

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a validací chromatografických metod vhodných pro hodnocení vybraných biologicky aktivních látek. Vzhledem k dominantnímu postavení metody HPLC ve farmaceutické analýze, byla pro hodnocení analytů zvolena právě tato metoda ve spojení s UV a MS detekcí.

**Teoretická část je zaměřena na použité chromatografické metody a problematiku řešenou v rámci experimentální práce.** Nejprve je uveden stručný přehled všech chromatografických metod a následně je detailněji popsána nejběžnější analytická metoda HPLC. Poté je věnována pozornost hmotnostní spektrometrii, která se v posledních letech stala nepostradatelnou metodou nejen ve farmaceutické analýze. To především díky její vysoké citlivosti a možnosti získat strukturní informace o analytech. Kromě teoretického úvodu a popisu MS instrumentace je pozornost věnována také jejím aplikacím i novým trendům. Další kapitoly se věnují problematice transdermálního podání léčiv, specifikům antiretrovirální terapie a především hodnoceným analytům.

**Experimentální část je zpracována jako komentovaný soubor publikovaných prací a je rozdělena do dvou tematických celků.** První celek tvoří tři práce zaměřené na analytické hodnocení nového akcelerantu transdermální penetrace - transkarbamu 12. Druhý celek je tvořen prací zabývající se analytickým hodnocením antiretrovirotika efavirenz v biologickém materiálu.

**První tematický celek se zabývá vývojem a validací vhodných chromatografických metod pro analytické hodnocení T 12.** Tento nový akcelerant transdermální penetrace se začal na FaF UK vyvíjet v 90. letech, a v roce 2001 byl patentován. Hlavním podnětem, jenž tento výzkum inicioval, bylo omezené množství v klinické praxi užívaných transdermálních akcelerantů. V podstatě jediným, široce používaným a účinným akcelerantem, je od roku 1976 Azon<sup>®</sup>. Zavedení nového, vysoce účinného, akcelerantu tak představuje možnost rozšíření aplikací pro transdermální podání léčiv, které je výhodnou alternativou oproti ostatním, běžně užívaným, formám podání léčiv.

Vzhledem k absenci jakékoli analytické metody pro hodnocení T 12, bylo pro jeho zavedení do farmaceutické praxe nezbytné vyvinout a zvalidovat chromatografické metody, které by umožnily hodnocení čistoty a stability této látky. V pilotní studii byla jako první vyvinuta rychlá, jednoduchá a finančně nenáročná metoda TLC, která umožnila separovat T 12 od jeho dvou hydrolytických rozkladných produktů 6-aminohexanové kyseliny (AH) a dodekanolu (D). Vzhledem k absenci chromoforu ve struktuře T 12, i jeho degradačních produktů AH a D, musela být před vlastní analýzou vždy provedena derivatizace pomocí

benzoyl chloridu. V rámci pilotní studie byla vyvinuta také metoda HPLC/UV, která umožnila separaci T 12 od derivatizačního činidla resp. vedlejších produktů derivatizace. Další experimentální práce byla zaměřena na vývoj nové HPLC/UV metody, která umožnila hodnocení T 12 i rozkladných produktů AH a D. Protože dříve vyvinutý postup derivatizace neumožnil dosáhnout dostatečné citlivosti analýzy, bylo vybráno nové derivatizační činidlo (3,5-dinitrobenzoyl chlorid). Celý postup derivatizace byl proto následně optimalizován. Nicméně bylo zřejmé, že pro rutinní využití metody v průmyslové výrobě není časově náročná derivatizace vhodná. Proto byla hledána alternativa, která by umožnila tento krok eliminovat. Takovou alternativu představuje detekce za využití hmotnostní spektrometrie, která umožňuje hodnocení látek na základě jejich poměru  $m/z$  a nevyžaduje tedy přítomnost chromoforu v molekule analytu. **Byla vyvinuta a validována metoda HPLC/MS, která umožnila hodnocení čistoty a stability substance T 12. Hodnocenými nečistotami byly: AH - hydrolytický rozkladný produkt, CA - vstupní surovina pro syntézu T 12 a nečistota DAH - vedlejší produkt syntézy. DAH byla objevena a identifikována právě díky využití MS detekce při analýze vzorků. Vyvinutá metoda HPLC/MS je v současnosti využívána pro hodnocení čistoty a stability substance T 12 v průmyslové výrobě.**

Vzhledem k nutnosti rychlého zavedení této metody do praxe, byl její vývoj časově omezený, a proto nemohlo dojít ke zcela ideálnímu zoptimalizování všech parametrů analýzy. Určitou slabinu tak představuje časová náročnost a gradientový profil analýzy. Další vývoj byl proto zaměřen právě tímto směrem a v současné době je připravována publikace, která se zabývá vývojem a validací nové, isokratické metody HPLC/MS s celkovou dobou analýzy 12 minut.

**Druhý tematický celek se věnuje analytickému hodnocení EFV v biologickém materiálu.** Práce byla vypracována na Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg v Německu, kde byla tato problematika řešena v rámci rozsáhlé klinické studie. EFV byl doporučen WHO k léčbě HIV infekce v afrických zemích. Stejně jako většina ostatních antiretrovirotik, je i EFV charakteristický velkou inter-individuální variabilitou plasmatických koncentrací. Z tohoto důvodu patří antiretrovirotika do skupiny léčiv, která by měla být u pacientů monitorována a podávané dávky individuálně upraveny. Hlavní část biotransformace EFV probíhá pomocí CYP-450. V případě koinfekce HIV a TBC je léčivem volby pro TBC rifampicin, induktor CYP-450, který může výrazným způsobem snižovat plasmatické koncentrace EFV. První část projektu byla zaměřena na vývoj a validaci vhodných chromatografických metod, které by umožnily analytické hodnocení EFV v plasmě, jeho volné frakce v ultrafiltrátu a intracelulární koncentrace v PBMC. **Byla**

**vyvinuta citlivá a selektivní metoda HPLC/MS/MS, která umožňuje kvantifikovat efavirenz ve všech třech biologických materiálech. Také byly vyvinuty jednoduché postupy izolace EFV z jednotlivých biologických materiálů. Vyvinutá metoda byla nakonec využita při hodnocení vzorků 14 zdravých dobrovolníků.**

