments, Hangzhou, China).

Při SPE byla použita vakuová odsávací souprava Visiprep 24 DL (Supelco, Belfonte, PA, USA).

Pro odstředění vzorků byla použita centrifuga Hettich UNIVERSAL 320/320 R (Hettich, Tuttlingen, Germany).

HPLC-MS sestava byla složena z kvartérního vysokotlakého čerpadla s nízkotlakým mísením MF s integrovanou odplyňovací jednotkou (Thermo Finnigan Surveyor MS Pump Plus), automatického dávkovače vzorků s regulací teploty prostoru pro vzorky a vyhřívaným kolonovým prostorem (Thermo Finnigan Surveyor Autosamples Plus), spektrofotometrického UV-VIS detektoru s diodovým polem (Thermo Finnigan

Surveyor PDA Plus) a hmotnostního spektrometru Thermo Scientific LTQ XL vybaveným lineární iontovou pastí (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

Vlastní separace látky BZ probíhala na HPLC koloně Gemini NX-C18 (100 Å, 5 µm, 4,6 × 150 mm) vybavené předkolonou Security Guard Cartridge C18 (4,0 × 3,0 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

K vyhodnocení byl použit software pro ovládání sestavy Xcalibur verze 2.5.0 (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA).

Kinetické křivky byly zhotoveny v programu Prism 5 verze 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Farmakokinetické parametry byly vypočítány programem Kinetica software verze 4.0 (InnaPhase Corporation, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.3 Spotřební materiál

Pro SPE úpravu vzorků byly použity Supelco SPE kolonky Discovery DSC-18 (1 ml, 50 mg; Supelco, Belfonte, PA, USA). Pro homogenizaci tělních tkání byly použity skleněné homogenizační zkumavky. Vzorky byly skladovány ve zkumavkách Eppendorf o objemu 5 a 2 ml (Eppendorf AG; Hamburg, Německo). Vzorky během analýzy byly ve vialkách o velikosti 2 ml (ThermoFisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA). K přesnému odměření objemu byly použity automatické pipety a pipetovací špičky (Eppendorf AG, Hamburg, Německo).

3.4 Metodická část

3.4.1 LC/MS-MS

Chromatografická separace probíhala v módu isokratické eluce MF složené z 10mM octanu amonného (pH = 11, upraveno hydroxidem amonným) a MeOH v poměru 30 : 70 (v/v). Celková doba analýzy byla 5,5 minuty. Průtok MF byl nastaven na 1 ml min⁻¹. Teplota kolony byla termostatovaná na hodnotu 40 °C a v autosampleru byla udržována teplota 8 °C. Objem nástřiku byl 20 µl.

Pro hmotnostně-spektrometrickou detekci byla použita ionizace vyhříváním elektrosprejem (HESI – II), který pracoval v pozitivním modu (ESI⁺). Teplota vyhřívání elektrospreje byla nastavena na hodnotu 400 °C, průtok zmlžovacího plynu byl 20 pracovních jednotek. Teplota kapiláry byla 275 °C, napětí na kapiláře bylo 4,5 kV.

Pozitivní ionty byly detekovány v režimu monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring, SRM). Velikost kolizní energie byla nastavena s ohledem na maximální tvorbu produktových iontů, viz tabulka 7. (Herman et al., 2020).

Tabulka 7. MS/MS parametry pro IS a látku BZ

| Látka | Prekurzorový iont (<i>m/z</i>) | Kolizní energie (CID) | Produktový iont (<i>m/z</i>) |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| IS (atropin) | 290 [M + H] ⁺ | 13 | 260; 124 |
| BZ | 338 [M + H] ⁺ | 15 | 320; 209 |

3.4.2 Příprava roztoků

Pro rozpouštění a ředění všech vzorků byla použita ultračistá voda (dále jen voda).

Příprava mobilní fáze

Vodná složka MF byla připravena navážením 770,825 g octanu amonného, jenž byl rozpuštěn vodou do výsledného objemu 1 l, aby vznikl 10mM roztok. Tento roztok byl následně upraven roztokem hydroxidu amonného na pH = 11.

Zásobní roztoky

Zásobní roztok IS ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 10 mg atropinu sulfátu ve 100 ml vody. Z tohoto roztoku IS byly následně naředěny roztoky IS o koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pro vzorky tělních tekutin) a $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pro vzorky tělních tkání). Zásobní roztok látky BZ ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 12,31 mg hydrochloridové soli látky BZ (o čistotě 90 %) ve 100 ml vody.

Pracovní roztoky látky BZ pro optimalizaci extrakcí z tělních tekutin a tkání

Zásobní roztok látky BZ byl zředěn vodou na výsledné koncentrace $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.4.3 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce z plazmy

Extrakci látky BZ z plazmy již nebylo potřeba optimalizovat, metodika zpracování vzorků byla přejata dle Hermana et al., 2020. Vlastní extrakce probíhala na SPE kolonce SPE Discovery DSC-18, která byla kondicionována 1 ml MeOH a 1 ml vody. Poté byl nanesen vzorek a propláchnut 1 ml vody. Analyty byly eluovány do 1 ml MeOH. Výsledný eluát byl přenesen do vialky a změřen pomocí LC-MS/MS. Výťažnost extrakce byla získána jako poměr ploch píku vzorku plazmy, ke které byly přidány látka BZ a IS před extrakcí, s poměrem ploch píku plazmy, ke které byly přidány látka BZ a IS po extrakci.

3.4.4 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce ze žluči

Vzorky pro SPE: 990 μl blankové žluči bylo smícháno s 10 μl pracovního roztoku látky BZ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) a s 10 μl roztoku IS ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Dále byly vzorky zpracovány pomocí SPE dle postupu uvedeným v kapitole 3.4.3. Vzorek byl připraven v triplicátu ($n = 3$).

Vzorky pro LLE: 240 μl blankové žluči bylo smícháno s 10 μl pracovního roztoku látky BZ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 10 μl roztoku IS ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Ke směsi bylo přidáno 1,5 ml extrakčního činidla (DCM, DEE, EtAc) a po důkladném protřepání v termotřepačce byla organická vrstva odebrána. Postup byl opakován ještě jednou. Extrakty byly spojeny a poté odpařeny. Rezidua byla rozpuštěna v 250 μl MeOH. Vzorek byl pro každé extrakční činidlo připraven v triplicátu ($n = 3$).

Vzorky byly následně přeneseny do vialek a změřeny pomocí LC-MS/MS. Výťažnost extrakce byla získána jako poměr ploch píku vzorku žluči, ke které byly přidány látka BZ a IS před extrakcí, s poměrem ploch píku žluči, ke které byly přidány látka BZ a IS po extrakci.

3.4.5 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce mozku, jater a ledvin

Tělní tkáň byla zvážena ve skleněné homogenizační zkumavce, přidala se voda v poměru 1 : 2 (na 1 g tkáně 2 ml vody). Vzorek byl homogenizován tyčovým homogenizátorem po dobu 1 minuty a 15 000 RPM, poté byl vložen do sonikátoru (amplituda 100 %) na dobu 5 minut.

Vzorky pro precipitaci: K 390 μ l homogenátu blankové tkáně bylo napipetováno 10 μ l pracovního roztoku látky BZ (4 μ g ml⁻¹) a 10 μ l roztoku IS (4 μ g ml⁻¹). Poté bylo ke směsi přidáno 1 600 μ l precipitačního činidla (MeOH, ACN, TCA, aceton). Následně byla směs třepána v thermoshakeru při 1 500 RPM 5 min. Po protřepání byla směs odstředěna při teplotě 4 °C a 14 000 \times g po dobu 15 minut. Supernatant byl odebrán do vialky a změřen pomocí LC-MS/MS. Vzorky byly pro každé precipitační činidlo a tkáň zhotoveny v triplikátu (n = 3).

Vzorky pro SPE: K 990 μ l homogenátu blankové tkáně bylo přidáno 10 μ l pracovního roztoku látky BZ (4 μ g ml⁻¹) a 10 μ l roztoku IS (4 μ g ml⁻¹). Takto připravené vzorky byly zpracovány pomocí SPE postupem uvedeným v kapitole 3.4.3. Vzorky byly pro každou tkáň zhotoveny v triplikátu (n = 3).

Výťažnost extrakce byla získána jako poměr ploch píku vzorku tkáně, ke které byly přidány látka BZ a IS před extrakcí, s poměrem ploch píku tkáně, ke které byly přidány látka BZ a IS po extrakci.

3.4.6 Projekt pokusu

Dospělí samci potkanů (n = 120) kmene Wistar (Velaz, Praha, Česká republika) o váze 220 \pm 30 g byli rozděleni do dvou skupin, kdy jedné skupině byla i. m. aplikována látka BZ v dávce 2 mg kg⁻¹ a druhé dávka 10 mg kg⁻¹ (n = 60 pro každou skupinu). Zvířata byla za 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240 minut po aplikaci látky BZ anestetizována parami oxidu uhličitého (n = 6 pro každý časový interval). Poté byly odebrány tělní tekutiny (plazma, žluč) a po exsanguinaci tělní tkáň (mozek, játra a ledviny). Krev byla získána rozříznutím karotidy a odebírána do heparinizovaných

zkumavek, které byly centrifugovány $1\,000 \times g$, následně byla plazma separována zvlášť do nových zkumavek.

Vzorky byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Povolení pokusu č.j. MO 129361/2017-684800

3.4.7 Zpracování vzorků plazmy

Do 1 ml plazmy bylo přidáno 10 μl roztoku IS ($10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), směs se zamíchala a dále byla zpracována dle Hermana et al., 2020. Vzorky plazmy u dávky 10 mg kg^{-1} byly před zpracováním zředěny vodou v poměru 1 : 1 (v/v). Vzorky byly dále zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.4.3.

3.4.8 Zpracování vzorků žluči

Do 1 ml, $50\times$ naředěného vzorku žluči u obou dávek, bylo přidáno 10 μl roztoku IS ($10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) a dále zpracován SPE postupem uvedeným v kapitole 3.4.3.

3.4.9 Zpracování vzorků mozku, jater a ledvin

Homogenát tělní tkáně byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.4.5. Následně bylo odpipetováno 400 μl homogenátu (dávka 2 m kg^{-1}) nebo 40 μl homogenátu (dávka 10 mg kg^{-1}) a dále zředěno vodou na výsledný objem 400 μl . K homogenátu se přidalo 10 μl roztoku IS ($4\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Ke směsi bylo poté přidáno precipitační činidlo ACN o objemu 1 600 μl . Dále byly vzorky zpracovány dle metodiky uvedené v kapitole 3.4.5.

3.4.10 Příprava vzorků pro kvantitativní stanovení látky BZ v biologickém materiálu

Jednotlivé kalibrační roztoky byly připravené zředěním zásobního roztoku látky BZ v takových koncentračních hladinách, aby výsledné množství látky BZ v daném biologickém materiálu (plazma, žluč, mozek, játra, ledviny) odpovídalo koncentracím uvedených v tabulce 8.

Tabulka 8. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro přípravu kalibračních standardů

| Matrice | Plazma | Žluč | Mozek | Játra | Ledviny |
|--|--------|-------|-------|-------|---------|
| Koncentrace látky BZ v matrici [ng ml ⁻¹ tělní tekutiny / homogenátu] | 0,5 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| | 1 | 10 | 8 | 10 | 10 |
| | 4 | 50 | 16 | 50 | 50 |
| | 8 | 100 | 32 | 100 | 100 |
| | 32 | 250 | 64 | 250 | 250 |
| | 125 | 500 | 128 | 500 | 500 |
| | 250 | 1 000 | 256 | 750 | 750 |
| | 500 | | 512 | 1 000 | 1 000 |
| | 1 000 | | | 2 000 | 2 000 |

Plazma: Kalibrační vzorky byly připraveny z 990 µl blankové plazmy, k níž bylo přidáno 10 µl příslušného kalibračního roztoku látky BZ a 10 µl roztoku IS (10 µg ml⁻¹). Vzorky byly dále zpracovány podle kapitoly 3.4.3.

Žluč: Kalibrační vzorky byly připraveny smícháním 190 µl blankové žluči a 10 µl příslušného kalibračního roztoku látky BZ, z toho bylo odebráno 20 µl a přidáno 10 µl roztoku IS (10 µg ml⁻¹). Po promíchání bylo ke směsi přidáno 980 µl vody. Standardy byly dále zpracovány pomocí SPE dle kapitoly 3.4.3.

Mozek, játra a ledviny: Kalibrační vzorky byly připraveny smícháním 390 µl homogenátu blankové tkáně s 10 µl příslušného kalibračního roztoku látky BZ. Ke směsi bylo přidáno 10 µl roztoku IS (4 µg ml⁻¹). Dále byly standardy zpracovány precipitací dle kapitoly 3.4.5.

3.4.11 Příprava standardů látky BZ pro validaci

V rámci validace metody pro stanovení látky BZ z biologického materiálu byla posuzována následující kritéria: preciznost, přesnost, matricový efekt a diluční integrita. Jednotlivé roztoky určené pro přípravu validačních vzorků byly připravené v takových koncentračních hladinách, aby výsledné množství látky BZ v daném biologickém

materiálu odpovídalo koncentracím uvedených v tabulce 9. (preciznost a přesnost) a v tabulce 10. (matricový efekt).

Preciznost a přesnost:

Validační vzorky pro stanovení preciznosti a přesnosti byly připraveny podle kapitoly 3.4.10. Pro každou koncentrační úroveň a biologickou matici bylo připraveno 5 vzorků (n = 5).

Tabulka 9. Koncentrace látky BZ v biologických maticích pro vyhodnocení preciznosti a přesnosti

| Matrice | Plazma | Žluč | Mozek | Játra | Ledviny |
|---|--------|------|-------|-------|---------|
| Koncentrace látky BZ v matici [ng ml ⁻¹ tělní tekutiny / homogenátu] | 0,5 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| | 1,5 | 15 | 12 | 15 | 15 |
| | 300 | 300 | 200 | 600 | 600 |
| | 800 | 800 | 400 | 1 500 | 1 500 |

Matricový efekt:

Plazma: Vzorky pro vyhodnocení matrixového efektu byly připraveny z 1 ml blankové plazmy, které byly podrobeny SPE dle kapitoly 3.4.3. Do příslušného množství eluátu bylo pak přidáno 10 µl daného pracovního roztoku látky BZ a 10 µl roztoku IS (10 µg ml⁻¹) pro dosažení výsledné koncentrace v plazmě, viz tabulka 10. Směs byla důkladně promíchána, následně přenesena do vialek a změřena pomocí LC-MS/MS. Pro každou koncentrační úroveň byly připraveny 3 vzorky (n = 3).

Žluč: Vzorky pro vyhodnocení matrixového efektu byly připraveny smícháním 190 µl blankové žluči a 10 µl vody, ze kterého bylo odebráno 20 µl a promícháno s 980 µl vody. Vzorky byly dále zpracovány metodou SPE dle kapitoly 3.4.3. Do příslušného eluátu bylo pak přidáno 10 µl daného pracovního roztoku látky BZ a 10 µl roztoku IS (10 µg ml⁻¹) pro dosažení výsledné koncentrace ve žluči, viz tabulka 10. Směs byla důkladně promíchána. Vzorky byly následně přeneseny do vialek a změřeny pomocí LC-MS/MS. Pro každou koncentrační úroveň byly připraveny 3 vzorky (n = 3).

Mozek, játra, ledviny: Vzorky pro vyhodnocení matrixového efektu byly připraveny z 400 μl homogenátu blankové tkáně, která byla podrobena precipitaci pomocí 1 600 μl ACN. Dále byly vzorky zpracovány dle kapitoly 3.4.5. Po odebrání bylo k supernatantu přidáno 10 μl daného pracovního roztoku látky BZ a 10 μl roztoku IS ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) pro dosažení výsledné koncentrace v tkáňovém homogenátu, viz tabulka 10. Vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly následně přeneseny do vialek a změřeny pomocí LC-MS/MS, kdy byly v sérii 3 vzorky. Pro každou tkáň a koncentrační úroveň byly připraveny 3 vzorky ($n = 3$).

Tabulka 10. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro vyhodnocení matricových efektů.

| Matrice | Plazma | Žluč | Mozek | Játra | Ledviny |
|---|--------|------|-------|-------|---------|
| Koncentrace látky BZ v matrici [ng ml^{-1} tělní tekutiny / homogenátu] | 1 | 15 | 12 | 15 | 15 |
| | 950 | 950 | 450 | 1 900 | 1 900 |

Pro vyhodnocení matricových efektů byly dále připraveny vodné roztoky látky BZ o odpovídajících koncentracích uvedených v tabulce 11. Do těchto roztoků bylo přidáno 10 μl roztoku IS o koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ u tělních tekutin (plazma, žluč) a 10 μl IS o koncentraci $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ u tělních tkání (mozek, játra, ledviny).

Tabulka 11. Koncentrace vodných roztoků látky BZ pro vyhodnocení matricového efektu

| Matrice | Plazma | Žluč | Mozek | Játra | Ledviny |
|--|--------|------|-------|-------|---------|
| Koncentrace vodných roztoků látky BZ [ng ml^{-1}] | 1 | 15 | 12 | 15 | 15 |
| | 950 | 950 | 450 | 1 900 | 1 900 |

Diluční integrita:

Plazma: Vzorky byly připraveny z 990 μl blankové plazmy, k níž bylo přidáno 10 μl příslušného roztoku látky BZ (tabulka 12.). Vzorky byly poté 2 \times naředěny a bylo k nim přidáno 10 μl roztoku IS (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Dále byly vzorky zpracovány podle kapitoly 3.4.3.

Žluč: Diluční integrita nebyla měřena u žlučové tekutiny, neboť způsob úpravy vzorku byl u obou dávek (2 mg kg^{-1} a 10 mg kg^{-1}) totožný.

Mozek, játra a ledviny: Vzorky byly připraveny smícháním 390 μl homogenátu blankové tkáně s 10 μl příslušného roztoku látky BZ (tabulka 12.). Vzorky byly poté 10 \times naředěny a bylo k nim přidáno 10 μl roztoku IS (4 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Dále byly vzorky zpracovány dle kapitoly 3.4.5.

Pro každý biologický materiál a koncentrační úroveň byly připraveny 3 vzorky ($n = 3$).

Tabulka 12. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro vyhodnocení diluční integrity

| Matrice | Plazma | Mozek | Játra | Ledviny |
|---|--------|-------|--------|---------|
| Koncentrace látky BZ v matrici [ng ml^{-1} tělní tekutiny / homogenátu] | 1 | 40 | 500 | 500 |
| | 5 | 80 | 1 000 | 1 000 |
| | 50 | 160 | 2 500 | 2 500 |
| | 250 | 320 | 5 000 | 5 000 |
| | 500 | 640 | 10 000 | 10 000 |
| | 2 000 | 1 280 | 20 000 | 20 000 |

4 Výsledky

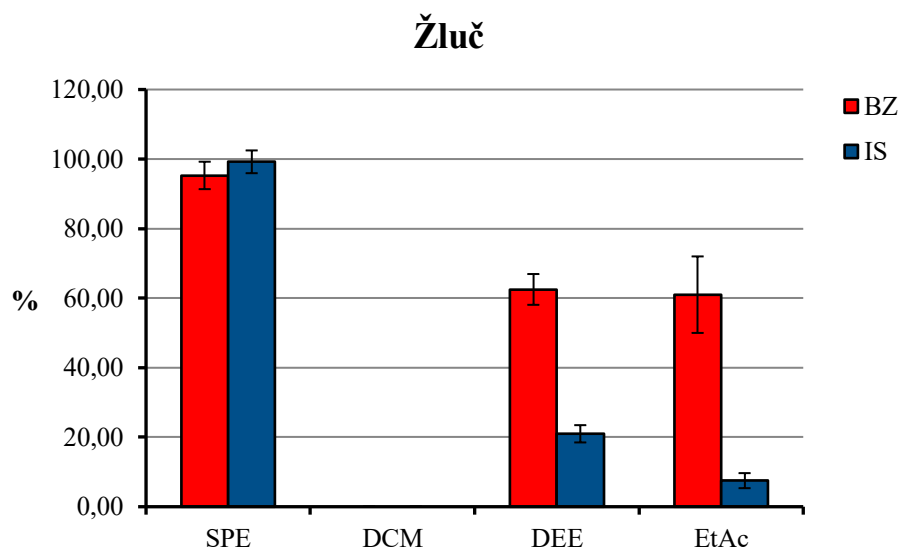
4.1 Optimalizace extrakce tělních tekutin a tkání

Plazma

Metodika pro zpracování vzorků plazmy byla přejata ze článku od Hermana et al., 2020 a proto nebyla prováděna žádná další optimalizace extrakčního procesu.

Žluč

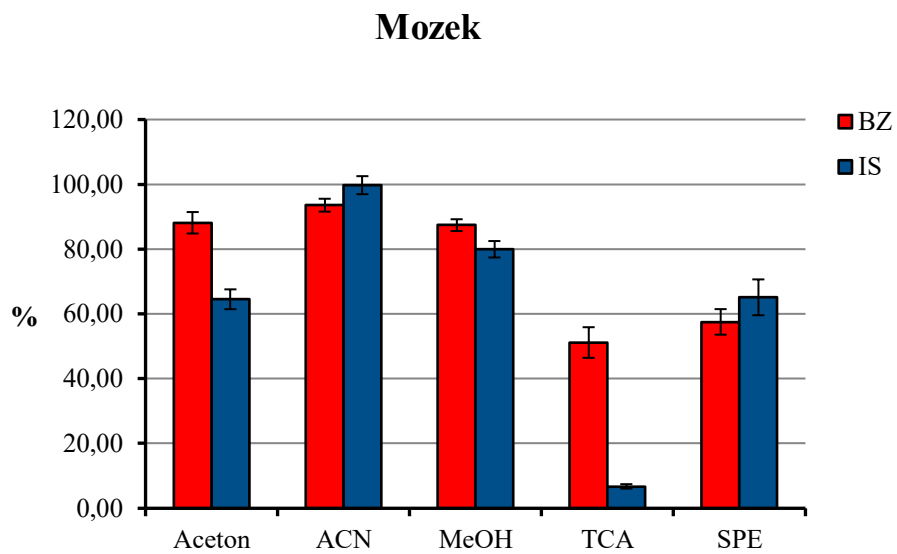
Nejvyšší extrakční výtěžnosti ze žluči pro látku BZ bylo dosaženo pomocí SPE (95,3 %; podmínky viz kapitola 3.4.4). Následovala extrakce pomocí DEE 62,5 %, EtAc 61 % a DCM 0 % (graf 1.).



Graf 1. Výtěžnost extrakce u žlučové tekutiny

Mozek

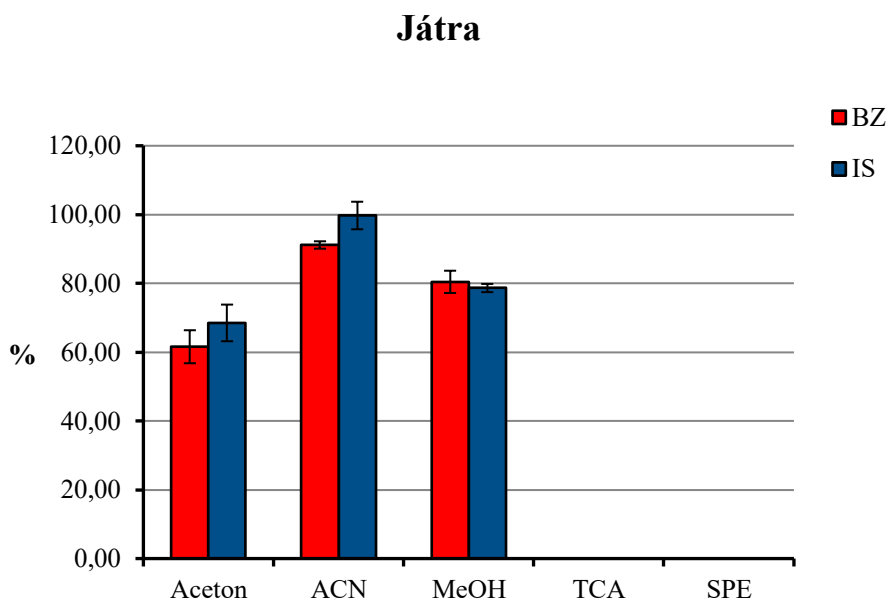
Při optimalizaci extrakce látky BZ z mozkové tkáně bylo nejlepších výsledků dosaženo precipitací ACN (93,56 %; podmínky viz kapitola 3.4.5). Následovala precipitace MeOH (87,40 %), precipitace acetonem (88,1 %), SPE s C-18 kolonkou (57,52 %) a precipitace TCA (51,16 %; graf 2.).



Graf 2. Výtěžnost extrakce u mozkové tkáně

Játra

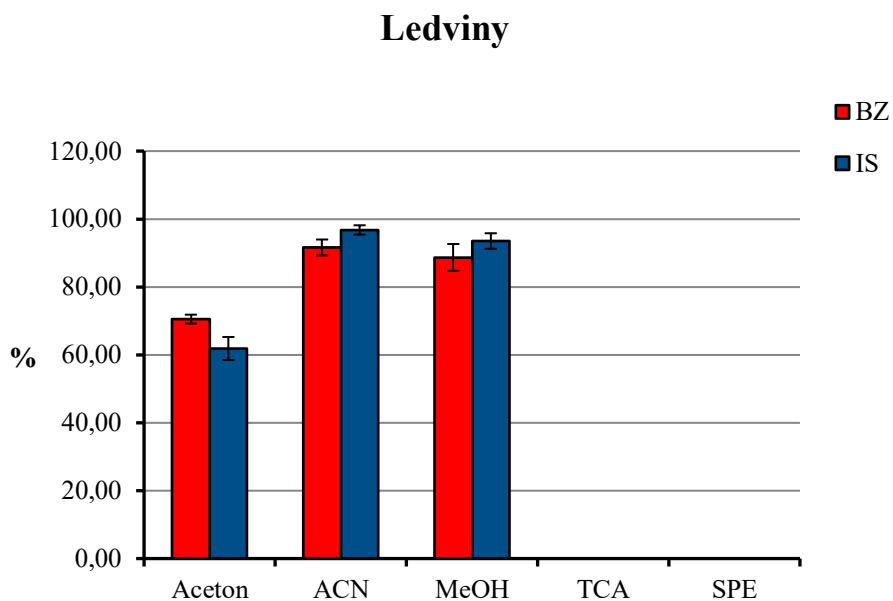
Nejvyšších výsledků při optimalizace extrakce z jaterní tkáně bylo dosaženo precipitací ACN (91,16 %; podmínky viz kapitola 3.4.5). Následovala precipitace MeOH (80,44 %) a acetonem (61,58 %). U precipitace TCA a SPE s C-18 kolonkou byla výtěžnost nulová (graf 3.).



Graf 3. Výtěžnost extrakce u jaterní tkáně

Ledviny

Při optimalizaci extrakce látky BZ z ledvinné tkáně bylo nejvyšší výtěžnosti dosaženo precipitací ACN (91,63 %; podmínky viz kapitola 3.4.5). Následovala precipitace MeOH (88,69 %) a acetonem (70,53 %). Výtěžnost u precipitace TCA a SPE s kolonkou C-18 byla nulová (graf 4.).



Graf 4. Výtěžnost extrakce u ledvinné tkáně

4.2 Validace LC-MS/MS metody pro stanovení látky BZ

Validace LC-MS/MS metody pro stanovení látky BZ v tělních tekutinách a tkáních byla vypracována s ohledem na koncentrační rozmezí odpovídající dávce 2 mg kg^{-1} na základě doporučených postupů dle Evropské lékové agentury (EMA). Vzorky u dávky 10 mg kg^{-1} byly naředěny tak, aby koncentrace látky BZ odpovídaly hladinám pro dávku 2 mg kg^{-1} . Přesnost a preciznost naředěných vzorků byla potvrzena stanovením diluční integrity.

4.2.1 Kalibrační přímky a linearita

Výsledné parametry kalibračních přímek pro jednotlivé druhy biologického materiálu a v daném koncentračním rozsahu jsou uvedeny v tabulce 13. Všechny body splňují podmínky přesnosti a preciznosti stanovení (pro LLOQ $\pm 20 \%$ referenční hodnoty a pro ostatní hladiny $\pm 15 \%$).

Tabulka 13. Parametry kalibrace u tělních tekutin a tkání

| Matrice | Kalibrační přímka | Rozsah kalibrace [ng ml ⁻¹] | R ² | Vážení |
|---------|------------------------------|--|----------------|--------|
| Plazma | $y = 0,02771x - 0,0007188$ | 0,5–1000 | 0,9988 | 1/x |
| Žluč | $y = 0,0004172x - 0,0006611$ | 5–1000 | 0,9981 | 1/x |
| Mozek | $y = 0,01693x - 0,1523$ | 4–512 | 0,9976 | 1/x |
| Játra | $y = 0,03047x - 0,1153$ | 5–2000 | 0,9972 | 1/x |
| Ledviny | $y = 0,02311x - 0,04769$ | 5–2000 | 0,9974 | 1/x |

R² – koeficient determinace

4.2.2 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez kvantifikace (LLOQ) je definována jako hodnota s nejnižší koncentrací analytu ve vzorku, která dosáhla odpovídající preciznosti a přesnosti. Jedná se také o nejnižší hodnotu kalibrační křivky (EMA, 2011). Mez detekce (LOD) je 30 % z LLOQ (Nováková & Douša, 2013b; tabulka 14.)

Tabulka 14. Mez detekce a mez kvantifikace látky BZ u tělních tekutin a tkání

| Matrice | LOD [ng ml ⁻¹] | LLOQ [ng ml ⁻¹] |
|---------|----------------------------|-----------------------------|
| Plazma | 0,2 | 0,5 |
| Žluč | 1,5 | 5 |
| Mozek | 1,2 | 4 |
| Játra | 1,5 | 5 |
| Ledviny | 1,5 | 5 |

4.2.3 Preciznost a přesnost

Preciznost popisuje blízkost opakujících se naměřených hodnot analytu, je vyjádřena jako variační koeficient (CV v %). Přesnost (v %) popisuje blízkost naměřené a referenční hodnoty analytu (EMA, 2011; tabulka 15.)

Tabulka 15. Hodnoty preciznosti a přesnosti látky BZ v tělních tekutinách a tkáních (n = 5)

| Matrice | Koncentrace látky BZ ve validačním standardu [ng ml ⁻¹] | Naměřená hodnota ± SD [ng ml ⁻¹] | CV [%] | Přesnost [%] |
|--|---|--|------------|--------------|
| | | krátkodobá | krátkodobá | krátkodobá |
| | | dlouhodobá | dlouhodobá | dlouhodobá |
| Plazma převzato z (Herman et al., 2020) | 0,500 | 0,501 ± 0,028 | 5,5 | 100,2 |
| | | 0,481 ± 0,026 | 5,4 | 96,2 |
| | 1,50 | 1,50 ± 0,10 | 6,5 | 100,2 |
| | | 1,52 ± 0,08 | 5,4 | 101,1 |
| | 300 | 306 ± 11 | 3,6 | 101,9 |
| | | 297 ± 10 | 3,5 | 99,0 |
| | 800 | 790 ± 66 | 8,3 | 98,7 |
| | | 786 ± 55 | 7,1 | 98,3 |
| Žluč | 5 | 5,03 ± 0,51 | 10,1 | 100,6 |
| | | 5,11 ± 0,33 | 6,4 | 102,2 |
| | 15 | 15,08 ± 0,58 | 3,9 | 100,5 |
| | | 15,00 ± 0,59 | 3,9 | 100,0 |
| | 300 | 302 ± 12 | 3,9 | 100,6 |
| | | 307 ± 19 | 6,0 | 102,3 |
| | 800 | 790 ± 29 | 3,6 | 98,75 |
| | | 802 ± 22 | 2,7 | 100,25 |

| | | | | |
|---------|------|--------------|-----|--------|
| Mozek | 4 | 4,23 ± 0,27 | 6,4 | 105,75 |
| | | 4,12 ± 0,22 | 5,4 | 103,0 |
| | 12 | 11,85 ± 0,74 | 6,2 | 98,75 |
| | | 12,28 ± 0,65 | 5,3 | 102,3 |
| | 200 | 206 ± 16 | 7,6 | 103,0 |
| | | 203 ± 14 | 6,9 | 101,5 |
| | 400 | 401 ± 25 | 6,3 | 100,25 |
| | | 406 ± 19 | 4,7 | 101,5 |
| Játra | 5 | 5,23 ± 0,38 | 7,2 | 104,6 |
| | | 5,26 ± 0,44 | 8,3 | 105,2 |
| | 15 | 15,46 ± 0,54 | 3,5 | 103,1 |
| | | 15,11 ± 0,74 | 4,9 | 100,7 |
| | 600 | 613 ± 13 | 2,2 | 102,2 |
| | | 609 ± 16 | 2,6 | 101,5 |
| | 1500 | 1501 ± 97 | 6,5 | 100,1 |
| | | 1489 ± 64 | 4,3 | 99,3 |
| Ledviny | 5 | 5,14 ± 0,42 | 8,1 | 102,8 |
| | | 5,01 ± 0,33 | 6,5 | 100,2 |
| | 15 | 14,88 ± 0,78 | 5,3 | 99,2 |
| | | 15,20 ± 0,79 | 5,2 | 101,3 |
| | 600 | 609 ± 23 | 3,7 | 101,5 |
| | | 614 ± 30 | 4,8 | 102,3 |
| | 1500 | 1507 ± 64 | 4,2 | 100,5 |
| | | 1512 ± 53 | 3,5 | 100,8 |

SD – směrodatná odchylka; hodnoty preciznosti a přesnosti nepřesahují ± 20 % u LLOQ a ± 15 % u ostatních koncentračních hladin.

4.2.4 Matricový efekt

Matricový efekt popisuje vliv složení vzorku / biologického materiálu na ionizaci analytu a citlivost metody (Klapková et al., 2011). Měření bylo vyhodnoceno pomocí porovnání vodného roztoku látky BZ (včetně IS) a vzorků blankové matrice, ke které byly látka BZ a roztok IS přidány ve 2 koncentračních hladinách po provedení precipitace blankové matrice.

Měření látky BZ a IS v tělních tekutinách a tkáních je lehce ovlivněno matricovým efektem, který však nepředstavuje limitující faktor pro měření, poněvadž rozptyl nepřesahuje 15 % (tabulka 16.).

Tabulka 16. Hodnoty matricového efektu látky BZ a IS (n = 3)

| Matrice | Koncentrace látky BZ ve validačním standardu [ng ml ⁻¹] | Matrix efekt (látka BZ) | Matrix efekt (IS) | IS – normal. hodnota matrix efektu ± rozptyl |
|---------|---|-------------------------|-------------------|--|
| Plazma | 1 | 1,12 | 1,12 | 1,01 ± 9,7 % |
| | 950 | 1,11 | 1,10 | 1,00 ± 1,6 % |
| Žluč | 15 | 1,01 | 1,01 | 1,00 ± 2,6 % |
| | 950 | 1,01 | 1,02 | 1,00 ± 3,5 % |
| Mozek | 12 | 1,09 | 1,08 | 1,01 ± 5,5 % |
| | 450 | 1,10 | 1,08 | 1,02 ± 2,2 % |
| Játra | 15 | 1,06 | 1,04 | 1,01 ± 2,5 % |
| | 1900 | 1,05 | 1,05 | 1,00 ± 3,8 % |
| Ledviny | 15 | 1,13 | 1,12 | 1,01 ± 2,7 % |
| | 1900 | 1,09 | 1,09 | 1,01 ± 3,6 % |

4.2.5 Diluční integrita

Na minimálně 5 koncentračních hladinách v blankové matrici, s jednou hodnotou přesahující koncentraci nejvyšší hodnoty v kalibraci, byla po naředění stanovena preciznost a přesnost (EMA, 2011; tabulka 17.). Naředění vzorků by nemělo ovlivňovat stanovení látky BZ ($\pm 15\%$).

Tabulka 17. Hodnoty diluční integrity látky BZ (n = 3)

| Matrice | Koncentrace látky BZ ve validačním standardu [ng ml ⁻¹] | Naměřená hodnota \pm SD [ng ml ⁻¹] | Preciznost [%] | Přesnost [%] |
|------------------------|---|--|----------------|--------------|
| Plazma ředění 1 : 1 | 1 | 0,965 \pm 0,07 | 7,4 | 96,5 |
| | 5 | 5,09 \pm 0,44 | 8,7 | 101,7 |
| | 50 | 52,06 \pm 0,99 | 1,9 | 104,1 |
| | 250 | 267,1 \pm 6,7 | 2,5 | 106,8 |
| | 500 | 499,4 \pm 12,2 | 2,4 | 99,9 |
| | 2000 | 1 997 \pm 83 | 4,1 | 99,8 |
| Mozek ředění 1 : 9 | 40 | 39,59 \pm 1,02 | 2,6 | 99 |
| | 80 | 78,54 \pm 1,22 | 1,6 | 98,2 |
| | 160 | 155,17 \pm 3,31 | 2,1 | 97 |
| | 320 | 312,5 \pm 1,3 | 0,4 | 97,7 |
| | 640 | 657,9 \pm 4,4 | 0,7 | 102,8 |
| | 1280 | 1 301,9 \pm 5,9 | 0,5 | 101,7 |
| Játra ředění 1 : 9 | 500 | 507,6 \pm 19,6 | 3,9 | 101,5 |
| | 1000 | 1 047,8 \pm 50,0 | 4,8 | 104,8 |
| | 2500 | 2495 \pm 28 | 1,1 | 99,8 |
| | 5000 | 4 955 \pm 114 | 2,3 | 99,1 |
| | 10000 | 10 649 \pm 487 | 4,6 | 106,5 |
| | 20000 | 20 568 \pm 304 | 1,5 | 102,8 |

| | | | | |
|-------------------------|-------|--------------|-----|-------|
| Ledviny ředění 1 : 9 | 500 | 494,5 ± 4,6 | 0,9 | 98,9 |
| | 1000 | 980,5 ± 17,9 | 1,8 | 98 |
| | 2500 | 2 588 ± 88 | 3,4 | 103,5 |
| | 5000 | 5 091 ± 93 | 1,8 | 101,8 |
| | 10000 | 10 215 ± 340 | 3,3 | 102,2 |
| | 20000 | 19 555 ± 84 | 0,4 | 97,8 |

4.2.6 Carry-over efekt

Pro zamezení přenosu hmoty mezi nástřiky bylo nezbytné zahrnout do metodiky opláchnutí injekční jehly 6 ml 30% MeOH po každém nástřiku (Herman et al., 2020).

4.3 Farmakokinetika látky BZ v tělních tekutinách a tkáních

4.3.1 Farmakokinetické parametry látky BZ v plazmě a mozku

Farmakokinetické parametry byly spočítány pro plazmu, která distribuuje látku BZ po těle, a mozek, jako orgán zájmu studie (tabulka 18.).

Tabulka 18. Farmakokinetické parametry u tělní tekutiny – plazma (A) a tělní tkáň – mozek (B). Výsledek je průměr z 6 hodnot \pm SD.

A

| Plazma | Látka BZ | |
|---|-----------------------|------------------------|
| | 2 mg kg ⁻¹ | 10 mg kg ⁻¹ |
| Dávka | | |
| C _{max} [ng ml ⁻¹] | 204,5 \pm 22,6 | 2 185,5 \pm 190,0 |
| T _{max} [min] | 3,0 \pm 0,5 | 2,7 \pm 0,3 |
| AUC total [min ng ml ⁻¹] | 6 580,4 \pm 1 292,9 | 34 658,7 \pm 4 974,4 |
| λ_z [l min ⁻¹] | 0,010 \pm 0,001 | 0,011 \pm 0,002 |
| Poločas [min] | 67,9 \pm 3,4 | 96,6 \pm 27,9 |
| MRT [min] | 58,6 \pm 2,49 | 41,3 \pm 6,3 |
| Cl [ml min ⁻¹ kg ⁻¹] | 354,88 \pm 45,58 | 333,2 \pm 62,3 |
| Vd [l kg ⁻¹] | 34,14 \pm 4,06 | 45,5 \pm 12,9 |

B

| Mozek | Látka BZ | |
|--|-------------------------|--------------------------|
| | 2 mg kg ⁻¹ | 10 mg kg ⁻¹ |
| Dávka | | |
| C _{max} [ng g ⁻¹] | 301,4 \pm 41,6 | 2 684,7 \pm 396,6 |
| T _{max} [min] | 13,0 \pm 11,5 | 6,0 \pm 3,2 |
| AUC total [min ng g ⁻¹] | 61 507,3 \pm 25 271,7 | 133 041,3 \pm 32 970,7 |
| λ_z [l min ⁻¹] | 0,003 \pm 0,003 | 0,007 \pm 0,001 |
| Poločas [min] | 506,6 \pm 359,5 | 100,1 \pm 12,8 |

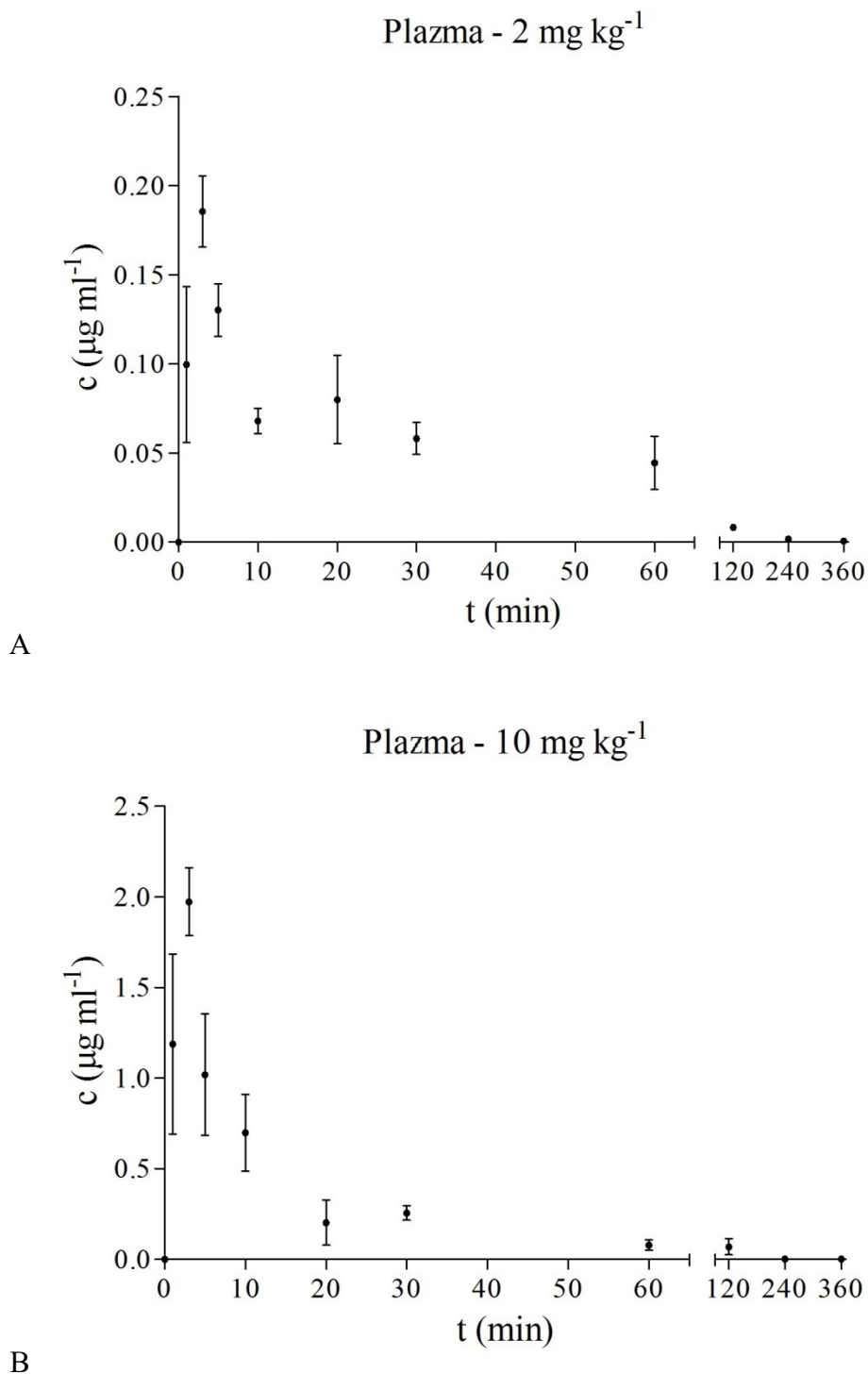
AUC total – plazmatická koncentrace látky BZ v závislosti na čase, plocha pod křivkou

λ_z – konstanta eliminace

MRT – průměrný retenční čas

4.3.2 Plazma

Nejvyšší hodnota koncentrace látky BZ v plazmě byla stanovena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg^{-1} $c = 0,1856 \pm 0,018 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, dávka 10 mg kg^{-1} $c = 1,973 \pm 0,171 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; graf 5.).

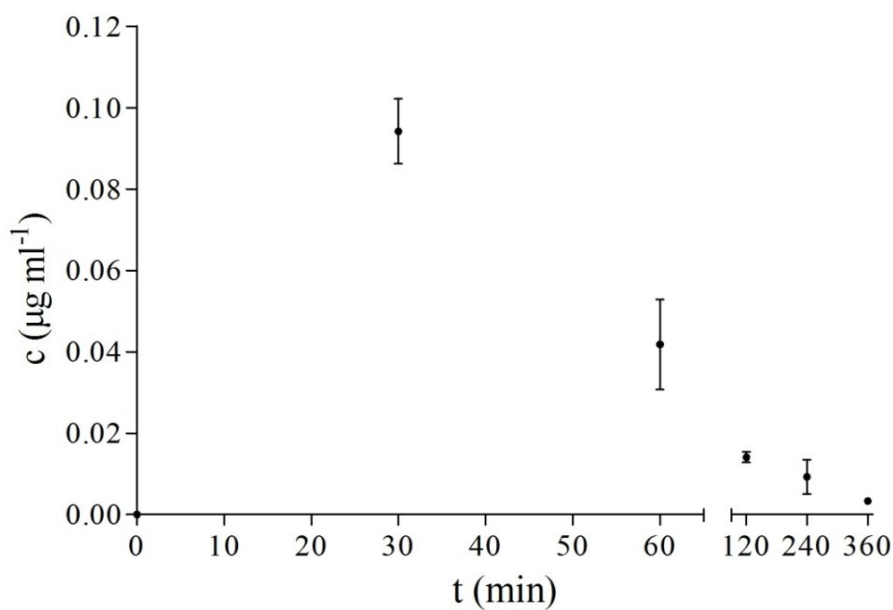


Graf 5. Farmakokinetické body látky BZ v plazmě při dávce 2 mg kg^{-1} (A) a při dávce 10 mg kg^{-1} (B). Výsledek je průměr z 6 hodnot \pm SEM a vztažen na mililitr tekutiny.

4.3.3 Žluč

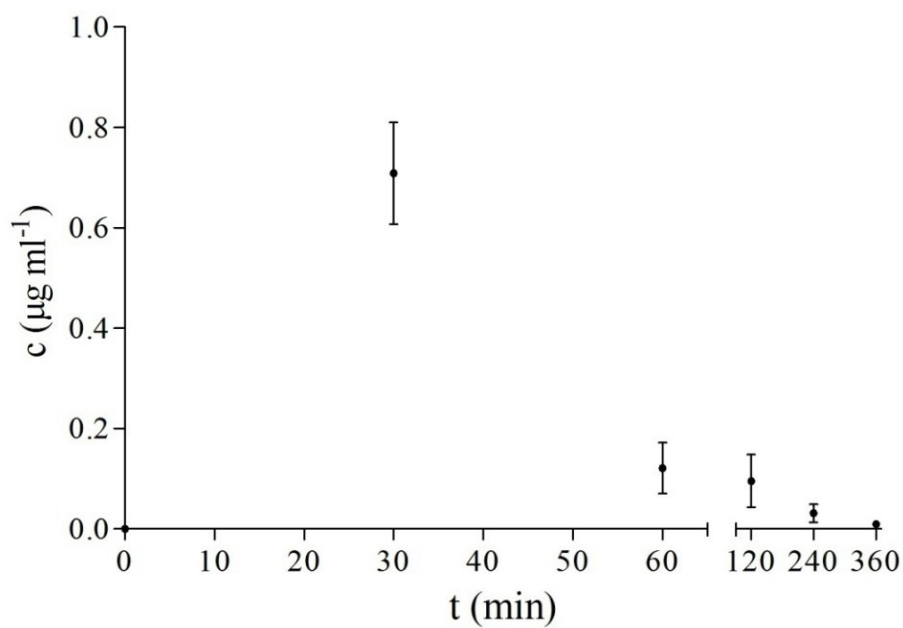
Vzorky žluči byly odebrány od 30. minuty. Nejvyšší hodnota koncentrace látky BZ byla naměřena ve vzorcích odebraných ve 30. minutě (dávka 2 mg kg^{-1} $c = 0,094 \pm 0,007 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, dávka 10 mg kg^{-1} $c = 0,709 \pm 0,083 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; graf 6).

Žluč - 2 mg kg^{-1}



A

Žluč - 10 mg kg^{-1}

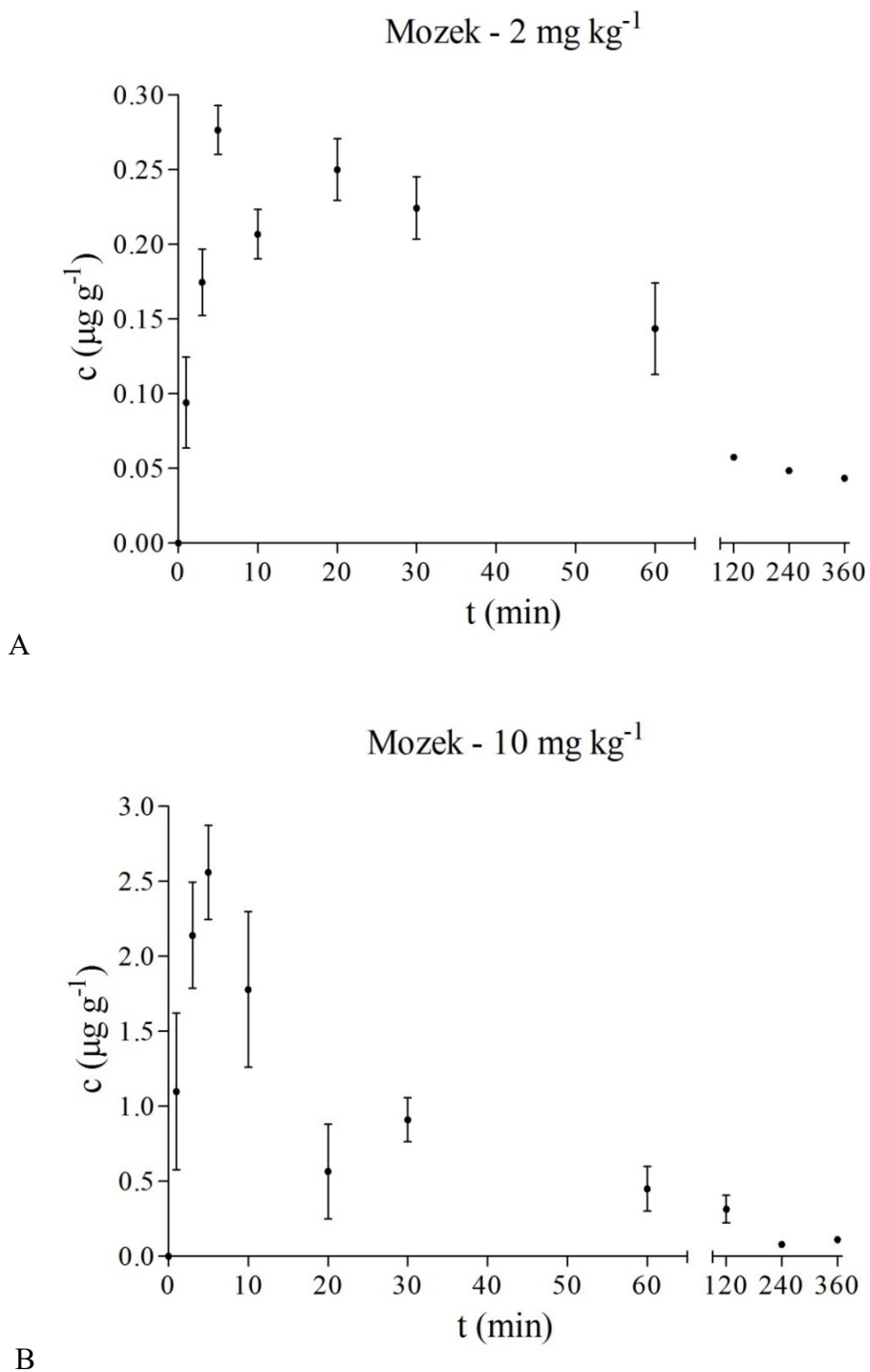


B

Graf 6. Farmakokinetické body látky BZ ve žluči při dávce 2 mg kg^{-1} (A) a při dávce 10 mg kg^{-1} (B). Výsledek je průměr z 3 hodnot \pm SEM a vztažen na mililitr tekutiny.

4.3.4 Mozek

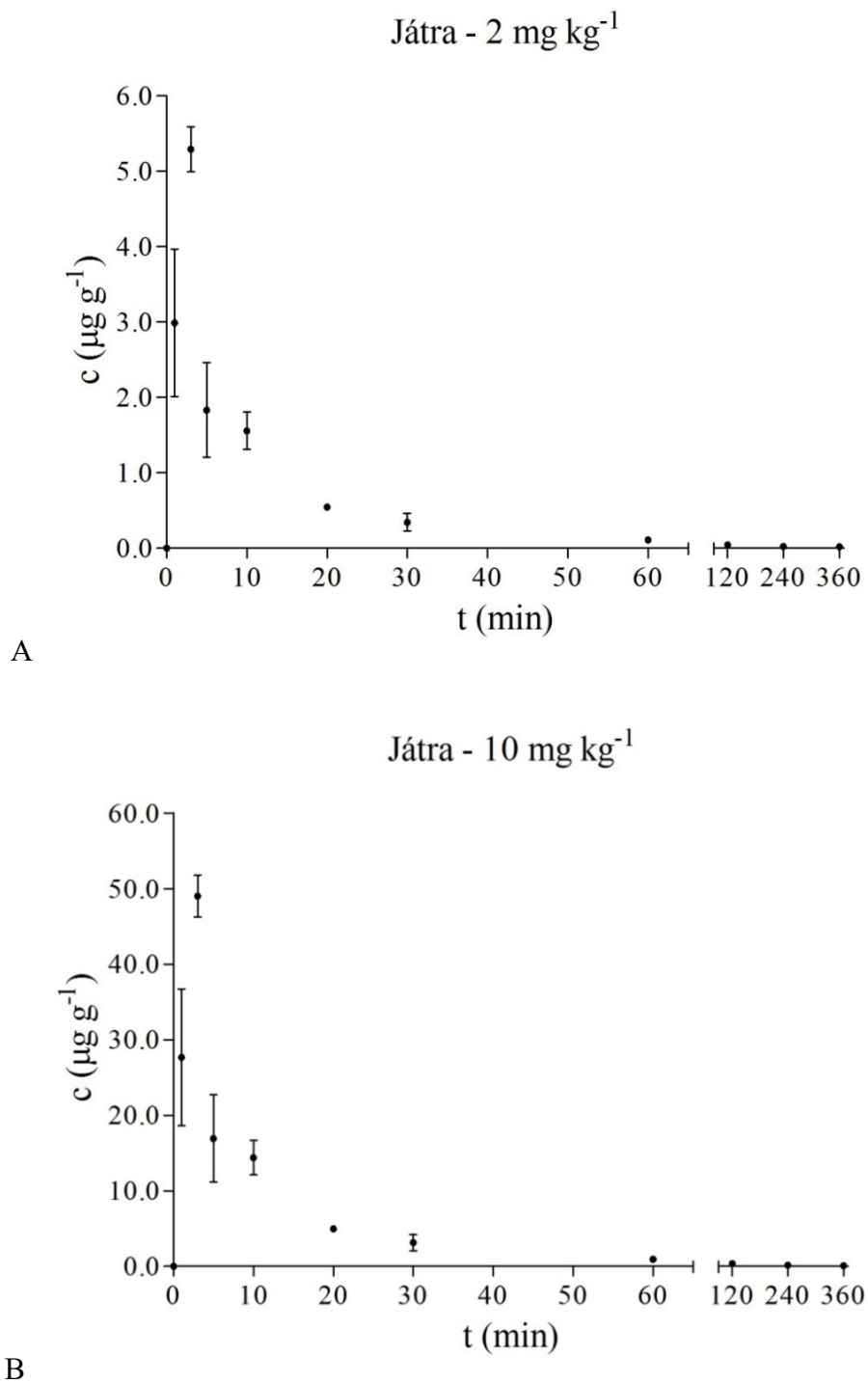
Maximální koncentrace látky BZ v mozkové tkáni byla naměřena ve vzorcích odebraných v 5. minutě (dávka 2 mg kg^{-1} $c = 0,277 \pm 0,015 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, dávka 10 mg kg^{-1} $c = 2,560 \pm 0,221 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$; graf 7.).



Graf 7. Farmakokinetické body látky BZ v mozku při dávce 2 mg kg^{-1} (A) a při dávce 10 mg kg^{-1} (B). Výsledek je průměr z 6 hodnot \pm SEM a vztažen na gram tkáně.

4.3.5 Játra

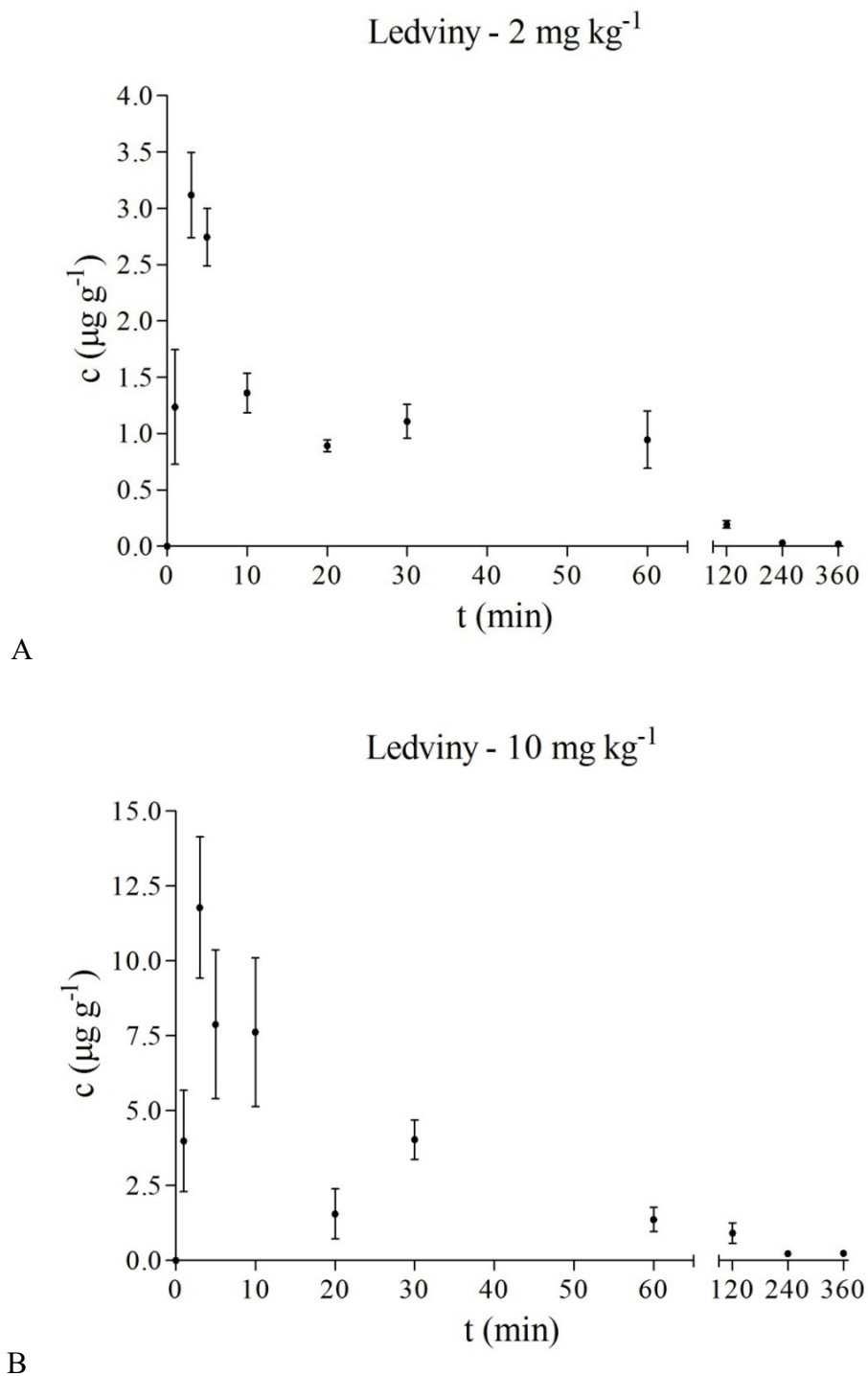
Maximální koncentrace látky BZ v játrech byla stanovena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg^{-1} $c = 5,294 \pm 0,274 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, dávka 10 mg kg^{-1} $c = 49,011 \pm 2,537 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$; graf 8.).



Graf 8. Farmakokinetické body látky BZ v játrech při dávce 2 mg kg^{-1} (A) a při dávce 10 mg kg^{-1} (B). Výsledek je průměr z 6 hodnot \pm SEM a vztažen na gram tkáně.

4.3.6 Ledviny

Nejvyšší hodnoty koncentrace látky BZ v ledvinách byly stanoveny ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (dávka 2 mg kg^{-1} $c = 3,119 \pm 0,345 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, dávka 10 mg kg^{-1} $c = 11,782 \pm 2,147 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$; graf 9.).



Graf 9. Farmakokinetické body látky BZ v ledvinách při dávce 2 mg kg^{-1} (A) a při dávce 10 mg kg^{-1} (B). Výsledek je průměr z 6 hodnot \pm SEM a vztažen na gram tkáně.

5 Diskuze

Látku BZ je možné detekovat pomocí barevných reakcí přímo na bojišti nebo v polních chemických laboratořích, využívají se zde barviva bromkresolová zeleň nebo brompyrogallolová červeně v kyselém prostředí, vzniklý iontový pár z látky BZ a barviva je extrahován do organického rozpouštědla (Halámek et al., 2009). Nevýhodou těchto reakcí je nízká senzitivita, tudíž nejsou vhodné pro testování v biologických matricích (Herman, et al., 2020).

V 60. letech minulého století byla pro potřeby americké armády vyvinuta spektrofotometrická metoda detekce látky BZ v plné krvi a moči. Angelis et al., 1975 detekoval látku BZ v myší krvi pomocí plynové chromatografie. Nevýhodou metody je složitá a časově náročná úprava vzorků (alkalická extrakce do DEE, oddělení kyseliny benzilové, její následná oxidace manganistanem draselným na detekovatelný benzofenon) zároveň není dostatečně senzitivní pro dávky nižší než 10 mg kg^{-1} , které jsou v současnosti používány ve farmakologických modelech kognitivních poruch (Misik et al., 2016). Doposud jediná publikovaná vysoce citlivá metoda detekce látky BZ v plazmě je založena na chromatografické analýze s hmotnostní detekcí (Herman et al., 2020). Výsledky této studie však neposkytují kompletní informace o farmakokinetickém profilu látky BZ, neboť je zde zvoleno široké časové rozmezí pro odběr vzorků, kdy je první odběr v 5. minutě (maximální naměřená koncentrace látky BZ dle Hermana et al., 2020) a 2. odběr v 15. minutě po podání látky BZ do organismu. Z této studie není jasné, zda látka BZ dosáhla koncentračního maxima v čase před nebo po prvním odběru. Pro přesnější vyhodnocení distribuce látky BZ *in vivo* bylo proto nutné vyvinout vysoce citlivou analytickou metodu nejen pro vzorky plazmy, ale i mozek, eliminační tkáň a žluč.

5.1 Optimalizace extrakce tělních tekutin a tkání

Při vývoji nové metody pro zpracování biologických matric obsahujících látku BZ bylo nutné dostatečně optimalizovat extrakční proces, aby bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti. Metodika zpracování vzorků plazmy pomocí SPE poskytující dostatečnou výtěžnost byla přejata od Hermana et al., 2020. V závislosti na velkém počtu vzorků z *in vivo* experimentu bylo zároveň zámyslem vyvinout a optimalizovat časově méně náročnou metodu zpracování žluči a tělních tkání.

Dosud publikované způsoby zpracování žlučové tekutiny pro HPLC obsahující anticholinergní látku (například tropanové alkaloidy: atropin nebo skopolamin, jenž mají strukturální podobu s látkou BZ) jsou zaměřeny na SPE s C18 kolonkou a LLE úpravy (Xu et al., 2008a; Xu et al., 2018b; Claessens et al., 1983). Námi provedená optimalizace extrakce zahrnovala SPE a LLE. Nejlepší výtěžnosti dosáhly vzorky upravené SPE s kolonkou C-18 s elucí do 1 ml MeOH. V průběhu optimalizace LLE u žluči byl oproti dříve publikovaným metodám pozměněn objem extrakčního činidla z $2 \times 1,5$ ml na 0,5 a 2 násobek, což však nevedlo k výrazně lepším výsledkům výtěžnosti.

K navození poruch kognitivních funkcí se v medicíně využívá také anticholinergní látka skopolamin, která je strukturálně podobná látce BZ (Klinkenberg & Blokland, 2010). Publikované metody detekce skopolaminu v mozkové tkáni se zaměřují na plynovou chromatografii (Deutsch et al., 1990) a kapalinovou chromatografii (Vora et al., 1983), například s využitím membránové filtrace, kdy jsou dle Cornelissen et al., 2020 z odstředěného homogenátu odstraněny velké molekuly přesahující rozměr 10 kDa včetně proteinů. Námi zvolená metodika zpracování mozkové tkáně byla precipitace pomocí ACN, která dosahovala vyšší výtěžnosti oproti precipitaci acetonem, MeOH, TCA a SPE úpravě (podmínky pro SPE stanoveny dle Hermana et al., 2020). Během optimalizace extrakce mozkové tkáně byly vyzkoušeny různé poměry homogenátu a ACN (1 : 1; 1 : 2; 1 : 4), nejlepších výsledků bylo dosaženo poměrem 1 : 4 homogenátu s ACN.

Zpracování eliminačních orgánů (játra, ledviny) po homogenizaci pro analytickou detekci s využitím HPLC se v dosud zveřejněných publikacích orientuje na precipitaci silnou kyselinou TCA (Zdarova Karasova et al., 2017), popřípadě s kombinací LLE (Atack et al., 1992). Námi zvolené techniky při optimalizace extrakce látky BZ z eliminačních orgánů zahrnovaly SPE dle podmínek Hermana et al., 2020, dále precipitaci s acetonem, MeOH, ACN a TCA. Oproti uveřejněným publikacím viz výše, nám precipitace silnou kyselinou poskytovala nulovou výtěžnost. Podobně jako u mozkové tkáně byly vyzkoušeny i jiné poměry homogenátu a ACN. Precipitace ACN dosahovala nejlepších výsledků v poměru homogenát : ACN 1 : 4.

5.2 Validace LC-MS/MS metody pro stanovení látky BZ

Podmínky chromatografické separace byly přejaty dle Hermana et al., 2020. Pro validaci LC-MS/MS metody byly připraveny vzorky dle výsledků z optimalizací extrakce u tělních tekutin a tkání. Pro kvantitativní hodnocení látky BZ byla zvolena metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky. Pro svoji strukturální podobnost s látkou BZ byl zvolen za vnitřní standard atropin (chemická látka dobře oddělitelná od analytu, v jehož blízkosti je eluována a má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti), který splňoval podmínky pro spolehlivou analýzu (Klapková et al., 2011; Nováková & Douša, 2013b).

Pracovní postupy přípravy vzorků tělních tekutin a tkání splňovaly vybraná kritéria validace dle EMA. V průběhu validačního procesu nebylo provedeno měření stability látky BZ, informace ohledně její stability byly přejaty z Hermana et al., 2020, kdy koncentrace látky BZ při stabilitní studii byla odchýlena maximálně $\pm 15\%$ z nominální hodnoty při krátkodobém (2 hod při pokojové teplotě), dlouhodobém (30 dní při 80 °C) a po úpravě modelu skladování (24 hod při 8 °C v autosampleru).

Na základě splnění podmínek validace byly tyto metody úspěšně aplikovány na reálné vzorky pocházející z *in vivo* experimentu na potkanech. Vzhledem k tomu, že látka BZ byla detekována v koncentracích vyšších než LLOQ ve všech biologických vzorcích a ve všech časových intervalech s požadovanou přesností a precizností, lze pokládat výsledné extrakční techniky jako dostatečně efektivní a vhodné pro použití v dané farmakokinetické studii.

5.3 Farmakokinetika látky BZ v tělních tekutinách a tkáních

Na základě publikace zaměřené na citlivou detekci látky BZ v plazmě po i. m. aplikaci (Herman et al., 2020) bylo možné lépe definovat požadavky na časový odběr vzorků při *in vivo* experimentu na potkanech kmenu Wistar. Pro stanovení celkového farmakokinetického profilu látky BZ byly dále odebrány mozek, eliminační tkáně (játra, ledviny) a žluč.

Dle Angelis et al., 1975, kde byla myším podaná látka BZ v dávce 40 mg kg⁻¹, byla maximální koncentrace látky BZ v plazmě naměřena v 7. minutě po aplikaci. Podobně tomu bylo i dle Hermana et al., 2020, kde bylo po i. m. podání dávek

2 a 10 mg kg⁻¹ látky BZ dosaženo koncentračního maxima v 5. minutě po aplikaci (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,15 µg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 1,03 µg ml⁻¹). Naše nově získaná data o maximálních koncentracích látky BZ v plazmě odpovídají již dříve publikovaným informacím. Maximální koncentrace látky BZ v plazmě *in vivo* experimentu byla naměřena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě nezávisle na podané dávce (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,2 µg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 1,9 µg ml⁻¹). Ačkoliv byla maximální koncentrace látky BZ v plazmě nalezena již po 3 minutách od aplikace, bylo ji možné detekovat i po 6 hodinách od aplikace. Látka BZ po svém i. m. tedy velmi rychle proniká do systémové cirkulace a díky svým lipofilním vlastnostem snadno prostupuje přes biologické bariéry. Stejný trend ohledně rychlosti dosažení koncentračního maxima byl pozorován také ve vzorcích jaterní (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 5,3 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 49,0 µg g⁻¹) a ledvinné tkáně (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 3,1 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 11,8 µg g⁻¹). První vzorky žluči byly odebírány až po 30. minutě od podání látky BZ, kdy byla látka BZ podle odebraných vzorků v maximu (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,1 µg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 0,7 µg ml⁻¹). Naměřené koncentrace látky BZ jak v játrech, tak v ledvinách, značí dvojí cestu vylučování této látky z organismu. V tuto chvíli však žádná data ohledně degradace látky BZ *in vivo* a popisující vzniklé produkty metabolismu nejsou k dispozici. U mozkové tkáně byla maximální koncentrace látky BZ naměřena ve vzorcích odebraných v 5. minutě, opět nezávisle na dávce (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,3 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 2,6 µg g⁻¹). Pokud porovnáme maximální koncentrace nalezené v plazmě a v mozkové tkáni (viz tabulka 18.), tak můžeme usoudit, že látka BZ dobře proniká přes HEB do mozku, kde je její hlavní centrum působení. Vzhledem k tomu, že již při aplikaci dávky 2 mg kg⁻¹ dochází k významnému ovlivnění kognitivních funkcí, lze předpokládat, že koncentrace v mozku potřebná pro vyvolání takového účinku se řádově pohybuje v desetínách až jednotkách µg g⁻¹ mozkové tkáně.

6 Závěr

Kromě potenciálního vojenského použití našla látka BZ své uplatnění i ve farmakologických modelech Alzheimerovy choroby. Díky svému anticholinergnímu působení dokáže navodit symptomy tohoto onemocnění *in vivo* a umožňuje tak testování nových potenciálních léčiv v rámci preklinického výzkumu. Avšak dosud nebyla uvedena publikace týkající se farmakokinetiky látky BZ a její distribuce do tkání.

V rámci řešení této diplomové práce byla úspěšně optimalizována extrakce látky BZ z tělních tekutin (plazma, žluč) a tkání (mozek, játra, ledviny). Dále byly tyto analytické metody zpracování vzorků validovány dle podmínek EMA a uplatněny v *in vivo* experimentu. Maximální koncentrace látky BZ v plazmě, játrech a ledvinách byla naměřena ve vzorcích odebraných ve 3. minutě (plazma: dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,2 µg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 1,9 µg ml⁻¹; játra: dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 5,3 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 49,0 µg g⁻¹; ledviny: dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 3,1 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 11,8 µg g⁻¹). U mozkové tkáně, která je hlavní zájmovou tkání, tomu bylo ve vzorcích odebraných v 5. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ ~ 0,3 µg g⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ ~ 2,6 µg g⁻¹) po i. m. látky BZ. Maximální koncentrace látky BZ ve žlučové tekutině bylo naměřeno ve vzorcích odebraných ve 30. minutě (dávka 2 mg kg⁻¹ c = 0,094 ± 0,007 µg ml⁻¹, dávka 10 mg kg⁻¹ c = 0,709 ± 0,083 µg ml⁻¹).

Znalost časového průběhu a distribuce látky BZ *in vivo* dále významně poslouží při budoucím vytváření farmakologických modelů Alzheimerovi nemoci na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Univerzity Obrany, a to zejména při stanovení optimální dávky látky BZ zvířatům a nastavení časového rozmezí pro aplikaci potenciálního léčiva. Ve snaze objasnit další osud látky BZ v organismu budou také dále stanoveny a studovány její metabolity a jejich možné účinky.

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1. Skupiny BOL dle jejich mechanismu účinku..... | 15 |
| Tabulka 2. Fáze průběhu intoxikace po požití látky BZ | 20 |
| Tabulka 3. Extrakční rozpouštědla a silné kyseliny používané při PP..... | 26 |
| Tabulka 4. Typy rozpouštědel u LLE..... | 29 |
| Tabulka 5. Rozdělení SPE produktů podle analytu | 30 |
| Tabulka 6. Přehled, selektivita a citlivost detektorů | 37 |
| Tabulka 7. MS/MS parametry pro IS a látku BZ..... | 43 |
| Tabulka 8. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro přípravu kalibračních standardů..... | 47 |
| Tabulka 9. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro vyhodnocení preciznosti a přesnosti | 48 |
| Tabulka 10. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro vyhodnocení matricových efektů..... | 49 |
| Tabulka 11. Koncentrace vodných roztoků látky BZ pro vyhodnocení matricového efektu | 49 |
| Tabulka 12. Koncentrace látky BZ v biologických matricích pro vyhodnocení diluční integrity..... | 50 |
| Tabulka 13. Parametry kalibrace u tělních tekutin a tkání | 55 |
| Tabulka 14. Mez detekce a mez kvantifikace látky BZ u tělních tekutin a tkání | 56 |
| Tabulka 15. Hodnoty preciznosti a přesnosti látky BZ v tělních tekutinách a tkáních (n = 5) | 57 |
| Tabulka 16. Hodnoty matricového efektu látky BZ a IS (n = 3)..... | 59 |
| Tabulka 17. Hodnoty diluční integrity látky BZ (n = 3) | 60 |
| Tabulka 18. Farmakokinetické parametry u tělní tekutiny - plazma (A) a tělní tkáň - mozek (B)..... | 62 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1. Chemická struktura látky BZ | 19 |
| Obrázek 2. Struktura 7-MEOTA..... | 20 |
| Obrázek 3. Životní cyklus léčiva (Životní cyklus léku, 2008) | 21 |
| Obrázek 4. Farmakokinetický profil (Pharmacokinetic profile of tacrolimus, 2019)..... | 22 |
| Obrázek 5. Schéma deproteinace (Scheme of precipitation of polyelectrolyte/protein complexes, 2019) | 27 |
| Obrázek 6. Extrakce z kapaliny do kapaliny (Schematic of extraction, 2019)..... | 28 |
| Obrázek 7. Kolonka SPE (Disposable cartridge for SPE, 2012) | 30 |
| Obrázek 8. Schéma SPE – aplikace, vymytí balastů a eluce analytu (SPE bind and elute strategy, 2019)..... | 31 |
| Obrázek 9. Princip separace na analytické koloně (Progress of a column chromatographic separation of a two-component mixture, 2019)..... | 34 |
| Obrázek 10. Blokové schéma HPLC systému (HPLC systems, 2013)..... | 34 |
| Obrázek 11. Schematické znázornění hmotnostního spektrometru | 38 |

Seznam vzorců

| | |
|--|----|
| Vzorec 1. Nernstův distribuční zákon | 27 |
| Vzorec 2. Rovnice distribuční konstanty..... | 33 |

Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1. Výtěžnost extrakce u žlučové tekutiny | 51 |
| Graf 2. Výtěžnost extrakce u mozkové tkáně | 52 |
| Graf 3. Výtěžnost extrakce u jaterní tkáně | 53 |
| Graf 4. Výtěžnost extrakce u ledvinné tkáně..... | 54 |
| Graf 5. Farmakokinetické body látky BZ v plazmě při dávce 2 mg kg ⁻¹ (A) a při dávce 10 mg kg ⁻¹ (B)..... | 63 |
| Graf 6. Farmakokinetické body látky BZ ve žluči při dávce 2 mg kg ⁻¹ (A) a při dávce 10 mg kg ⁻¹ (B)..... | 64 |
| Graf 7. Farmakokinetické body látky BZ v mozku při dávce 2 mg kg ⁻¹ (A) a při dávce 10 mg kg ⁻¹ (B)..... | 65 |
| Graf 8. Farmakokinetické body látky BZ v játrech při dávce 2 mg kg ⁻¹ (A) a při dávce 10 mg kg ⁻¹ (B)..... | 66 |
| Graf 9. Farmakokinetické body látky BZ v ledvinách při dávce 2 mg kg ⁻¹ (A) a při dávce 10 mg kg ⁻¹ (B)..... | 67 |

Seznam použité literatury

ALAMPANOS, V.; SAMANIDOU, V.; PAPADOYANNIS, I. Trends in Sample Preparation for the HPLC Determination of Penicillins in Biofluids. *J. Appl. Bioanal.* **2019**, 5(1), 9-17. DOI: 10.17145/jab.19.003. ISSN 2405710X. Dostupné z: <<https://betasciencepress.com/index.php/jab19003>>.

ANGELIS, K.; BARDODEJ, Z.; SAMCOVA, E.; SRAM, R. J. Studium časového průběhu účinku a hladiny látky BZ a benzilátů po intraperitoneální aplikaci u krys. 1975.

ATAK, J. R.; COOK, S. M.; WATT, A. P.; RAGAN, C. I. Measurement of Lithium-Induced Changes in Mouse Inositol(1)Phosphate Levels in Vivo. *J. Neurochem.* **1992**, 59(5), 1946–1954. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb11031.x.

BAJGAR, J. Bojové otravné látky zneužitelné v civilním sektoru. In: Klement, C. (Ed.) *Mimoriadne udalosti vo verejnom zdravotníctve*. PRO, Banská Bystrica 2011, 206-257.

BAJGAR, J. *Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti*. Nucleus HK, Hradec Králové 2006. Učební texty Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně v Hradci Králové. ISBN 80-862-2575-5.

BENET, L. Z. a ZIA-AMIRHOSSEINI, P. Basic Principles of Pharmacokinetics. *Toxicol. Pathol.* **1995**, 23(2), 115-123. DOI: 10.1177/019262339502300203. ISSN 0192-6233.

CLAESSENS, H. A.; VAN THIEL, M.; WESTRA, P.; SOETERBOEK, A. M. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Galanthamine, a Long-Acting Anticholinesterase Drug, in Serum, Urine and Bile. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1983**, 275, 345–353. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)84380-7.

CORNELISSEN, A. S.; KLAASSEN, S. D.; VAN GRONINGEN, T.; BOHNERT, S.; JOOSEN, M. J. A. Comparative Physiology and Efficacy of Atropine and Scopolamine in Sarin Nerve Agent Poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2020**, 114994. DOI: 10.1016/j.taap.2020.114994.

CVAČKA, J. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. In: *Web.natur.cuni.cz* [online]. 2010 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf?fbclid=IwAR0jjVULBB07-npI1OkLPWaig-ZyyIndIAYmONFnDDFxfj0g70zOAbOCPhcw>>.

DAVIS, I.; WILLIAM E.; LI, Y. Analysis of Hydrazine in Drinking Water by Isotope Dilution Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Derivatization and Liquid-Liquid Extraction. *Anal. Chem.* **2008**, *80*(14), 5449–5453. DOI: 10.1021/ac702536d.

DAYKIN, C. A.; FOXALL P. J. D.; CONNOR S. C.; LINDON J. C.; NICHOLSON J. K. The Comparison of Plasma Deproteinization Methods for the Detection of Low-Molecular-Weight Metabolites by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*(2), 220-230. DOI: 10.1006/abio.2002.5637. ISSN 00032697.

DEUTSCH, J.; SONCRANT, T. T.; GREIG, N. H.; RAPOPORT, S. I. Electron-Impact Ionization Detection of Scopolamine by Gas Chromatography—Mass Spectrometry in Rat Plasma and Brain. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1990**, *528*, 325–331. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)82391-9.

Disposable cartridge for SPE (syringe style). In: *Solid-Phase Extraction* [online]. 2012 [cit. 2019-12-09]. Dostupné z: <<http://www.justchromatography.com/column/solid-phase-extraction>>.

EMA Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf>.

FUSEK, J.; BAJGAR J.; KASSA J.; KUČA K.; JUN D. Psychotomimetic Agent BZ (3-Quinuclidinyl Benzilate). In: *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. 2nd Ed., Elsevier/AP, Boston 2015, s. 151-157. ISBN 0128001593.

GAD, S. C. *Preclinical development handbook: toxicology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2008. ISBN 9780470249048.

GEORGE, R.; HAYWOOD, A.; KHAN, S.; RADOVANOVIC, M.; SIMMONDS, J.; NORRIS, R. Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Ther. Drug Monit.*, **2018**, 40(1), 1-8. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000471.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* [online]. **2010**, 1217(25), 3929-3937 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.060. ISSN 00219673. Dostupné z: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309017397>>.

HALÁMEK, E.; KOBLIHA, Z.; PITSCHMANN, V. Quinuclidin-3-yl diphenylhydroxyacetate, BZ compound. In: *Analysis of Chemical Warfare Agents*. Vyškov: Univerzita Obrany 2009. 131-139.

HANSEN, S. a PEDERSEN-BJERGAARD, S. *Bioanalysis of pharmaceuticals: sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2015. ISBN 11-187-1682-5.

HARVEY, D. *Analytical Chemistry 2.1* — an Open-Access Digital Textbook [online]. 2019. Dostupné z: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey))>.

HENION, J.; BREWER, E.; RULE, G. Peer Reviewed: Sample Preparation for LC/MS/MS: Analyzing Biological and Environmental Samples. *Anal. Chem.* **1998**, 70(19) 650A-656A. DOI: 10.1021/ac981991q.

HERMAN, D.; DLABKOVA, A.; CECHOVA, L.; VANOVA, N.; MISIK, J.; JUN, D.; ZDAROVA KARASOVA, J. Simple validated method of LC-MS/MS determination of BZ agent in rat plasma samples. *Drug Test. Anal.*, **2020**. DOI: 10.1002/dta.2742.

HPLC systems. In: *Opinions Libres - Le blog d' Olivier Ezratty* [online]. 2013 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <<https://www.oezratty.net/wordpress/2012/technologies-sequencage-gnome-humain-3>>.

CHEN, Y.; GUO Z.; WANG X.; QIU Ch. Sample preparation. *J. Chromatogr. A* [online]. **2008**, *1184*(1-2), 191-219 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.026. ISSN 00219673. Dostupné z: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307017700>>.

KASSA, J. *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti bojovým chemickým látkám role 1-4: učební text pro vysokoškolskou výuku*. Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové 2003. Učební texty Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně v Hradci Králové. ISBN 80-851-0968-9.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*(4), 232-244. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00402-3. ISSN 01659936.

KLAPKOVÁ, E., UŘÍNOVSKÁ, R.; PRŮŠA, R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klin. Biochem. Metab.*, **2011**, *19*(40), 5-8.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The Validity of Scopolamine as a Pharmacological Model for Cognitive Impairment: A Review of Animal Behavioral Studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2010**, *34*(8), 1307–1350. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.001.

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Pavel Klouda, Ostrava, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*(1-2), 199-217 DOI: 10.1002/bmc.1560. ISSN 02693879. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.1560>>.

LEE, M. S. *Mass spectrometry handbook*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2012. ISBN 9780470536735.

MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada, Praha 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.

MCDOWALL, R.D.; PEARCE J.C.; MURKITT G.S. Liquid-solid sample preparation in drug analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1986**, 4(1), 3-21. DOI: 10.1016/0731-7085(86)80018-8. ISSN 07317085.

MEDVEDOVICI, A.; BACALUM, E.; DAVID, V. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, 32(1). DOI: 10.1002/bmc.4137. ISSN 02693879.

MISIK, J. MILITARY INCAPACITATING AGENT BZ (3-QUINUCLIDINYL BENZILATE) - PAST, PRESENT AND FUTURE. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2013**, 82(3), 115-119. DOI: 10.31482/mmsl.2013.016. ISSN 03727025.

MISIK, J.; KORABECNY J.; NEPOVIMOVA E.; KRACMAROVA A.; KASSA J. Effects of novel tacrine-related cholinesterase inhibitors in the reversal of 3-quinuclidinyl benzilate-induced cognitive deficit in rats —Is there a potential for Alzheimer's disease treatment? *Neurosci. Lett.* **2016**, 612, 261-268. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.12.021. ISSN 03043940.

MISIK, J.; VANEK J.; MUSILEK K.; KASSA J. Cholinergic antagonist 3-quinuclidinyl benzilate – Impact on learning and memory in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* **2014**, 266, 193-200. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.03.001. ISSN 01664328.

NASSAR, A. F. *Drug metabolism handbook: concepts and applications*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2009. ISBN 9780470439258.

NEUE, U. D.; ALDEN, B. A.; GROVER, E. R.; GRUMBACH, E. S.; IRANETA, P. C.; MÉNDEZ, A. 3 HPLC columns and packings. In: *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Elsevier, 2007, 8(1), 45-83. Separation Science and Technology. DOI: 10.1016/S0149-6395(07)80009-2. ISBN 9780123705402.

NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Lucie Nováková, Praha 2013a. ISBN 978-80-260-4243-3.

NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Lucie Nováková, Praha 2013b. ISBN 978-80-260-4244-0.

NOVÁKOVÁ, L. a VLČKOVÁ, H. A Review of Current Trends and Advances in Modern Bio-Analytical Methods: Chromatography and Sample Preparation. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 656(1–2), 8–35. DOI: 10.1016/j.aca.2009.10.004.

NOVÁKOVÁ, L. Challenges in the Development of Bioanalytical Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Method with Emphasis on Fast Analysis. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1292, 25–37. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.087.

NOVOTNY, L.; MUSILEK, K.; POHANKA, M.; ZDAROVA-KARASOVA, J.; BOSTIK, P.; JUN, D.; KUCA, K. *Introduction to chemical and biological warfare agents*. Dr. Ladislav Novotný, Čeperka 2011. ISBN 978-80-260-0916-0.

PATOČKA, J. *Vojenská toxikologie*. Grada, Praha 2004. ISBN 80-247-0608-3.

Pharmacokinetic profile of tacrolimus. In: *Research Gate* [online]. 2019 [cit. 2019-10-02]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/figure/Pharmacokinetic-profile-of-tacrolimus-AUC-as-parameter-for-total-drug-exposure-and-the_fig6_5900457>.

Progress of a column chromatographic separation of a two-component mixture. In: *Chemistry Libre Texts* [online]. 2019 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_A_General_Theory_of_Column_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_A_General_Theory_of_Column_Chromatography)>.

Schematic of extraction. In: *Chemistry Libre Texts* [online]. 2019 [cit. 2019-11-16]. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_%28Nichols%29/4%3A_Extraction/4.1%3A_Overview_of_Extraction>.

Scheme of precipitation of polyelectrolyte/protein complexes. In: *Application of Calorimetric Techniques in the Formation of Protein-Polyelectrolytes Complexes* [online]. 2019 [cit. 2019-11-17]. Dostupné z: <<https://www.intechopen.com/books/applications-of-calorimetry-in-a-wide-context-differential-scanning-calorimetry-isothermal-titration-calorimetry-and->

microcalorimetry/applications-of-calorimetric-techniques-in-the-formation-of-protein-polyelectrolytes-complexes>.

SLACK, G. C. a SNOW, N. H. 8 HPLC sample preparation. *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Elsevier, 2007, 8, 237-268. Separation Science and Technology. DOI: 10.1016/S0149-6395(07)80014-6. ISBN 9780123705402.

SMITH, R. M. Before the Injection—Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000(1), 3–27. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00511-9.

SOUČKOVÁ, L.; KOSTKOVÁ, H.; DEMLOVÁ, R. Jak se vyvíjí nový lék. *Prakt. lékáren. Solen*, **2015**, 11(4), 144–147. ISSN 1803-5329.

SPE bind and elute strategy. In: *Chemistry Libre Texts* [online]. 2019 [cit. 2019-11-17]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction)>.

SPE Cartridges. In: *Analytcs-shop.com* [online]. 2019 [cit. 2019-12-09]. Dostupné z: <https://www.analytcs-shop.com/gb/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe-cartridges.html>>.

STANAG 2463AmedP-6 (6). Part III, NATO Handbook on the medical aspects of NBC defensive operations.

STŘEDA, L. a PATOČKA, J. Neletální chemické zbraně a Úmluva o zákazu chemických zbraní. *Vojenské zdravotnické listy* 73, 2004, 24–33.

URSO, R.; BLARDI, P.; GIORGI, G. A short introduction to pharmacokinetics. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2002**, 6(2), 33-44. ISSN 1128-3602.

VALÁŠEK, J. *Bojové otravné látky, biologická agens a prostředky individuální ochrany*. Ministerstvo vnitra - generální ředitelství Hasičského záchranného sboru České republiky, Praha 2007. ISBN 978-80-86640-99-0.

VAN EECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of Bioanalytical LC–MS/MS Assays: Evaluation of Matrix Effects. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (23), 2198–2207. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.003.

VANDENBURG, H. J.; CLIFFORD, A. A.; BARTLE, K. D.; ZHU, S. A.; CARROLL, J.; NEWTON, I. D.; GARDEN, L. M. Factors Affecting High-Pressure Solvent Extraction (Accelerated Solvent Extraction) of Additives from Polymers. *Anal. Chem.* **1998**, *70*(9), 1943–1948. DOI: 10.1021/ac9710902.

VORA, M. M.; FINN, R. D.; BOOTHE, T. E.; LISKWOSKY, D. R.; POTTER, L. T. [N-Methyl-11C]-Scopolamine: Synthesis and Distribution in Rat Brain. *J. Label. Compd. Rad* **1983**, *20*(11), 1229–1236. DOI: org/10.1002/jlcr.2580201103.

XU, Q.; DING, L.; LIU, W.-Y.; CHEN, X.-P.; LIU, B.-M. Study of the Metabolites of Bencycloquidium Bromide Racemate, a Novel Anticholinergic Compound, in Rat Bile by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)* **2008a**, *14* (2), 99–105. DOI: 10.1255/ejms.909.

XU, Q.; DING, L.; LIU, W.-Y.; LI, R.-S.; SONG, Q.-X.; CHEN, X.-P. Determination of Bencycloquidium Bromide, a Novel Anticholinergic Compound, in Rat Tissues by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)* **2008b**, *14* (5), 319–327. DOI: 10.1255/ejms.937.

ZDAROVA KARASOVA, J.; KVETINA, J.; TACHECI, I.; RADOCHOVA, V.; MUSILEK, K.; KUCA, K.; BURES, J. Pharmacokinetic Profile of Promising Acetylcholinesterase Reactivators K027 and K203 in Experimental Pigs. *Toxicol. Lett.* **2017**, *273*, 20–25. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.03.017.

Životní cyklus léku. In: *O léčích.cz* [online]. QCM, 2008 [cit. 2019-10-02]. Dostupné z: <<http://www.olecich.cz/encyklopedie/jaky-je-zivotni-cyklus-leciva>>.