

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

**HODNOCENÍ CIZORODÝCH LÁTEK PRO  
TOXIKOLOGICKÉ A FARMAKOLOGICKÉ ÚČELY**

Doktorská disertační práce

Praha 2006

Václav Bořek-Dohalský

Tato práce byla vypracována na katedře analytické chemie PŘF UK v Praze, v oddělení toxikologické analýzy Státního zdravotního ústavu v Praze a oddělení bioanalytické laboratoře CEPHA s.r.o. v Plzni v letech 1998 – 2006. Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně a veškerou použitou literaturu řádně citoval.

V Praze dne 27.3.2006.

Děkuji svým školitelům prof. RNDr. Ladislavu Feltlovi, CSc. a doc. RNDr. Miloni Tichému, DrSc. za odborné vedení, neustálou podporu, velmi užitečné rady a velkou trpělivost.

Děkuji Ing. Bohdanu Němcovi za pomoc, podporu a pochopení při vypracovávání disertační práce.

Zvláštní poděkování patří mé rodině, bez jejíž podpory bych disertační práci nemohl dokončit.

## Obsah

Obsah.....	4
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2 AKUTNÍ TOXICITA BINÁRNÍCH SMĚSÍ – ALTERNATIVNÍ TESTY A PREDIKCE .....</b>	<b>7</b>
2.1 Úvod.....	7
2.2 Alternativní metoda testování akutní toxicity zástavou pohybu oligochaeta Tubifex tubifex .....	8
2.3 Akutní toxicita binárních směsí.....	9
2.3.1 Modely odhadu akutní toxicity .....	9
2.3.2 Analýza QSAR a její aplikace na směsi chemických sloučenin.....	10
2.4 Fyzikálně chemické vlastnosti binárních směsí, jejich stanovení a využití v predikčních modelech .....	12
2.4.1 Rozdělení látek v binární směsi mezi kapalnou a plynnou fází.....	12
2.4.2 Rovnovážné složení plynné fáze nad vodným roztokem směsi dvou organických látek .....	14
2.5 Závěr.....	15
<b>3 VÝVOJ A VALIDACE ANALYTICKÉ METODY PRO ÚČELY FARMAKOKINETICKÝCH STUDÍ .....</b>	<b>16</b>
3.1 Úvod.....	16
3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	17
3.2.1 Rozdělovací chromatografie .....	18
3.2.2 Chromatografie na chirálních fázích .....	19
3.2.3 Detekční zařízení v HPLC .....	21
3.3 Úprava biologického materiálu před analýzou .....	25
3.3.1 Deproteinace biologického materiálu.....	25
3.3.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny .....	26
3.3.3 Extrakce na pevné fázi .....	27
3.4 Kritéria přijatelnosti analytické metody pro použití v klinické farmakologii.....	30
3.5 Vývoj a validace analytické metody pro stanovení léčiv v biologickém materiálu .....	31
3.5.1 Stanovení azithromycinu v lidské plazmě.....	31

---

3.5.2 Společné stanovení simvastatinu a jeho hydroxykyseliny v lidské plazmě.....	33
3.5.3 Společné stanovení atorvastatinu a 2-hydroxy-atorvastatinu v lidské plazmě .....	35
3.5.4 Stanovení quetiapinu v lidské plasmě .....	37
<b>Literatura .....</b>	<b>40</b>
<b>Příloha .....</b>	<b>44</b>

# 1 ÚVOD

Veškeré procesy v přírodě, tedy i v lidském organismu, jsou ovlivňovány podmínkami a prostředím, ve kterém probíhají. Člověk své životní podmínky ovlivňuje velmi výrazně a to jak pozitivně, tak bohužel i negativně. Životní prostředí je vystavováno nesčetným zásahům ať už jde o společenské vlivy, působení fyzikálních faktorů a působení chemických látek.

Dnešní život si nedovedeme představit bez mnoha výtvarků moderní civilizace, mezi něž patří i chemické produkty. Ty však mohou v mnoha případech způsobit více škody než užítku. Problém spočívá hlavně v obtížném získávání poznatků o nových chemických látkách, které jsou organismům cizí (xenobiotikách), a jejich působení na živé organismy. Nežádoucími účinky těchto látek se zabývá toxikologie, naopak jejich prospěšné využití zkoumá farmakologie.

Obou těchto oborů jsem se dotkl ve své disertační práci. Z toxikologického hlediska jsem se zabýval možností alternativního testování akutní toxicity binárních směsí a její predikce pomocí fyzikálně-chemických vlastností těchto směsí. V části vztahující se k farmakologii jsem pak pracoval na vývoji a validaci analytických metod pro stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu.

## 2 AKUTNÍ TOXICITA BINÁRNÍCH SMĚSÍ – ALTERNATIVNÍ TESTY A PREDIKCE

### 2.1 Úvod

Člověk připravuje neustále nové a nové chemické látky, jejichž působení je pak vystavován nejen on sám, ale celé životní prostředí. Obvykle se podaří získat alespoň základní údaje o toxicitě, karcinogenitě, teratogenitě či mutagenitě jednotlivých látek. Jen ve výjimečných případech však jsme vystaveni vlivu jediného xenobiotika, téměř vždy se jedná o působení směsi chemikálií a zde je velmi náročné časově, materiálově i finančně získávat potřebné údaje. Východiskem tedy částečně mohou být alternativní metody testování a možnost odhadu účinku směsi na organismus rozbořením již získaných údajů o struktuře a fyzikálně chemických vlastnostech.

Jednou z technik, která se zabývá vztahem mezi účinkem a strukturou je analýza QSAR (Quantitative Structure - Activity Relationships), jejíž metody vycházejí z chemických, fyzikálních a fyzikálně chemických vlastností xenobiotik [1,2]. V šedesátých letech minulého století vzniklo několik prací zabývajících se touto tematikou [3-5]. S rozvojem počítačové techniky, která umožňovala náročné analýzy, se objevilo množství publikací [shrnutí v 1, 6-9] a byla formulována analýza kvantitativních vztahů mezi chemickou konstitucí látek a jejich biologickou účinností.

V části své disertační práce jsem se v návaznosti na svou diplomovou práci zabýval právě možností odhadu účinků binárních směsí pomocí fyzikálně chemických vlastností a porovnáním takto získaných údajů s údaji o akutní toxicitě získanými alternativní metodou stanovení EC50 (koncentrace látky (látek ve směsi) způsobující zástavu pohybu 50% zkoumané populace nitěnek) pro zástavu pohybu oligochaeta *Tubifex tubifex* (nitěnka větší) [10,11]. Cílem bylo navrhnout matematické vyjádření akutní toxicity binárních směsí chemických sloučenin jako funkce jejich složení a dále najít vhodnou fyzikálně chemickou vlastnost, která by se měnila spolu se složením

směsí podobně jako akutní toxicita. Ta by se pak dala použít pro predikci toxického účinku binárních směsí.

## 2.2 *Alternativní metoda testování akutní toxicity zástavou pohybu oligochaeta *Tubifex tubifex**

Jak jsem již naznačil v úvodu, stanovení akutní toxicity tradičními metodami je velmi náročné na čas, peníze i laboratorní zvířata. Proto se hledají alternativní metody, které by nutnost použití tradičních metod omezily, případně nahradily. Tyto nové metody musí poskytovat informace adekvátní pokusům na obratlovcích. Jednou z takových metod je alternativní test na oligochaeta *Tubifex tubifex*. Jeho hlavními přednostmi jsou jednoduchost, rychlost, reprodukovatelnost a finanční nenáročnost. Nitěnky byly používány pro testování toxicity odpadních vod [12] a pro stanovení akutní toxicity již v 50. letech [13] a na přelomu 50. a 60. let byly použity pro zásadní práce, které vedly k predikčním metodám typu analýzy QSAR [3,14,15].

Porovnáním výsledků testování akutní toxicity mezi různými živočišnými druhy se zabývá publikace [16]. Data o LC50 (koncentrace látky způsobující úhyn 50% zkoumané populace ryb) měřených na kaprovité rybě *Pimephales promelas* a LD50 (dávka látky způsobující úhyn 50% zkoumané populace myši) měřených na bílých myších byla získána od dalších autorů [14,17]. Byl použit soubor 17 alifatických alkoholů, jejichž vodné roztoky byly připraveny v různých koncentračních řadách. Sledovány byly soubory čítající šest nitěnek a zaznamenávány počty nehybných jedinců po třech minutách od ponoření do roztoku alkoholu. Pokusy byly prováděny ve třech různých dnech vždy v triplicátech, jejich reprodukovatelnost a správnost byla sledována paralelním stanovením EC50 vodného roztoku  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ . Byly určeny křivky závislosti účinku na koncentraci a vypočteny EC50 [18]. Pomocí analýzy QSAR byly popsány vztahy mezi akutní toxicitou testovanou na rybách, myších a nitěnkách. Bez ohledu na odlišnosti jednotlivých živočichů a různé podmínky experimentů byla nalezena velmi silná korelace výsledků. Použití nitěnek pro testování akutní toxicity tedy přináší srovnatelné výsledky jako testy na myších a rybách za nesrovnatelně kratší dobu a s menšími náklady a nároky (test na nitěnkách trvá 3 minuty, na myších 24



hodin a na rybách 48 hodin). Další zajímavý výsledek přineslo srovnání akutní toxicity (EC50 pro nitěnky, LC50 pro ryby a LD50 pro myši) s rozdělovacím koeficientem olej/vzduch změřeným pro jednotlivé alkoholy. Také zde byla pomocí analýzy QSAR nalezena výrazná korelace. Již dříve byla pro soubor alkoholů prokázána těsná korelace mezi EC50 stanovenou zástavou pohybu oligochaeta *Tubifex tubifex* a IGC50 (Inhibition Growth Concentration = koncentrace inhibující růst kolonie) stanovenou na prvocích *Tetrahymena pyriformis* [19].

## 2.3 Akutní toxicita binárních směsí

Dnes známe toxicitu a mechanismus působení mnoha jednotlivých látek avšak v životním i pracovním prostředí se převážně setkáváme s působením různých chemických směsí, o nichž toho však víme z toxikologického hlediska zatím jen velmi málo.

### 2.3.1 Modely odhadu akutní toxicity

Informace týkající se toxicity chemických sloučenin pro organismy jsou získávány testováním jednotlivých látek za laboratorních podmínek. Lze použít i odhadů pomocí predikčních modelů (typu QSAR, kinetické simulace a pod.). Dnes již existují kritické přehledy o působení směsí látek [20-22]. Kvantitativní modely pro odhad směšné toxicity jsou používány jak v toxikologii [23-32], tak ve farmakologii [33].

Zásadní příspěvek ke klasifikaci společných účinků směsí přinesli Hewlett a Plackett [24-31], kteří vytvořili a diskutovali matematické modely popisující výslednou závislost účinku na dávce. Mnoho autorů pokračuje touto cestou dodnes [22,32,34]. Při odhadu rizika chemických směsí jsou většinou používány modely založené na znalosti vlastností jejich jednotlivých složek. Vycházejí z předpokladu, že látky se z hlediska toxikologického vzájemně neovlivňují a jejich účinky se tudíž sčítají [35]. Tyto modely lze použít při expozici nízkým koncentracím jako hrubý odhad, často však ani zde

neodpovídají reálnému stavu. V mnoha případech můžeme nalézt vzájemné ovlivňování různých chemických látek vedoucí ke zvýšení nebo snížení jejich účinků. Tento jev již dlouhou dobu zkoumají farmakologové. Již v roce 1926 byly pro popis spojeného účinku směsi léčiv použity isobologramy [33]. Tato metoda byla dále diskutována [36,37] a ukázala se užitečnou pro klasifikaci společného účinku chemických látek. Vynášení koncentrací (dávek) obou komponent proti sobě do grafu však nemůže být použito pro zobecnění a odhad změněné velikosti účinku.

V jedné z příložených publikací [38] byla na příkladu směsi benzen-ethanol prokázána nevhodnost použití modelu sčítajícího příspěvky jednotlivých látek pro predikci akutní toxicity směsí. Byl porovnán index EC50 stanovený na nitěnkách s hodnotami EC50 vypočtenými pomocí adičního modelu koncentrace a adičního modelu účinku. První z těchto modelů vychází z předpokladu, že poměr koncentrací látek A a B ve směsi AB je konstantní, ale není stejný jako poměr příspěvků látek A a B k celkové EC50(AB). Druhý z modelů je založen na předpokladu, že poměr koncentrací látek A a B ve směsi je konstantní a stejný jako poměr příspěvků látek A a B k celkové EC50(AB). Data získaná oběma modely vykazovala odklon od naměřených hodnot. Hodnoty vypočtené pomocí adičního model účinku však vykazovaly tak vysoké odchylky (dosahovaly až -1734% od experimentálních hodnot), že se potvrdila nepoužitelnost modelu pro predikci akutní toxicity směsí, jejichž složky se navzájem ovlivňují. Druhý model je blízký normalizaci vlastností toxických jednotek [39], která je požívána pro určování neaditivní vlastností látek ve směsi [11]. Ukázal podstatně větší shodu s EC50 stanovenou na nitěnkách. Odchylky od experimentálních dat se pohybovaly v rozmezí  $\pm 30\%$ . Možnost jeho použití závisí na požadované přesnosti odhadu rizika.

### 2.3.2 Analýza QSAR a její aplikace na směsi chemických sloučenin

Jednou z metod, která by mohla pomoci při vytváření modelů pro predikci velikosti toxických účinků směsí látek je analýza QSAR, případně QCAR (Quantitative Concentration – Activity Relationships). Ta používá k popisu vztahů mezi velikostí

účinku, složením směsi a fyzikálně chemickými parametry chemikálií matematickou funkcí. K jejímu odvození je využíváno matematické statistiky.

Köneman [40] popsal využití modelů QSAR při průkazu podobných mechanismů účinků v sérii příbuzných látek. Poukázal na to, že spojený účinek směsi chemických látek stanovený jako akutní toxicita je aditivní pro všechny koncentrace jestliže jde o látky vyhovující společné rovnici QSAR. Ukázal to na homologické řadě látek, kde toxicita dobře koreluje s fyzikálně chemickými vlastnostmi jako je rozdělovací koeficient mezi oktanol a vodu [1]. Tato domněnka byla úspěšně využita jinými autory k plánování experimentů a k výběru chemikálií pro testování mechanismů účinků těchto látek ve směsi [41,42]. Nicméně tato cesta opět nedovoluje vypočítat obecně odhad velikosti akutní toxicity směsi chemických látek.

Abychom mohli použít matematickou funkci k popisu závislosti akutní toxicity na složení směsi, musíme její složení vyjádřit pomocí vhodného deskriptoru. V našem případě byl zvolen molární zlomek  $R$  jedné z látek ve směsi jehož použití pro tyto účely je podrobně posáno [11]. Studovány byly směsi benzen-ethanol, benzen-anilin, anilin-ethanol a benzen-nitrobenzen. Každá směs representovala jeden typ interakce: inhibici, potenciaci, smíšenou interakci (směs vykazuje jak potenciaci, tak inhibici) a aditivitu (látky se vzájemně neovlivňují a jejich účinky se sčítají). Pro každou binární směs bylo připraveno 12-15 vodných roztoků s různým poměrem chemikálií, od čisté jedné až po čistou druhou látku. Do zkoumaného roztoku se vložilo 6 nitěnek, které byly exponovány po dobu 3 minut. Po uplynutí této doby byl spočítán počet pohybujících se jedinců. Z těchto údajů byly získány hodnoty  $EC_{50}$  pro zástavu pohybu. Poté byly nitěnky vloženy na 1 minutu do vody a opět se spočítaly pohybující se jedinci. Tato data sloužila k získání hodnot  $LC_{50}$ .

$EC_{50}$  byla vypočtena ze sigmoidální křivky koncentrace-odezva metodou Weilové [18]. Pro tento účel jsem vyvinul počítačový program, spojený s možností zápisu experimentálních i vypočtených dat do databáze. Každý bod křivky koncentrace-odezva byl měřen třikrát, nezávisle třemi osobami ve třech různých dnech. Velké množství nezávislých měření a paralelní stanovení  $EC_{50}$  standardního roztoku  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$  zajišťovalo reprodukovatelnost a správnost použité metody.

Výsledky stanovení akutní toxicity byly graficky vyjádřeny v normalizované formě. Normalizovaná  $EC_{50}$  slouží jako měřítko aditivity v případě, že používáme tzv. koncentrační definici aditivity. Pro tu platí, že účinek dvou látek je aditivní v případě, že

nahradíme určité množství jedné látky ve směsi ekvivalentním množstvím látky druhé a celkový účinek směsi zůstane nezměněný. Normalizovaná EC50 je vztažena na EC50 čistých látek. Složení směsi je popsáno normalizovaným molárním zlomkem ( $R_{norm}$ ). Tato normalizace opět vyplývá z definice koncentrační aditivity a  $R_{norm}$  je vztažen k EC50 čistých látek. Výsledná data jsou pak dále analyzována, zkoumá se aditivita a v případě negativního výsledku testu aditivity je hledán optimální polynom, popisující závislost normalizované EC50 na  $R_{norm}$ .

## 2.4 Fyzikálně chemické vlastnosti binárních směsí, jejich stanovení a využití v predikčních modelech

Pro směsi benzen-ethanol, benzen-anilin, benzen-nitrobenzen a ethanol-anilin byla stanovena EC50 pro zástavu pohybu oligochaeta *Tubifex tubifex*. Při hledání údajů o chování fyzikálně chemických vlastností látek v těchto binárních směsích jsem musel zajít hluboko do historie. Nalezl jsem data popisující zejména rovnovážné stavy, např. parciální tlaky nasycených par jednotlivých složek, body varu a další údaje získané za různých experimentálních podmínek pro směsi benzen-ethanol [43-46], benzen-anilin [47,48] a benzen-nitrobenzen [47,49,50]. Publikované údaje však nevyhovovaly požadavkům pro využití k odhadu akutní toxicity směsí látek. Pro směs ethanol-anilin však nebyla přes velmi rozsáhlé pátrání nalezena žádná experimentální data. Bylo tedy nutné hledat fyzikálně chemickou vlastnost, která by vhodným způsobem chování směsi popisovala a stanovit ji.

### 2.4.1 Rozdělení látek v binární směsi mezi kapalnou a plynnou fází

Jako první fyzikálně chemický deskriptor chování binární směsi bylo studováno rovnovážné rozdělení látek mezi plynnou a kapalnou fází binárních směsí dvou čistých organických látek v závislosti na složení směsi. Bylo nutné stanovit

absolutní koncentrace látek v plynné fázi binárních směsí, aby bylo možné výsledky vyjádřit normovaně v R-grafu a ty porovnávat s R-grafy akutní toxicity.

Pro vlastní měření bylo připraveno 15 roztoků různého složení pro každou binární směs chemických látek, tak aby byla rovnoměrně pokryta celá škála hodnot molárního zlomku od 0 do 1. Doba nutná pro ustanovení rovnováhy byla experimentálně stanovena na 30 minut. Následně se plynovou chromatografií analyzuje plynná fáze. Každé měření bylo opakováno nejméně 5x. Byl změřen též poměr mezi množstvím vzorku jdoucím na kolonu a do splitru. Poté, co byla zjištěna minimální a maximální plocha píků pro jednotlivé látky, bylo připraveno 5 kalibračních roztoků, které zahrnovaly vždy oba extrémy. Ze závislosti plochy píku na známé koncentraci látky v dávkované kapalině pak byl získán molární odezvový faktor, pomocí něhož byly vypočteny molární koncentraci látky v plynné fázi. Součet těchto molárních koncentrací byl opět normalizován vztažením k molárním koncentracím plynné fáze čistých látek [51].

Naměřené výsledky jsou prezentovány v R-grafu jako závislosti součtu normalizovaných koncentrací látek v plynné fázi ( $c_{\text{norm}}$ ) na molárním zlomku jedné z látek v kapalně fázi a porovnávají se stejně prezentovanými výsledky stanovení EC50 [51-53]. Pro všechny směsi byly vztahy mezi normalizovaným molárním zlomkem a celkovou normalizovanou molární koncentrací látek směsi v plynné fázi nad kapalinou popsány polynomickou funkcí. Ve směsi benzen-ethanol byla nalezena, podobná odchylka od aditivity jako u výsledků akutní toxicity, kde tomu odpovídal inhibiční efekt. Aditivní chování (bez vzájemného ovlivňování látek) bylo zjištěno u směsi benzen-nitrobenzen. U akutní toxicity platila aditivita v celém rozsahu molárního zlomku, pro rovnovážné rozdělení mezi plynnou a kapalnou fázi pak pro hodnoty molárního zlomku pohybující se v intervalu 0,15-0,80. U směsi ethanol-anilin byly nalezeny jak kladné, tak záporné odchylky od aditivity. Ty odpovídaly potenciační a inhibiční interakci mezi látkami, které nalezneme při stanovení EC50. U směsi benzen-anilin byl zjištěn potenciační efekt akutní toxicity, rovnovážné složení plynné fáze nad kapalnou směsí však vykazovalo opačný trend.

## 2.4.2 Rovnovážné složení plynné fáze nad vodným roztokem směsi dvou organických látek

V další fázi hledání vhodného deskriptoru chování směsi bylo měřeno rovnovážné složení plynné fáze nad vodným roztokem směsi dvou organických látek v závislosti na složení kapalně fáze. Podmínky stanovení analytů v plynné fázi plynovou chromatografií zajišťovaly co největší přiblížení podmínkám testování akutní toxicity, tj. nízké koncentrace látek ve vodném prostředí. Právě velmi nízké koncentrace látek v plynné fázi vedli k využití moderní metody SPME (Solid Phase Micro Extraction - mikroextrakce na pevné fázi) pro odběr vzorků.

Tuto jednoduchou, rychlou a účinnou adsorpční a desorpční techniku zakoncentrování analytu, která nepotřebuje rozpouštědla ani komplikované aparatury vyvinul Janusz Pawliszin [54-57]. Podrobný přehled jejího využití ve spojení s plynovou chromatografií pak nalezneme v publikaci Eiserta a Levsena [58]. Metoda je založena na principu extrakce analyzované látky malým množstvím tuhé fáze umístěným na povrchu křemenného vlákna. Jedná se většinou o polymerní kapalinu (např. polydimethylsiloxan - PDMS, polyakrylát) nebo porézní sorbent (divinylbenzen, carboxen). Vlákno může být buď ponořeno do kapalně fáze, nebo se na jeho povrchu zachytávají látky plynně fáze. Po ustavení rovnováhy je vlákno se zachycenou látkou přímo zasunuto do vyhřátého injektoru plynového chromatografu, kde se zachycené sloučeniny vlivem teploty desorbují. Metoda poskytuje lineární závislost sorbované množství látky na koncentraci v kapalně fázi v širokém koncentračním rozsahu a volbou vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro velmi nízké koncentrace analytů.

Vzorky pro měření rovnovážného složení plynně fáze nad vodným roztokem binárních směsí benzen-ethanol, benzen-nitrobenzen, benzen-anilin a ethanol-anilin byly připraveny ve stejných koncentracích a složení jako výsledné hodnoty EC50 (*Tubifex tubifex*). Zásobní roztoky byly připraveny do 100 mL odměrných baněk vždy v den měření, výjimkou byla směs benzen-nitrobenzen, která byla kvůli nízké rozpustnosti ve vodě připravována den před měřením. Z těchto zásobních roztoků byly vzorky pipetovány do 4 mL lahviček uzavřených septem, vždy 1 mL v serii po třech pro každou koncentraci. Po ustavení rovnováhy (postačující doba byla určena na 20 min) mezi roztokem a plynou fází bylo možné zahájit samotnou sorpci složek směsi v

plynné fázi nad jejich vodným roztokem. Doba nutná pro dosažení sorpční rovnováhy byla určena na 3 min pro benzen a ethanol a na 5 minut pro anilin a nitrobenzen. Vláknko bylo vloženo přibližně 1 cm nad povrch kapaliny a upevněno v držáku, což zaručovalo stejné podmínky pro všechny analýzy. Po ustavení sorpční rovnováhy bylo vláknko vsunuto do injektoru plynového chromatografu a ponecháno do doby, než byly obě látky směsi detekovány detektorem. Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislosti plochy píku na množství látky a směrnice křivky byla použita k výpočtům celkové koncentrace látek směsi v plynné fázi jako molární odezvoový faktor. Tyto výpočty byly podrobně popsány [57-59].

U směsí benzen-ethanol a benzen-anilin se ukázalo, že změny vybraného fyzikálně chemického deskriptoru směsi se shodují se změnami EC50 nejen kvalitativně, ale i kvantitativně. Tento jev se neprojevil tak silně u směsi anilin-ethanol, přestože kvalitativní shodu zde nalezneme. Aditivita EC50 nebyla následována fyzikálně chemickým deskriptorem ve směsi benzen-nitrobenzen. Zajímavým faktem je, že obě nalezené křivky mají podobný tvar.

## 2.5 Závěr

Přestože je třeba provést ještě mnoho testů a srovnání hledat další fyzikálně chemické deskriptory směsí vhodné pro predikci akutní toxicity, ze získaných výsledků lze důvodně předpokládat, že analýza QSAR je využitelná i pro směsi. Dále bylo prokázáno, že indexy akutní toxicity se mohou měnit podobně jako rozdělovací koeficienty mezi dvě nemísitelné fáze látek v binární směsi.

Prokázána byla také možnost extrapolace indexů akutní toxicity mezi jednotlivými živočišnými druhy a tedy možnost nahrazení testování těchto indexů na vyšších živočišných alternativními metodami.

### **3 VÝVOJ A VALIDACE ANALYTICKÉ METODY PRO ÚČELY FARMAKOKINETICKÝCH STUDIÍ**

#### *3.1 Úvod*

Analytické metody pro stanovení biologicky aktivních látek vycházejí ze společných teoretických základů a využívají stejné analytické instrumentace [60]. Rozdílné jsou však přístupy k řešení analytického problému podle požadavků vědních disciplín, kterým mají výsledky analýz sloužit jako základ pro další studium. Například analytické metody v toxikologii obvykle umožňují současnou identifikaci a stanovení celé řady látek často velmi rozdílné povahy. Toxické koncentrace jsou však relativně vysoké, a proto nejsou obvykle u těchto metod kladeny extrémní požadavky na jejich citlivost. Naopak metody pro klinickou farmakologii jsou vyvíjeny nejčastěji pro jeden lék, případně pro jeho metabolity nebo izomerní formy, tedy látky chemicky blízké. U těchto metod jsou obvykle vyžadovány velmi nízké detekční limity a často též vysoká selektivita.

Farmakologii můžeme charakterizovat jako vědu zkoumající interakce látek a organismu. Jejím cílem je určit, zda a za jakých podmínek je látku možné použít jako léčiva. Klinická farmakologie se zabývá studiem účinku látek na lidský organismus a jejím cílem je optimální využití farmak pro terapii u člověka. Významným odvětvím farmakologie, které je bezprostředně spjato s výsledky analytických stanovení, je farmakokinetika. Zabývá se kvantitativním hodnocením pohybu léčiv v organismu, který závisí jak na daném léčivu a způsobu jeho podání, tak na působení organismu na léčivé látky. Farmakokinetika sleduje stanovené léčiva v tělních tekutinách a tkáních pomocí exaktních matematických modelů. Jejich výsledkem je určení celé řady základních farmakokinetických parametrů, které charakterizují zkoumané látky. Jsou to např. biologická dostupnost, rychlostní konstanta absorpce a eliminace, distribuční



objem a poločas absorpce a eliminace. Podrobně se touto tematikou zabývají příslušné monografie [61-64].

Farmakokinetika se společně s analytickými metodami podílí významnou měrou na objevování nových léčivých látek, na výzkumu a vývoji nových lékových forem a na studiu metabolismu a terapeutických a toxikologických účinků léčiv. Výsledky farmakokinetických studií poskytují klinické praxi cenné informace o dávkování léku.

V důsledku velkého počtu nových preparátů objevujících se každoročně na trhu dochází k velkému nárůstu požadavků na farmakokinetické studie. Metody, které jsou v současné době používány pro stanovení léků v biologickém materiálu, je možné podle jejich principu rozdělit do následujících skupin:

- metody mikrobiologické
- metody imunochemické
- metody fyzikálně-chemické

V následujících kapitolách budou stručně charakterizovány fyzikálně-chemické metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, zmíněny budou způsoby úpravy biologického materiálu před analýzou a kritéria pro použití analytické metody pro farmakokinetické studie.

### 3.2 *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pokrývá většinu aplikací stanovení léků v biologickém materiálu chromatografickými metodami. V posledních letech prošla rychlým vývojem. Díky technologickému pokroku v přípravě chemicky vázaných stacionárních fází se téměř výhradně uplatňuje rozdělovací chromatografie. Převažují také aplikace pro systém s obrácenými (reversními) fázemi, ve kterém je na rozdíl od systému s normálními fázemi mobilní fáze polárnější než stacionární. Rozdělovací chromatografie ve většině aplikací pro farmakologické studie nahrazuje adsorpční chromatografii využívající nemodifikovaný silikagel jako stacionární fázi a

také chromatografii na měničích iontů. Široká škála typů chemicky vázaných fází poskytuje metodě HPLC vysokou selektivitu, separační účinnost a téměř neomezené aplikační možnosti vzhledem k chemické povaze analyzovaných látek. Analýzy probíhají obvykle za teplot blízkých teplotě okolí, což umožňuje stanovení látek méně tepelně stabilních. Ve většině případů není také třeba připravovat deriváty analyzovaných látek před vlastní separací. To je také hlavní příčinou nahrazení plynové chromatografie touto metodou v celé řadě aplikací.

### 3.2.1 Rozdělovací chromatografie

V rozdělovací chromatografii jsou mobilní a stacionární fáze navzájem nemísitelné kapaliny. Stacionární fáze je zakotvena na vhodný nosič, který musí být chemicky inertní a mechanicky pevný. V praxi byl tento požadavek vyřešen chemickým navázáním stacionární fáze prostřednictvím pevné vazby Si-C na povrch silikagelu. Tabulka 1 [60] uvádí přehled základních typů stacionárních fází.

*Tabulka 1.: Chemicky vázané stacionární fáze*

označení	funkční skupina	polarita
C-1	methyl	slabě nepolární
C-2	ethyl	slabě nepolární
C-3	propyl	slabě nepolární
C-4	butyl	slabě nepolární
C-6	hexyl	středně nepolární
C-8	oktyl	středně nepolární
C-18	oktadecyl	nepolární
Ph	fenyl	středně nepolární
CN	kyanopropyl	slabě polární
NH <sub>2</sub>	aminopropyl	středně polární
Diol	glycerylpropyl	polární

Separační mechanismus rozdělovací chromatografie je založen na distribuci analyzované látky mezi oběma kapalnými fázemi, obdobně, jako je tomu při extrakci z kapaliny do kapaliny. Afinity analytu ke stacionární fázi je charakterizována distribuční konstantou  $K_D$  pro daný chromatografický systém. Je výsledkem působení disperzních a indukčních sil a vodíkových vazeb mezi molekulou analyzované látky a stacionární fází.

Rozdělovací chromatografie je nejvíce užívaná HPLC technika pro stanovení léků v biologických materiálech. To je umožněno velkým výběrem stacionárních fází o různé polaritě a z toho vyplývající širokou škálou použitelných mobilních fází volených pro specifické požadavky analýzy zkoumané látky. Další výhodou ve srovnání s adsorpční chromatografií je relativně krátká doba potřebná k ustavení rovnováhy v daném systému, což urychluje hledání optimálních podmínek a usnadňuje použití gradientových elucí.

Příklady stanovení léků rozdělovací vysokoučinnou kapalinovou chromatografií jsou uvedeny v souhrnné tabulce 2.

### 3.2.2 Chromatografie na chirálních fázích

Další technika HPLC, která je využívána pro analýzy léků v biologických materiálech je chromatografie na chirálních fázích. Zahrnuje celou řadu chemicky odlišných stacionárních fází, které se liší separačním mechanismem. Jejich společnou vlastností je vysoká selektivita umožňující rozlišit navzájem optické isomery, tedy dvojice molekul, které se k sobě mají jako předmět a obraz v zrcadle. Jejich fyzikální a chemické vlastnosti jsou shodné. Jediným charakteristickým rozdílem je opačná orientace otáčení roviny polarizovaného světla. Optická aktivita (chiralita) je způsobena přítomností chirálního centra, kterým je nejčastěji atom uhlíku substituovaný čtyřmi různými funkčními skupinami. Taková molekula pak existuje ve dvou enantiomerních formách. V jedné molekule může být obecně  $n$  asymetrických center a tedy  $2^n$  optických isomerů.

V analytických metodách používaných pro farmakokinetické studie nalezneme nejčastěji zastoupeny dva druhy chirálních stacionárních fází a to buď fáze na bázi chirálního polymeru, nebo fáze využívající chiralitu cyklodextrinů.

Základním typem fáze na bázi chirálního polymeru je mikrokrytalická triacetylcelulosa. Častěji používané a odolnější jsou pak fáze připravené impregnací silikagelu derivovaným polysacharidem, které obsahují různé funkční skupiny jako např. acetyl, benzoyl, fenyلكarbamoyl, dimethylfenylkarbamoyl a chlorofenyلكarbamoyl. Předpokládaný separační mechanismus spočívá v tvorbě diastereoisomerního komplexu prostřednictvím vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  a dipól-dipól interakce. Jako mobilní fázi lze použít polární i nepolární organická rozpouštědla, nedoporučuje se použití chlorovaných rozpouštědel. Komerčně jsou dostupné například kolony pod označením Chiralpak, Chiralcel.

Cyklodextrinové stacionární fáze obsahují obvykle molekuly tvořené šesti, sedmi nebo osmi glukosovými jednotkami vázanými do kruhu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyklodextriny). Toroidní tvar molekuly, hydrofobní charakter její dutiny, diskrétní konformace hydroxylových skupin po vnějším obvodu molekuly a přítomnost 30-40 chirálních center dávají cyklodextrinům výjimečné selektivní vlastnosti při interakcích s jinými látkami za tvorby tzv. inkluzivních komplexů. Chirální separační mechanismus je výsledkem kombinací inkluzivního procesu hydrofobní části separované molekuly do dutiny cyklodextrinu a interakcemi polárních skupin separované molekuly s hydroxylovými skupinami cyklodextrinu. Velký vliv na selektivitu mají také sterické efekty. Využití těchto vlastností pro separace v HPLC bylo realizováno navázáním molekuly cyklodextrinu na různými způsoby na povrch silikagelu. Další významné ovlivnění selektivity je umožněno chemickou modifikací hydroxylových skupin na povrchu molekuly cyklodextrinu. Komerčně dostupné kolony tohoto typu nalezneme pod označením Cyclobond, Chiral CD-Ph.

Posledním zmíněným typem chirální stacionární fáze jsou fáze s navázanou bílkovinou, jejichž bioafinitní separační mechanismus je založen na kombinaci sterických efektů, vodíkových vazeb a elektrostatických a hydrofobních interakcích. Komerční kolony nesou označení např. Chirobiotic.

Příklady stanovení léků vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na chirálních fázích jsou uvedeny v souhrnné tabulce 2.

### 3.2.3 Detekční zařízení v HPLC

Stejně důležitá součástí procesu chromatografického stanovení jako vlastní separace směsi na analytické koloně je detekční zařízení. Sleduje určitou fyzikální vlastnost eluátu na výstupu z kolony a zaznamenává její změny při přítomnosti analyzované látky v mobilní fázi. Signál detektoru je kontinuálně zaznamenáván v dnešní době především osobním počítačem přímo napojeným na chromatografický systém a dále zpracováván a vyhodnocován.

Základním požadavkem na detekční zařízení je dostatečná citlivost, tedy dostatečně vysoký poměr signálu k šumu pro nízké množství stanovované látky. Měl by mít také poměrně velký lineární rozsah, tedy poskytovat odezvu úměrnou koncentraci analyzované látky v širokém koncentračním rozmezí. Celý systém by měl mít minimální vnitřní objem, aby nedocházelo při detekci ke ztrátám separační účinnosti dosažené na analytické koloně vlivem difuze v detektoru. Podle požadavků na stanovení může být vhodná buď velká universálnost detektoru (možnost detekovat mnoho složek směsi vycházející z kolony), nebo naopak velká selektivita detektoru (zaznamenáván je jen určitý typ látek).

Podle účinku detekčního procesu na detekovanou látku můžeme detektory rozdělit na destruktivní a nedestruktivní. Nedestruktivními detektory látka prochází beze změny struktury a do této skupiny patří refraktometrický, spektrofotometrický a fluorescenční. K destruktivním detektorům pak řadíme hmotnostně spektrometrický detektor. Elektrochemické detektory spadají do obou kategorií podle toho, jaký typ reakce je využit k detekci.

Refraktometrický detektor je vysoce universální, vzhledem k nízké citlivosti ale nenašel v oblasti analýz léků v biologickém materiálu uplatnění.

Široké uplatnění v této oblasti naopak našel detektor spektrofotometrický. Je založen na absorpci záření o vlnových délkách 190-760 nm. Prochází-li záření mobilní fází obsahující zkoumanou látku, je část záření touto látkou pohlcena. Vztah mezi koncentrací látky a množstvím absorbovaného záření je popsán Lambertovým-Beerovým zákonem. Při vysokých koncentracích dochází k odchylkám od tohoto zákona a přestává platit lineární závislost. Nejjednodušší typy detektorů používají k propouštění záření dané vlnové délky filtry, složitější monochromátor, který umožňuje plynulé nastavení vlnové délky. Moderní přístroje mohou také zaznamenat

absorpční spektrum analyzované látky a to buď konstrukčně náročnou metodou „fast scan“ spočívající v sejmutí spektra látky protékající měřicí celou ve velmi krátkém čase, nebo pomocí metody fungující na principu rozkladu spojitého záření po průchodu měřicí celou a vyhodnocování jeho intenzit odděleně pro jednotlivé vlnové délky pomocí fotosensitivních diod (diod-array detektory). Výjimkou dnes nejsou ani přístroje umožňující sledování absorpce záření danou látkou pro dvě vlnové délky. Spektrofotometrické detektory jsou velmi universální, mají široký lineární rozsah a jednoduché použití. V době zvyšování účinnosti léků a snižování jejich dávek je však v některých případech nedostatečná jeho citlivost.

Fluorescenční detektory jsou založeny na principu záznamu fluorescenčního záření. Elektrony vnějších orbitalů elektronového obalu jsou při absorpci záření z UV oblasti excitovány. Jejich návrat do základního stavu probíhá nezářivým přechodem (např. uvolněním energie) a také emisí záření o vyšší vlnové délce, než mělo záření excitační. Rozdíl ve vlnových délkách je způsoben právě podílem nezářivého přechodu na snížení energie emitovaného záření. Fluorescenční vlastnosti vykazují zejména polyaromatické sloučeniny a planární heterocyklické sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami. Zvýšení fluorescence podporuje také přítomnost chromoforních skupin v molekule sledované látky, např. karbonyl, amin, imin, nitril nebo hydroxyl. Výhodou této techniky je vyšší citlivost a selektivita ve srovnání se spektrofotometrickým detektorem dobrý lineární rozsah a jednoduché použití. Počet látek, které se dají stanovit touto technikou, je však ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí výrazně nižší. Tento problém může být částečně vyřešen vhodnou derivatizací sledované látky zavedením funkční skupiny s fluorescenčními vlastnostmi, např. dansylací nebo fenacylací. Podrobně je problematika derivatizace při stanovení látek v biologickém materiálu metodou HPLC popsána Brinkmanem a spol. [65]. To ale vyžaduje složitější a časově náročnější postup analýzy.

Elektrochemické detektory jsou založeny na reakci analyzované látky spojené s přenosem elektronů mezi látkou a elektrodou. Podle principu chemické reakce a experimentálního uspořádání rozdělujeme detektory na vodivostní, polarografické, voltametrické, amperometrické a coulometrické. Principy jednotlivých metod jsou podrobně popsány v odborné literatuře [66]. Tento typ detektorů je velmi citlivý a selektivní. Určitou nevýhodou může být jeho úzký lineární rozsah. Zvláštní pozornost musí být věnována výběru mobilní fáze, tak aby přítomnost elektroaktivních

kontaminantů nezvyšovala šum. V práci Kissingera [67] nalezneme podrobný přehled a perspektivy elektrochemické detekce v analytických aplikacích pro analýzu látek v biologickém materiálu.

Nejúčinnější způsob detekce používaný při analytických stanoveních látek v biologickém materiálu ve spojení s HPLC představuje hmotnostní spektrometrie. Umožňuje účinnou separaci látek ve složitých směsích, jejich kvantitativní vyhodnocení a navíc udává cenné informace o struktuře analyzovaných látek na základě jejich hmotnostních spekter. Hmotnostním spektrem se rozumí zápis zastoupení jednotlivých iontů, které jsou dány poměrem jejich hmotnosti a náboje. Je tedy zřejmé, že pro účely této metody je třeba stanovované látky převést na kladné nebo záporné ionty. Ty jsou pak separovány iontově optickým zařízením podle jejich efektivních hmot. Hmotnostní spektrometr tvoří tři základní funkční složky: iontový zdroj, analyzátor a registrační zařízení ve spojení se systémem zavádění vzorků, vakuovým systémem a osobním počítačem. Iontový zdroj vytvoří ionty, jež se v optickém systému fokusují na úzký svazek, urychlují a jsou přiváděny do analyzátoru. Zde jsou separovány buď pomocí kombinace elektrických a magnetických polí, nebo na základě měření jejich rychlostí. Registrace je buď optická, ta je používána jen výjimečně, nebo elektrická, založená na měření počtu nábojů. Princip metody je podrobně popsán v literatuře [68-71].

Z mnoha typů zdrojů ionizace jsou ve spojení v HPLC používány nejčastěji elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI). Při použití elektrospreje je mobilní fáze přivedena do kapiláry, na kterou je vloženo napětí a odtud je vystřikována při atmosferickém tlaku do proudu ohřátého dusíku za tvorby malých nabitých kapiček. Z těch se pak uvolňují plynné ionty, které jsou vtahovány a fokusovány iontovou optikou do analyzátoru. APCI má jistou podobnost s elektrosprejem, K ionizaci dochází také za atmosferického tlaku, hlavní rozdíl je ale v tom, že u APCI je vstupní kapilára přivádějící mobilní fázi vyhřívána, aby se urychlilo vypařování rozpouštědla, a není mezi ní a vstupní elektrodou iontového zdroje vloženo napětí. To je vloženo až na jehlovou elektrodu. Mezi elektrodami vzniká koronový výboj, přičemž se generuje chemicko-ionizační plazma. Každá molekula, která prochází touto oblastí iontů rozpouštědla, může být ionizována přenosem protonu za vzniku iontů  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]$ .

V komerčně dostupných systémech HPLC-MS pro kvantitativní analýzu jsou nejčastěji používanými analyzátory kvadrupolový hmotový filtr a iontová past. První

zmíněný analyzátor využívá k separaci iontů jejich průchodu mezi čtyřmi kovovými tyčemi, na něž je vloženo stejnosměrné napětí vždy stejného znaménka u dvou protilehlých tyčí a superponováno střídavé radiofrekvenční napětí. Aby ionty pronikly vzniklým polem, musí se podrobit oscilaci, která je i se všemi ostatními parametry konstantní. Částice s jinou hodnotou poměru  $m/z$  než má sledovaná látka a pro niž jsou nastaveny parametry analyzátoru jsou z elektrického pole vyneseny ven a zadrženy elektrodami. Pomocí této technologie lze změřit během několika milisekund celé spektrum, což umožňuje i změnu způsobu ionizace během průchodu jednoho chromatografického píku a tedy kombinování různých technik (ESI+, ESI-, APCI+, APCI-) během jedné analýzy. U iontové pasti probíhá separace iontů v proměnném elektrickém poli. Skládá se z prstencové střední elektrody a dvou uzemněných kruhových elektrod, které prstenec volně uzavírají. Na střední elektrodu se při konstantní frekvenci přivede vysokofrekvenční napětí nejprve s nízkou amplitudou, která se postupně zvyšuje. Tím jsou do elektronového násobiče postupně vypuzovány ionty se vzrůstající hodnotou  $m/z$ . Vzhledem k tomu, že iontová past uchovává ionty, je možné po relativně dlouhou dobu akumulovat i slabé signály.

Velké zvýšení selektivity a citlivosti umožňují tzv. tandemové přístroje (Tandem mass spektrometry, MS/MS). Uspořádání jejich analyzátorů umožňuje výběr určitého prekursoru ze směsi iontů a následnou separaci dceřiných iontů vzniklých fragmentací toho prekursoru.

Rozvoj technologií v posledních letech umožnil spojení HPLC-MS. Zejména vývojem v oblasti zdrojů ionizace a snižování objemu mobilní fáze v HPLC byl vyřešen problém s přivedením vzorku z HPLC systému přímo do hmotnostního spektrometru. To umožnilo velký nárůst vývoje různých typů komerčně dostupných analytických systémů využívajících spojení HPLC-MS, popř. HPLC-MS/MS. Vzhledem k neustále rostoucím nárokům na citlivost a selektivitu v analýzách léčiv v biologických vzorcích roste i četnost využití této analytické metody.

Příklady využití různých typů detektorů při stanovení léků vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsou uvedeny v souhrnné tabulce 2.



### 3.3 Úprava biologického materiálu před analýzou

Biologickým materiálem, ve kterém jsou v klinické farmakologii léky stanovovány, je nejčastěji krev, plazma, sérum a moč. Méně časté je pak stanovení léků v tkáňových homogenátech, slinách, potu, stolici, mozkomíšním moku apod.

Většinu biologických materiálů je třeba před analýzou upravit. Základním důvodem této úpravy bývá odstranění takových složek vzorku, které mohou mechanicky poškodit analytický přístroj ucpáním dávkovacího zařízení, kapilár nebo analytických kolon. Pevné složky vzorku jsou odstraňovány filtrací nebo centrifugací. Bílkoviny, které se snadno srážejí, bývají odstraňovány deproteinačními postupy. Dalším důvodem úpravy vzorku před analýzou je zvýšení selektivity a citlivosti celkového stanovení odstraněním endogenních složek směsi a zakoncentrováním analyzovaných látek. Tyto úpravy vyžadují jednoduché nebo vícestupňové extrakční postupy.

Volba způsobu úpravy biologického materiálu spolurozhoduje o celkové přesnosti, reprodukovatelnosti a výtěžnosti analytické metody. Nejvíce užívané postupy úpravy biologického materiálu - deproteinace, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce na pevné fázi - budou podrobněji posány v následujících kapitolách.

#### 3.3.1 Deproteinace biologického materiálu

Deproteinace biologického materiálu slouží k odstranění bílkovin přítomných ve vzorku, které mohou způsobit jak interference, tak v důsledku precipitace znehodnocení analytické kolony a poškození analytického přístroje. Při volbě deproteinačního postupu je nutné brát v úvahu skutečnost, že část léčiva je ve vzorku vázaná na přítomné bílkoviny. Podle účelu analýzy je třeba volit takový postup, který buď odstraní bílkoviny spolu s navázaným podílem léčiva a umožní pak stanovit volný podíl daného léku ve vzorku, nebo naopak postup, který současně s deproteinací uvolní navázané léčivo a analýzou je pak stanovena jeho celková koncentrace ve vzorku.

Deproteinace, které zachovávají vazby léků na bílkovinu, jsou založeny na membránových procesech. K těmto metodám řadíme ultrafiltraci a dialýzu. Jejich selektivita je dána velikostí pórů použité semipermeabilní membrány. Dialýza byla

použita pro automatickou úpravu vzorků před chromatografickou analýzou přímým spojením s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem. Pro ultrafiltraci byly vyvinuty ultrafiltrační kolonky, umožňující jednoduchou deproteinaci malých objemů biologického materiálu.

Metodou precipitační deproteinace, založenou na vysrážení bílkovin účinkem precipitačního činidla, je dosaženo současně uvolnění navázaného léčiva na bílkovinu.

Velmi účinnými precipitačními činidly, jejichž účinek je ireversibilní, jsou roztoky kyselin trichloroctové, chlorovodíkové, chloristé, molybdenové, sulfosalicylové, metafosforečné nebo pikrové. Dobré precipitační účinky mají také roztoky solí, např. síranu zinečnatého, wolframanu sodného a chloridů rtuťnatého a hlinitého. Velice rozšířená je precipitace proteinů účinkem organických rozpouštědel nebo jejich směsí. Jejich účinnost klesá v řadě acetonitril > aceton > ethanol > methanol.

Reversibilní precipitace, která však není 100% účinná, nastává v případě použití nasyceného roztoku síranu amonného.

Supernatant získaný některou z výše uvedených deproteináčnických metod může být přímo analyzován nebo je podroben jednomu z následných extračních procesů.

### 3.3.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakčními postupy odstraňujeme endogenní látky přítomné ve vzorku obvykle v několikanásobně vyšších koncentracích než stanovovaná látka, které by mohly při stanovení interferovat. Odstraníme též negativní vlivy biologického materiálu na analytický přístroj, popřípadě analytickou kolonu. V neposlední řadě můžeme využít extrakci k zakoncentrování dané látky v upraveném vzorku před analýzou. Přestože je extrakce z kapaliny do kapaliny nejstarší extrakční metodou, je stále v praxi široce používána. Je založena na rozdělení látky mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. toto rozdělení je popsáno Nernstovým zákonem, který platí za ideálních podmínek. Ve skutečnosti dochází k určité omezené mísitelnosti obou fází, k objemovým změnám fází při jejich smíšení a k interakcím extrahované látky, zvláště k disociaci nebo asociaci. K popsání tohoto reálného stavu je používán rozdělovací poměr  $D_C$ .

Podmínkou úspěšné extrakce je nalezení takového systému, ve kterém je hodnota  $D_C$  maximální pro stanovovanou látku a naopak rozdělovací poměry pro endogenní látky jsou co nejnižší. Velikost distribučního poměru je výsledkem rozdílu rozpustností látky v obou systémech. Rozpustnost a tedy i hodnotu  $D_C$  je možné ovlivnit výběrem organického rozpouštědla, úpravou pH vodné fáze, změnou poměru obou fází a způsobem a dobou trvání extrakce.

Výhodou extrakce z kapaliny do kapaliny je její jednoduchost provedení a relativně dobrá účinnost. Nevýhodou je však velké naředění vzorku během extrakce, ztráty spojené s oddělováním a obvyklým odpařováním organické fáze, používání toxických rozpouštědel a často dlouhá doba extrakce.

### 3.3.3 Extrakce na pevné fázi

Pokrok v technologii silikagelu a přípravě chemicky vázaných fází pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii přinesl také nový způsob úpravy vzorků před analýzou označovaný jako extrakce na pevné fázi. Její princip spočívá v selektivní adsorpci stanovované látky na vhodné stacionární fázi za současného oddělení nežádoucích endogenních látek. Typy stacionárních fází, které jsou k dispozici pro extrakce na pevné fázi jsou shodné s fázemi využívanými v HPLC (viz. Tab. 1) a také separační mechanismus a postup při výběru vhodné mobilní fáze se tedy řídí stejnými pravidly.

Extrakční postup lze rozdělit do čtyř základních kroků - aktivace kolonek, aplikace vzorku, promytí a eluce. Aktivací kolonek se rozumí promytí extrakčních kolonek čistými rozpouštědly v takovém pořadí, abychom uvedly kolonky do prostředí, které umožní maximální adsorpci stanovované látky na stacionární fázi. Aplikace vzorku je fáze, při které je daná látka pevně sorbována na stacionární fázi a endogenní látky částečně procházejí kolonkou bez zadržení a částečně se na kolonce též zachytí. Promytí znamená aplikaci určitého objemu jednoho nebo více roztoků, kterými jsou z kolonky vymývány slabě vázané endogenní látky, zatímco stanovovaná látka zůstává kvantitativně sorbována na stacionární fázi. Elucí je dosaženo kvantitativního a selektivního uvolnění stanovované látky do čistého roztoku. Vhodná volba elučního

činnidla umožňuje kvantitativní eluci velmi malým objemem a tím dosažení velkého zakoncentrování látky před analýzou.

Extrakční kolonky jsou dnes k dispozici nejčastěji ve dvojím provedení. První typ je tvořen sorbentem v polyethylenovém nebo polypropylenovém plášti, který lze nasadit na injekční stříkačku. Ta pak slouží jako rezervoár pro vzorek a mobilní fáze a jako regulátor rychlosti průtoku elučnicích roztoků. Druhý typ kolonek je opět tvořen polyethylenovým nebo polypropylenovým pouzdem, které má tvar pláště injekční stříkačky. Na je ho konci je uložen sorbent. Kolonka má tak vlastní rezervoár pro vzorek a elučnicí činidla. Průtok je zde regulován podtlakem. Tento typ kolonek je většinou užíván ve spojení s vakuovým zařízením umožňujícím deset i více současných extrakcí.

Hledání optimálních podmínek extrakce na pevné fázi je poměrně náročné, výsledkem je však velmi čistý a zakoncentrovaný roztok stanovované látky, který je možno použít k analýzám vysoce citlivými separačními metodami. Zavedená metoda extrakce na pevné fázi bývá mnohonásobně rychlejší než extrakce z kapaliny do kapaliny. Výrazně vyšší bývá také její výtěžnost a reprodukovatelnost. Metoda extrakce na pevné fázi také omezuje styk s toxickými i hořlavými rozpoštědly a její snadná automatizace umožňuje současné zpracování většího počtu vzorků.

Příklady použití různých typů úpravy biologického materiálu pro stanovení léčiv jsou uvedeny v souhrnné tabulce 2.

**Tabulka 2:** Příklady stanovení léků za použití HPLC.

Název léku	Detekce	Kolona	Úprava vzorku	Reference
amodiaquin	UV	Ph	LLE	97
arotinolol	UV	Chirobiotic	LLE	91
artesanat	MS	C-12	SPE	112
baclofen	UV	Chirobiotic	LLE	89
celiprolol	UV/FL	C-6/C-18	LLE	95
citalopram	FL	Ph	PD, SPE	77
cromakalim	UV	Chiralpak/Chiralcel	SPE	83
doxazosin	FL	C-18	PD	75
eupatilin	MS/MS	Ph-C-6	LLE	98
felodipin	MS/MS	C-18	LLE	110
fexofenadin	FL	C-18	SPE	82
fexofenadin	MS	CN	SPE	104
fluoxetin	FL	C-8	LLE	76

**Tabulka 2: Příklady stanovení léků za použití HPLC – pokračování.**

flurbiprofen	UV	Chirobiotic	LLE	84
glimepirid	MS/MS	C-18	LLE	108
ibuprofen	MS/MS	Chiralpak	LLE	90
lansoprazol	UV	Chiral CD-Ph	SPE	86
levosulpirid	FL	C-18	LLE	81
linezolid	MS/MS	CN/C-18	SPE	105
lisinopril	FL	C-18	SPE	74
lometrexol	UV/FL	C-6	SPE	94
loratadin	MS/MS	Ph	LLE	99
metformin	MS/MS	Katex	SPE	113
methylprednisolon	UV	C-8	PD	96
metoprolol	FL	CN	SPE	73
metoprolol	FL	C-6	SPE	93
moclobemid	MS	Ph	SPE	100
omeprazol	UV	Chiralpak/CN	SPE	92
procarbazin	MS/MS	C-18	PD	109
propofol	MS/MS	C-18	SPE	103
propofol	MS/MS	C-18	SPE	115
risperidon	MS	C-18	LLE	107
rosiglitazon	FL		PD	79
salbutamol	EC/FL	Katex/C-18	LLE	78
stobadin	MS/MS	C-18	SPE	114
sufentanil	MS/MS	C-18	SPE	117
sumatriptan	FL	C-18	LLE	80
ticlopidin	MS/MS	C-8	LLE	111
tramadol	FL	Chiralcel	LLE	87
troglitazon	EC	Chiralcel	LLE	88
tulobuterol	MS	CN	LLE	101
valdecoxib	MS/MS	C-8	SPE	116
vancomycin	UV	NH <sub>2</sub>	PD	106
vesamicol	UV	Chirobiotic	SPE	85
zolmitriptan	MS	CN	LLE	102

Vysvětlivky: MS - hmotnostně spektrometrická detekce

MS/MS - tandemová hmotnostně spektrometrická detekce

UV - spektrofotometrická detekce v ultrafialové oblasti

FL - fluorescenční detekce

EC - elektrochemická detekce

LLE - extrakce kapalina - kapalina

SPE - extrakce na pevné fázi

PD - precipitační deproteinace

Ph-C-6 - fenyl hexyl

ostatní viz. tabulka 1.

### 3.4 *Kritéria přijatelnosti analytické metody pro použití v klinické farmakologii*

Vzhledem k tomu, že výsledky chemických analýz prováděných nejen ve farmaceutickém, ale také v potravinářském a chemickém průmyslu, při vývoji a kontrole zemědělských produktů či při kontrole životního prostředí mají přímý vliv na zdraví a bezpečnost člověka, začaly se počátkem 70. let minulého století objevovat snahy o zavedení závazných norem, které by standardizovaly práci ve všech laboratořích, které provádějí výše uvedené analýzy. Cílem těchto snah bylo zajištění zpětné kontroly a minimalizace možností falšování výsledků.

První zákonnou normu souhrně formuloval v roce 1978 Úřad pro potraviny a léky (FDA - Food and Drug Administration) a v roce 1980 se její působnost rozšířila i na oblast životního prostředí a zemědělství. Tato norma je známa pod označením "Správná laboratorní praxe" (GLP - "Good Laboratory Practice"). V roce 1982 byly podobné zásady přijaty Organizací pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD), od níž je v roce 1986 v podstatě převzaly země Evropské unie. Předpisy pro GLP se zejména v Evropě dále vyvíjely a zatím poslední úpravu přijala OECD v roce 1997 a v návaznosti na ní Evropská unie v roce 2004. V České republice je v současnosti v návrhu nová vyhláška Ministerstva zdravotnictví a Ministerstva zemědělství, která formuluje pravidla GLP v oblasti léčiv a zpracovává příslušné předpisy Evropské unie do našeho právního řádu.

Součástí GLP jsou také požadavky na validaci bioanalytické metody a přesný popis pracovního postupu při jejím provádění (ten je zahrnut v souboru "Standardních operačních postupů" - SOP, který si vytváří každá laboratoř a její pracovníci jsou povinni se jimi řídit). Nejjasněji požadavky formulovala opět FDA [72], jejíž kritéria jsou přijímána v podstatě po celém světě. V Evropě vzniklo do současné doby několik dokumentů, které řeší tuto problematiku, kritéria se však dodnes nepodařilo úplně sjednotit.

V naší bioanalytické laboratoři vycházíme z požadavků FDA, které jsou v souboru pravděpodobně nejnáročnější. Validace představuje velkou serii měření, na kterých jsou ověřovány všechny požadované parametry. Specificita metody vůči endogenním látkám je testována nejméně na šesti nezávislých zdrojích čisté matrice,

stejně jako efekt matrice. U méně specifických metod (např. UV detekce) musí být prokázána také specifická vůči běžně používaným lékům, u všech metod pak vůči významným metabolitům. Musí být stanoven limit detekce (LOD – limit of detection) a nejnižší mez stanovitelnosti (LLOQ - lower limit of quantification) tedy nejnižší množství analytu, které je možné stanovit s požadovanou 20% přesností a sleduje se linearita kalibračního rozsahu. Dalším testovaným kritériem jsou přesnost a správnost a to jak v rámci jedné série vzorků tak i mezi jednotlivými seriemi měřeními v různé dny. Stanovuje se výtěžnost analytu, která musí být dostatečně konsistentní pro všechny koncentrace. Dále je sledována dlouhodobá stabilita analytu, která musí pokrýt celou dobu od odběru prvního vzorku po analýzu posledního vzorku dané studie, krátkodobá stabilita při laboratorní teplotě pokrývající minimálně dobu zpracování vzorku, stabilita opakovaně rozmrazených a zmrazených vzorků, stabilita zásobního roztoku analytu a stabilita vzorků po zpracování pokrývající dobu trvání analýzy jedné série vzorků farmakokinetické studie.

Všechny předložené publikace týkající se vývoje a validace analytických metod v sobě zahrnují výsledky testování všech výše uvedených parametrů.

### *3.5 Vývoj a validace analytické metody pro stanovení léčiv v biologickém materiálu*

#### **3.5.1 Stanovení azithromycinu v lidské plazmě**

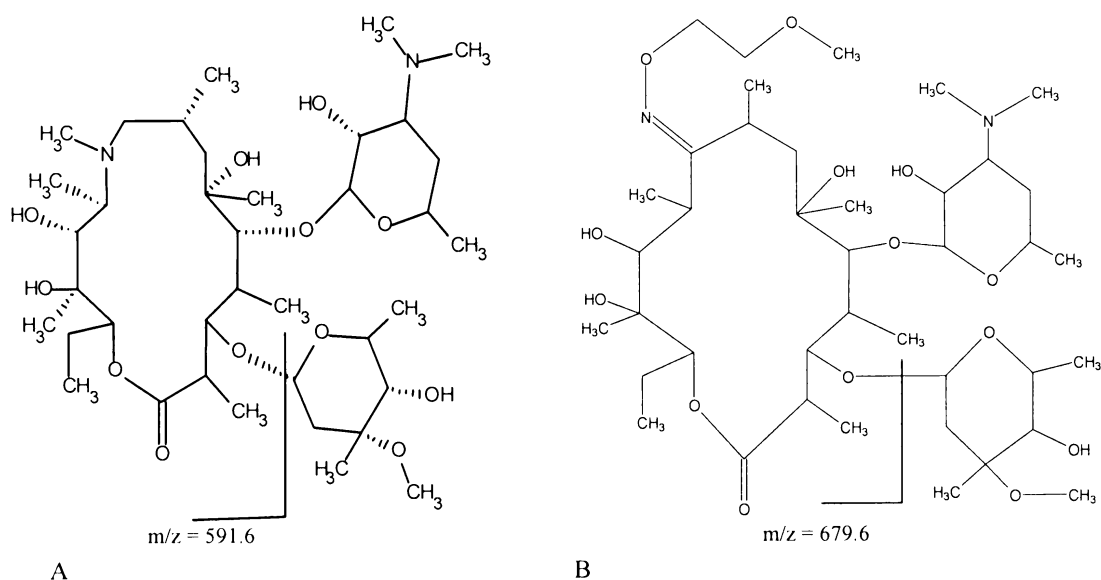
Azithromycin (AZI) je makrolidové antibiotikum odvozené od erythromycinu, na rozdíl od tohoto léčiva má v laktonovém kruhu navíc methylovaný dusík. Tato modifikace způsobuje výrazně vyšší antibakteriální potenciál proti gramnegativním bakteriím v porovnání s erythromycinem [118].

Azithromycin působí navázáním na velkou (50S) ribosomální podjednotku bakteriální buňky a postupně inhibuje syntézu polypeptidů řízenou m-RNA. To způsobuje buď zánik bakterií nebo zastavení jejich růstu v závislosti na organismu, jeho citlivosti k azithromycinu a koncentraci azithromycinu v infikované tkáni. Na rozdíl od

jiných makrolidových antibiotik není aktivita azithromycinu ovlivněna přítomností  $\beta$ -laktamasy a neinteraguje s cytochromem P450 [119].

Pro potřeby vyhodnocení bioekvivalenční studie po perorálním podání 250 mg azithromycinu bylo třeba vyvinout dostatečně citlivou, selektivní, rychlou a robustní metodu pro jeho stanovení v lidské plasmě. Podle dostupné literatury se jeho hladiny v plazmě po takovém podání pohybují v rozmezí 0,3 – 500,0 ng/mL [130-132].

Publikováno bylo několik HPLC metod. Metoda s UV detekcí [125] nebyla vhodná pro nízkou citlivost. Metody s elektrochemickou detekcí [120-124] vykazovaly dostatečnou citlivost, ale vyžadovaly poměrně dlouhou dobu analýzy vzhledem k interferencím endogenních látek. Dostatečně citlivá byla též metoda s fluorescenční detekcí [126]. Ta byla však nevhodná pro složité zpracování vzorku, včetně derivatizace analytu. Velmi citlivá byla metoda využívající průtokovou injekční analýzu (FIA) [127], uspořádání měřicí aparatury je však nepožitelné pro rutinní analýzu velkého množství vzorků. Analytický systém HPLC-MS/MS je dostatečně selektivní a umožňuje tedy výrazné zjednodušení úpravy vzorku a zkrácení samotného chromatografického stanovení. Dosud publikované metody využívající tuto techniku [128,129] však byly nedostatečně citlivé.



**Obr. 1:** Chemická struktura AZI a ROX a jejich pravděpodobná fragmentace.



Pro stanovení azithromycinu byl zvolen analytický systém HPLC-MS/MS. Zdrojem ionizace byl elektorprej (ESI). Roxithromycin (ROX) byl použit jako interní standard. Podařilo se nalézt velmi jednoduchý a rychlý způsob úpravy vzorku před analýzou pomocí ultrafiltrační deproteinace. Díky vysoké selektivě systému HPLC-MS/MS byla doba analýzy zkrácena na sedm minut. To umožnilo stanovit více než 180 vzorků na jednom analytickém systému za den. Podařilo se také dosáhnout výrazně vyšší citlivosti (LOD = 1,25 ng/mL, LLOQ = 2,55 ng/mL) oproti dosud publikovaným metodám pro systém HPLC-MS/MS. Malý objem injektovaného vzorku vedl k výraznému zvýšení životnosti analytické kolony. V rámci validace metody byla testována její přesnost, správnost, linearita, citlivost, specifická, selektivita, robustnost, výtěžnost analytu, vliv efektu matrice a stabilita analytu, Metoda vyhověla všem předepsaným validačním testům a byla použita pro vyhodnocení tří farmakokinetických studií, při nichž bylo odebráno a následně analyzováno více než šest tisíc vzorků lidské plasmy.

Publikovaná metoda je vhodná pro zkoumání farmakokinetických charakteristik azithromycinu v lidské plazmě při farmakokinetických studiích.

### 3.5.2 Společné stanovení simvastatinu a jeho hydroxykyseliny v lidské plazmě

Simvastatin (SIM) je reversibilní inhibitor mikrozomálního enzymu 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A-reduktasy (HMG-CoA-reduktasa) a je používán ke snížení hladiny cholesterolu. Mateřská látka je farmakologicky neaktivní lakton (prodrug, proléčivo), která je přeměněna na několik aktivních metabolitů. Nejvýznamějším z nich je hydroxykyselina simvastatinu (SIMA) [133-137]. Aktivní metabolity se koncentrují v játrech, tedy hlavním centru syntézy cholesterolu. Inhibice HMG-CoA reduktasy způsobuje pokles syntézy cholesterolu a zejména nárůst počtu receptorů pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL-receptory) umístěných v buněčných membránách jater [138] a ostatních tkáních. V literatuře [136,139] je popsáno lineární zvýšení inhibiční aktivity simvastatinu po perorálním podání dávky v rozmezí 5 – 120 mg.

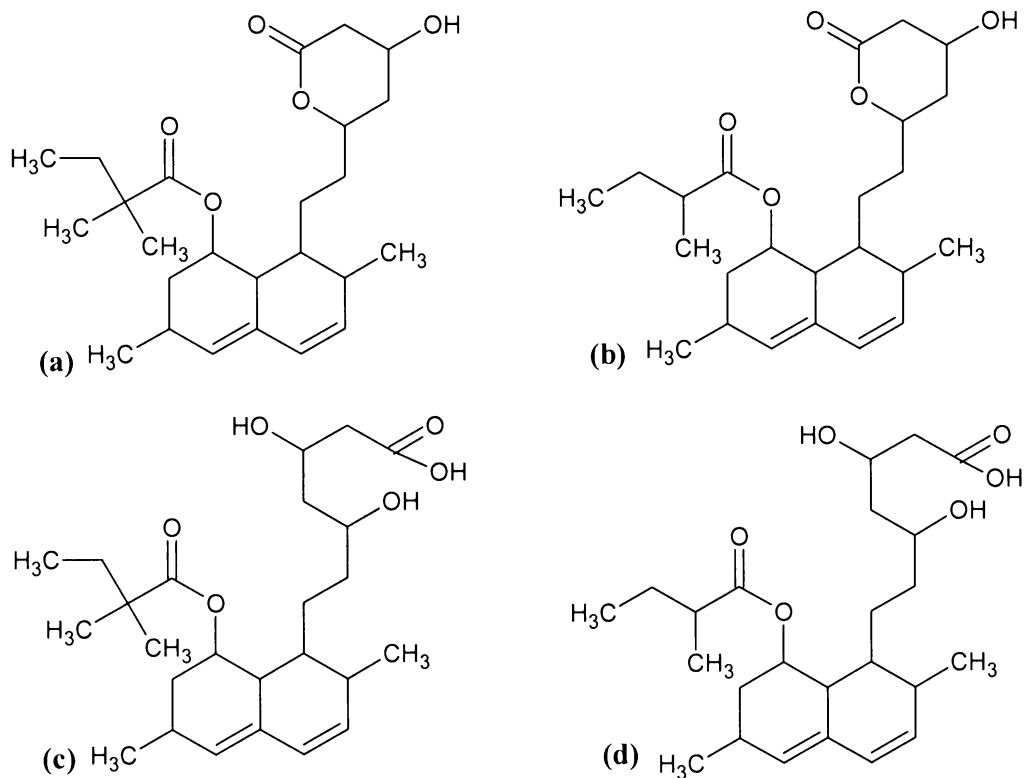
Bioekvivalenční studie předpokládala perorální podání 80 mg simvastatinu. V takovém případě se podle dostupné literatury pohybují hladiny simvastatinu a jeho aktivního metabolitu SIMA v rozmezí 0,2 – 15,0 ng/mL. Pro spolehlivé monitorování koncentrace obou látek bylo nutné dosáhnout LLOQ pro použitou metodu přibližně 0,1 ng/mL. Současně musela metoda splňovat požadavky na specifickost, rychlost, přesnost, správnost a robustnost.

Dostatečně citlivé byly publikované metody pro analytický systém GC-MS (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) [140,141]. Tyto metody však vyžadují velmi složitou proceduru úpravy vzorku před analýzou. Metody HPLC-UV (vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detekcí) [142,143] byly o poznání jednodušší, nebyly však dostatečně citlivé. HPLC s fluorescenční detekcí poskytovala podobně jako GC-MS vysoce citlivou metodu [144], která ale vyžadovala zdlouhavou derivatizaci analytů před analýzou.

Nejvhodnější se tedy zdál být analytický systém HPLC-MS/MS. První zveřejněná metoda využívající tento systém [145] popisovala metodu stanovení simvastatinu ve vodných vzorcích s LLOQ = 1 ng/mL. Tato koncentrace byla příliš vysoká pro účely farmakokinetické studie. Další práce [146] popisovala rychlé stanovení simvastatinu s dostatečnou citlivostí, ale nezabývala se stanovením jeho aktivního metabolitu SIMA. Publikace [147] zabývající se společným stanovením simvastatinu a SIMA byla poměrně citlivá (LLOQ = 0,5 ng/mL). Autoři však použili přímé spojení extrakce na pevné fázi (SPE) se systémem HPLC-MS/MS (on-line SPE-HPLC-MS/MS systém). Toto spojení je pro nevelkou prostupnost nevhodné pro rutinní analýzy, kde se stanovují stovky vzorků bezprostředně za sebou.

Při vlastním vývoji metody se jako nejvhodnější k úpravě vzorku ukázalo využití jednoduché extrakce na pevné fázi. Ta poskytovala dostatečnou výtěžnost analytů. Lovastatin (LOV) a hydroxykyselina lovastatinu (LOVA) byly použity jako interní standardy. Ke zvýšení citlivosti značnou měrou přispělo stanovení SIM a LOV po kladné ionizaci elektrosprayem (ESI+) a stanovení SIMA a LOVA po záporné ionizaci elektrosprayem (ESI-). Díky možnostem používaného přístroje bylo možno tento efekt využít během jedné analýzy po předchozí chromatografické separaci analytů. Doba analýzy jednoho vzorku se tak zkrátila na 4,5 min. Během jednoho dne tak bylo možné připravit a stanovit více než 250 vzorků. V rámci validace metody byla testována její přesnost, správnost, linearita, citlivost, specifickost, selektivita, robustnost, výtěžnost

analytu, vliv efektu matrice a stabilita analytu. Metoda vyhověla všem předepsaným validačním testům a byla použita pro vyhodnocení farmakokinetické studie, již se zúčastnilo 72 dobrovolníků a bylo odebráno a následně analyzováno více než tři tisíce vzorků lidské plasmy.



**Obr. 2:** Chemická struktura SIM (a), LOV (b), SIMA (c), LOVA (d).

Publikovaná metoda je vhodná pro zkoumání farmakokinetických charakteristik simvastatinu a jeho aktivního metabolitu SIMA v lidské plazmě při farmakokinetických studiích.

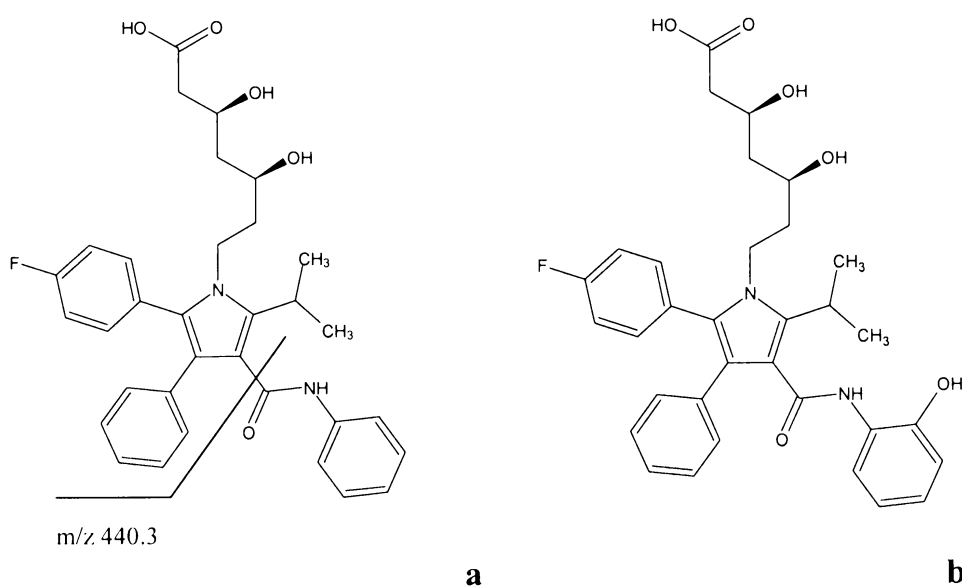
### 3.5.3 Společné stanovení atorvastatinu a 2-hydroxyatorvastatinu v lidské plazmě

Atorvastatin, (ATV) podobně jako simvastatin patří do skupiny látek snižujícím hladinu cholesterolu inhibicí HMG-CoA-reduktasy. Zvyšuje také počet

LDL-receptorů, které způsobují zvýšený záchyt LDL a jeho odbourávání. Dále také snižuje dosud nepopsaným mechanismem hladiny triglyceridů. Tyto účinky v závislosti na dávce atorvastatinu byly popsány u pacientů trpících vysokým obsahem cholesterolu a triglyceridů [148-150].

Atrovastatin je podáván ve formě vápenaté soli aktivní hydroxykyseliny, která je substrátem cytochromu P450 3A4. Ten jej metabolisuje na dva aktivní metabolity: 2-hydroxyatorvastatin a 4-hydroxyatorvastatin [148-150,152,153]. Koncentrace 4-hydroxy-atorvastatinu v plazmě jsou však tak nízké, že nelze sledovat jeho farmakokinetické charakteristiky [151].

Bioekvivalenční studie předpokládala perorální podání 80 mg atorvastatinu. Nalezené hladiny atorvastatinu a 2-hydroxyatorvastatinu (HATV) při podání takového množství se podle literatury pohybovaly v rozmezí 0,1-20,0 ng/mL. Pro spolehlivé monitorování koncentrace atorvastatinu a HATV bylo nutné dosáhnout LLOQ pro použitou metodu přibližně 0,1 ng/mL. Současně musela metoda splňovat požadavky na specificitu, rychlost, přesnost, správnost a robustnost.



**Obr. 3:** Chemická struktura ATV a HATV a jejich pravděpodobná fragmentace.

Bylo publikováno několik metod pro stanovení atorvastatinu a HATV. Spojení HPLC s UV detekcí [153] bylo úspěšně aplikováno na stanovení atorvastatinu v

lékových tabletách. Pulsní voltametrie [154] byla použita pro jeho stanovení v lidské plazmě, bohužel tato metoda měla příliš nízkou citlivost. Nejvíce nalezených publikací využívalo analytické systémy HPLC-MS/MS [155-157]. Přestože tyto metody využívaly buď poměrně složité chromatografické uspořádání [155], nebo vyžadovaly složitou úpravu vzorku včetně dvojnásobné extrakce [157], nebylo možno jimi stanovit takové koncentrace atorvastatinu a HATV, jaké byly nalezeny v lidské plazmě po podání terapeutické dávky.

Pro úpravu vzorku byly zkoušeny různé extrakční postupy. Nejvyšší výtěžnost a zároveň největší možnost zakoncentrování analytů před analýzou byla nalezena při extrakci z kapliny do kapliny za použití extrakční směsi diethylether-dichlormethan v poměru 60:40. Vzhledem k vysoké specifitě použitého systému HPLS-MS/MS s ESI+ ionizací mohla být zjednodušena chromatografie a délka analýzy jednoho vzorku nepřesáhla 4 min. Během jednoho dne tak bylo možné připravit a stanovit více než 250 vzorků. Podařilo se i s dostatečnou správností a přesností (do 20%) stanovit LLOQ na 0,1 ng/mL pro obě sledované látky, přčemž limit detekce byl 0,02 ng/mL pro atorvastatin a 0,07 ng/mL pro HATV. V rámci validace metody byla testována její přesnost, správnost, linearita, citlivost, specifita, selektivita, robustnost, výtěžnost analytu, vliv efektu matrice a stabilita analytu, Metoda vyhověla všem předepsaným validačním testům a byla použita pro vyhodnocení farmakokinetické studie, při které bylo odebráno a následně analyzováno více než dva tisíce vzorků lidské plasmu.

Publikovaná metoda je vhodná pro zkoumání farmakokinetických charakteristik atorvastatinu a jeho aktivního metabolitu HATV v lidské plazmě při farmakokinetických studiích.

### 3.5.4 Stanovení quetiapinu v lidské plasmě

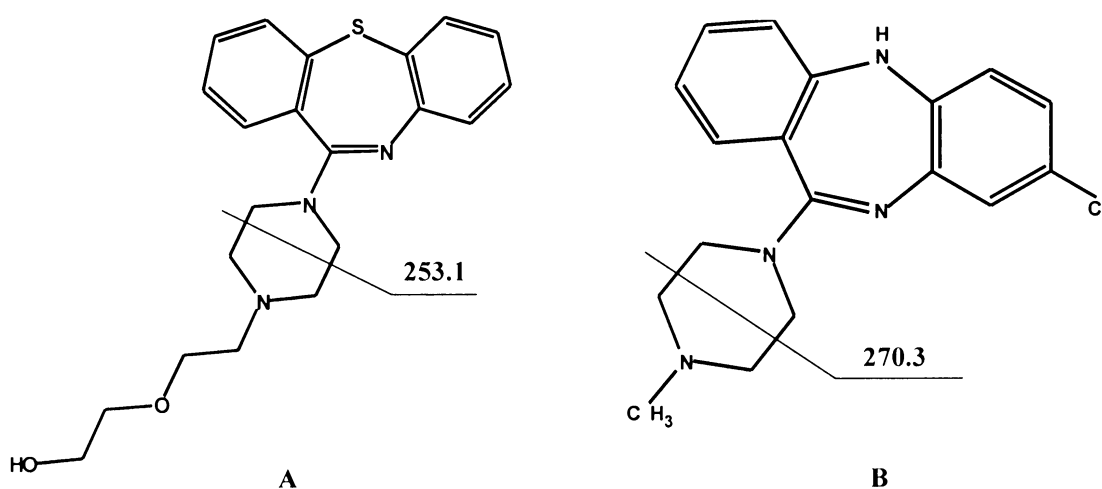
Quetiapin (QUE) je antipsychotická látka náležící do nové skupiny léků odvozených od dibenzothiazepinu [158-161]. Je využíván při léčbě schizofrenie nebo manických stavů souvisejících s rozdělením osobnosti. Tato skupina léků se vyznačuje výrazně nižšími vedlejšími účinky než mají dosud používané preparáty. Z tohoto důvodu zaznamenal quetiapin velký nárůst používání v klinické praxi, který vyústil ve vývoj nových farmaceutických přípravků obsahujících tuto látku. Společně s tím

vznikla potřeba nové analytické metody pro stanovení QUE v lidské plasmě, která by byla vhodná pro využití při farmakologických studiích.

Bioekvivalenční studie předpokládala perorální podání 100 mg QUE. V takovém případě se podle dostupné literatury [162,163] pohybují hladiny léčiva v lidské plazmě v rozmezí 1,5 – 350,0 ng/mL. Pro spolehlivé monitorování koncentrace obou látek bylo nutné dosáhnout LLOQ pro použitou metodu přibližně 1,5 ng/mL. Současně musela metoda splňovat požadavky na specifitu, rychlost, přesnost, správnost a robustnost.

Dosud bylo publikováno několik HPLC metod pro stanovení QUE. Většina z nich využívala UV detekci [164-166]. Žádná z nich však nebyla dostatečně citlivá pro monitorování hladin této látky po podání terapeutické dávky další pak vyžadovala velmi složitou úpravu vzorku před analýzou [167]. To byl případ publikovaných metod využívajících techniku GC-MS [168,169], kde musel být analyt před analýzou derivatizován.

Dvě publikace popisovaly využití analytického systému HPLC-MS [167,170]. První z nich [167] porovnávala využití UV detekce a MS/MS detekce. Ačkoli využívala plně automatizovanou úpravu vzorku, doba analýzy byla 35 min. Za jeden den bylo tedy možno stanovit pouze 40 vzorků a to nebylo pro potřeby farmakokinetické studie vyhovující. Druhá metoda [170] popisovala společné stanovení clozapinu, olanzapinu, risperidonu a quetiapinu v lidské plazmě. Zde však byla použita dvojnásobná extrakce a metoda nebyla dostatečně citlivá.



**Obr. 4:** Chemická struktura QUE a CLO a jejich pravděpodobná fragmentace.

Žádný z dosud publikovaných způsobů úpravy vzorku před analýzou se neukázal vhodný. Nejlepší výtěžnost a zároveň čistotu výsledného roztoku přinesla extrakce na pevné fázi po alkalizaci původního vzorku lidské plazmy. Klozapin (CLO) byl použit jako interní standard. Pro samotnou analýzu byl použit systém HPLC-MS/MS s využitím pozitivního elektrospraye (ESI+) jako zdroje ionizace. Vzhledem k použití této vysoce selektivní techniky nebyla nutná úplná separace analytu. To vedlo k výraznému zkrácení doby analýzy na 3 min. Během jednoho dne tak bylo možné stanovit více než 250 vzorků. Citlivost metody pak byla dokonce vyšší, než bylo původně požadováno, LLOQ bylo stanoveno na 1,0 ng/mL a LOD vypočteno na 0,4 ng/mL. V rámci validace metody byla testována její přesnost, správnost, linearita, citlivost, specifická, selektivita, robustnost, výtěžnost analytu, vliv efektu matrice a stabilita analytu, Metoda vyhověla všem předepsaným validačním testům a byla použita pro vyhodnocení farmakokinetické studie, jíž se zúčastnilo 36 dobrovolníků a bylo odebráno a následně analyzováno více než 1500 vzorků lidské plazmy.

Publikovaná metoda je vhodná pro zkoumání farmakokinetických charakteristik quetiapinu v lidské plazmě při farmakokinetických studiích.

## Literatura

- [1] M. Tichý: *Účinnost xenobiotik a chemická struktura*. Avicenum, Praha 1983.
- [2] M. Tichý: *Příspěvek k predikční toxikologii (analýza QSAR)*. Habilitační práce. Přírodovědecká fakulta UK Praha, 1993.
- [3] R. Zahradník, M. Chvapil. *Experientia* **16** (1960), 511-514.
- [4] C. Hansch a kol. *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963), 2817-2825.
- [5] S.F. Free, J.W. Wilson. *J. Med. Chem.* **7** (1964), 393-399.
- [6] M. Tichý: Analýza kvantitativních vztahů mezi chemickou konstitucí xenobiotik a jejich biologickou účinností. V knize: *Nové směry v analytické chemii* (J. Zýka, red.), svazek V. SNTL, knižnice technických aktualit, 1989, str. 217-246.
- [7] M. Tichý: Prediction of Adverse Activities from Physicochemical Properties of the Vapor and Gasses (QSAR analysis). V knize: *Modeling of Inhalation Exposure to Vapors: Uptake, Distribution and Elimination* (V. Fiserova-Bergerova, red.), Vol 2, kap. 1. CRC Press, Inc., Gainesville, Florida, 1983, str. 3-35.
- [8] M. Tichý. *Prac. Lék.* **35** (1983), 79-85.
- [9] M. Tichý. *Prac. Lék.* **35** (1983), 120-124.
- [10] M. Tichý, M. Rucki. *Prac. Lék.* **48** (1996), 225-230.
- [11] M. Tichý, M. Cikrt, Z. Roth, M. Rucki. *SAR QSAR Environ. Res.* **9** (1998), 155-169.
- [12] M. Štěpánek a kol.: *Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví..* Avicenum, Praha, 1982, str. 355.
- [13] Oborová norma „*Test akutní toxicity na rybách a dalších vodních živočiších*“, ON 46 68 07, ÚNM Praha, 1989.
- [14] M. Chvapil, R. Zahradník, B. Čmucharlová. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **135** (1962), 330-343.
- [15] R. Zahradník. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **135** (1962), 311-329.
- [16] M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki: Worms (*Tubifex tubifex*) and partition coefficients for estimation of acute toxicity. V knize: *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*. (M. Balls, A.-M. van Zeller, M.E. Halder, red.), ISBN 0-444-50529-6, Elsevier Science B.V., 2000, str. 513-520.
- [17] C.L. Russom, S.P. Bradbury, S.J. Broderius, D.E. Hammermeister, R.A. Drummond. *Environ. Tox. Chem.* **16** (1997), 948-968.
- [18] C.S. Weil. *Biometrics* **8** (1952), 249-263.
- [19] M. Tichý, M. Rucki, T.W. Schultz. *International Society for the Studies of Xenobiotics Proceedings*, **5** (1994), 55.
- [20] *Complex Mixtures* (Committee on Method for the In Vivo Toxicity Testing of Complex Mixtures, red.), National Academy Press, Washington D.C., 1988
- [21] *Water Quality Criteria for European Freshwater Fish*. Revised report on combined effects of freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. EIFAC Technical Paper. Revised version 1987, str. 2-12.
- [22] F. Chen, J. Holten-Andersen, H. Tyle. *Chemosphere* **26** (1993), 1325-1354.
- [23] C.I. Bliss. *Ann. Appl. Biol.* **26** (1939), 585-615.
- [24] R.L. Plackett, P.S. Hewlett. *Ann. Appl. Biol.* **35** (1948), 347-358.
- [25] P.S. Hewlett, R.L. Plackett. *Ann. Appl. Biol.* **38** (1950), 527.
- [26] R.L. Plackett, P.S. Hewlett. *J.R. Statist. Soc.* **14** (1952), 141-163.
- [27] P.S. Hewlett, R.L. Plackett. *Biometrics* **15** (1959), 591-610.
- [28] R.L. Plackett, P.S. Hewlett. *Biometrics* **19**, (1963) 517- 531.
- [29] P.S. Hewlett, R.L. Plackett. *Biometrics* **20** (1964), 566-575.
- [30] R.L. Plackett, P.S. Hewlett. *Biometrics* **23** (1967), 27-44.
- [31] P.S. Hewlett, R.L. Plackett: *An Introduction to the Interpretation of Quantal Responses in Biology*. London, Edward Arnold Press, 1979.
- [32] D.J. Finney: *Probit Analysis*. Cambridge University Press, the 3rd Edition, 1971.
- [33] S. Loewe, H. Muischnek. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **114** (1926), 313-326.
- [34] P.D. Anderson, L.J. Weber: The multiple toxicity of certain heavy metals: additive actions and interactions. V knize: *Proceedings of the Workshop on Toxicity to Biota of Metal Forms in Natural Waters* (R.W. Andrew, P.V. Hodson and D. E. Konasewich, red.). International Joint Commission Research Advisory Board, Windsor, Canada, 1976, str. 263-282.
- [35] J.B. Sprague, B.A. Ramsay. *J. Fish. Res. Board Can.* **22** (1965), 425-432.
- [36] G. Poch. *Arzneim. Forsch.* **31** (1981), 1135-1140.



- [37] G. Poch. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68** (1990), 682-688.
- [38] M Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki, J. Reitmajer, L. Felzl. *Int. Arch. Occup. Environ Health* **75** (2002), Suppl. S133-S136.
- [39] D.J. Finney. *Ann. Appl. Biol.* **29** (1942), 82-94.
- [40] H. Köneman. *Toxicology* **19** (1981), 229-238.
- [41] J. Hermens, P. Leeuwangh, A. Musch. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **8** (1984), 388-394.
- [42] J. Hermens, F. Buser, P. Leeuwangh, A. Musch. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **9** (1985), 17-25.
- [43] R.A. Lehfeldt. *Phil. Mag.* **46** (1898), 42-59.
- [44] B.H. Carrol, G.K. Rollefson, J.H. Mathews. *J. Am. Chem. Soc.* **47** (1925), 1785-1791.
- [45] R. Fritzweiler, K.R. Dietrich. *Angewandte Chemie* **46** (1933), 241-242.
- [46] S.R.:M. Ellis. *Trans Instn. Chem. Engrs.* **30** (1952), 58-64.
- [47] A.R. Martin, B. Collie. *J. Chem. Soc.* **135** (1932), 2658-2665.
- [48] G. Kortüm, H.J. Freier, F. Woerner. *Chemie Ing. Techn.* **25** (1953), 125-133.
- [49] G. Weissenberger, R. Henke, F. Kawenoki. *J. Prakt. Chem.* **113** (1926), 171-179.
- [50] A.R. Martin, C.M. George. *J. Chem. Soc.* **136** (1933), 1413-1416.
- [51] M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, D. Matoušová, M. Rucki, L. Felzl, Z. Roth. *SAR QSAR Environ. Res.* **13** (2002), 261-269.
- [52] M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki, L. Felzl: Predictive Toxicology and Mixtures of Chemicals. V knize: *Predictive Toxicology of Chemicals: Experiences and Impact of AI Tools* (G.C. Ginni, A.R. Karitzky, red), ISBN 1-57735-073-1, AAAI Press, Menlo Park, CA, 1999, str.152-155.
- [53] M. Tichý, M. Rucki, V. Bořek-Dohalský, L. Felzl: Partition Coefficients of Binary Mixtures of Chemicals: Possibility for the QSAR Analysis. V knize: *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity* (K. Gundertofte, F.S. Jorgensen, red.), ISBN 0-306-46217-6, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000, str. 311-313.
- [54] C.L. Arthur, D.W. Potter, K.D. Buchholz, S. Motlagh, J. Pawliszyn. *LC-GC* **10** (1992), 656-661.
- [55] C.L. Arthur, L.M. Killam, S. Motlagh, L. Lim, D.W. Potter, J. Pawliszyn. *Environ. Sci & Technol.* **26** (1992), 979-983.
- [56] C.L. Arthur, K. Pratt, S. Motlagh, J. Pawliszyn. *J. High Res. Chromatogr.* **15** (1992), 741-744.
- [57] J. Pawliszyn: *Applications of Solid Phase Microextraction*. RSC Chromatography Monographs, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [58] R. Eisert, K. Levsen. *J. Chromatogr. A* **733** (1996), 143-157.
- [59] V. Bořek-Dohalský, J. Reitmajer, M. Rucki, D. Matoušová, M. Tichý: Test with worms *Tubifex tubifex* and gas/liquid distribution coefficients: acute toxicity of mixtures of chemicals. Zasláno do sborníku ATLA 2002, sborník bohužel dodnes nevyšel, publikace je v příloze.
- [60] L. Bažant. *Kandidátská disertační práce*. Katedra analytické chemie PFF UK, Praha, 1992.
- [61] M. Gibaldi, D. Perrier. *Pharmacokinetics*, Marcel Dekker, New York, 2. vydání, 1992.
- [62] M. Rowland, G. Tucker. *Pharmacokinetics: Theory and Methodology*. Pergamon, Oxford, 1986.
- [63] P.G. Welling, F.L.S. Tse. *Pharmacokinetics, Regulatory, Industrial, Academic Perspectives*. Merce Dekker, New York, 1986.
- [64] L. Zathurecký, M. Chalabala, I. Janků, Z. Modr. *Biofarmácia a farmakokinetika*. Vydavateľstvo Osveta, Martin, 1989.
- [65] U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, H. Lingeman. *J. Chromatogr.* **492** (1989), 251.
- [66] J. Zýka a kol. *Analytická příručka*, SNTL, Praha, 1979, díl 1., kap. 12-19.
- [67] P.T. Kissinger. *J. Chromatogr.* **488** (1989), 31.
- [68] K.L. Busch. *Guide to Mass Spectrometry*. VCH, 2000.
- [69] J. Barker. *Mass Spectrometry*, Wiley, 1999.
- [70] J.T. Watson. *Introduction to Mass Spectrometry*. Wiley, 1997.
- [71] W.M.A. Niessen. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*. Chromatographic Science Series Vol. 79, Second Edition, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [72] *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, 2001.
- [73] J. Fang, H.A. Semple, J.X. Song. *J. Chromatogr. B* **809**(2004), 9-14.
- [74] O. Sagirli, L. Ersoy. *J. Chromatogr. B* **809**(2004), 159-165.
- [75] P. Sripalakit; P. Nermhom, A. Saraphanchotiwitthaya. *J-Chromatogr-Sci.* **43**(2005), 63-66.
- [76] S. Erturk, S.M. Cetin, S. Atmaca, L. Ersoy, G. Baktur. *Ther-Drug-Monit.* **27** (2005), 38-43.
- [77] Q.H. Meng, D. Gauthier. *Clin-Biochem.* **38**(2005), 282-285.
- [78] J. Ouyang, J.L. Duan, W.R.G. Baeyens, J.R. Delanghe. *Talanta* **65** (2005), 1-6.

- [79] K.A. Kim, J.Y. Park. *Biomed. Chromatogr.* **18**(2004), 613-615.
- [80] Z. Ge, E. Tessier, L. Neirinck, Z. Zhu. *J. Chromatogr. B* **806**(2004), 299-303.
- [81] S.E. Jin, E.M. Ban, Y.B. Kim, C.K. Kim. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**(2004), 929-936.
- [82] T. Uno, N. Yasui-Furukori, T. Takahata, K. Sugawara, T. Tateishi. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**(2004), 937-942.
- [83] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali. *Sep-Sci-Technol.* **39**(2004) 2389-2400.
- [84] F. Pehourcq, M. Matoga, C. Jarry, B. Bannwarth. *Biomed. Chromatogr.* **18**(2004), 330-334.
- [85] M.M. Hefnawy, H.Y. Aboul-Enein. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**(2004), 535-543.
- [86] M. Miura, H. Tada, T. Suzuki. *J. Chromatogr. B* **804** (2004), 389-395.
- [87] M.A. Campanero, E. Garcia-Quetglas, B. Sadaba, J.R. Azanza. *J. Chromatogr. A* **1031** (2004), 219-228.
- [88] N. Suzuki, N. Miyashita, A. Kotani, F. Kusu, T. Kawasaki. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**(2004), 155-161.
- [89] M.M. Hefnawy, H.Y. Aboul-Enein. *Talanta* **61** (2003), 667-673.
- [90] P.S. Bonato, M.P.F.M del-Lama, R. de-Carvalho. *J. Chromatogr. B* **796**(2003), 413-420.
- [91] H.Y. Aboul-Enein, M.M. Hefnawy. *Biomed. Chromatogr.* **17**(2003), 453-457.
- [92] R.M. Orlando, P.S. Bonato. *J. Chromatogr. B* **795**(2003), 227-235.
- [93] S. Albers, J.P. Elshoff, C. Voelker, A. Richter, S. Lacer. *Biomed. Chromatogr.* **19**(2005), 202-207.
- [94] S.R. Wedge, S. Laohaviniij, G.A. Taylor, D.R. Newell. *J. Chromatogr. B* **663** (1995), 327-335.
- [95] R. Verbesselt, A. Zugravu, T.B. Tjandramaga, P.J. De-Schepper. *J. Chromatogr. B* **683** (1996), 231-236.
- [96] T.B. Vree, A.J. Lagerwerf, C.P.W.G.M. Verwey-van-Wissen, P.J.H. Jongen. *J. Chromatogr. B* **732** (1999), 337-348.
- [97] E.N. Gitau, S.N. Muchohi, B.R. Ogutu, I.M. Githiga, G.O. Kokwaro. *J. Chromatogr. B* **799** (2004), 173-177.
- [98] H.W. Lee, H.Y. Ji, H.H. Kim, I.K. Kim, S.H. Kim, W.B. Kim, H.S. Lee. *Chromatographia.* **59**(2004), 425-428.
- [99] I.I. Salem, J. Idrees, J.I. Al-Tamimi. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34** (2004) 141-151.
- [100] J.M. Hoskins, A.S. Gross, G.M. Shenfield, L.P. Rivory. *J. Chromatogr. B* **754** (2001), 319-326.
- [101] F.G. Xu, Z.J. Zhang, Y. Tian, H.Y. Jiao, J.B. Liang, G.Q. Gong. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37** (2005), 187-193.
- [102] Z.J. Zhang, F.G. Xu, Y.A. Tian, W. Li, G.G. Mao. *J. Chromatogr. B* **813** (2004), 227-233.
- [103] L. Bajpai, M. Varshney, C.N. Seubert, D.M. Dennis. *J. Chromatogr. B* **810** (2004), 291-296.
- [104] U. Hofmann, M. Seiler, S. Drescher, M.F. Fromm. *J. Chromatogr. B* **766** (2002), 227-233.
- [105] O.A. Phillips, M.E. Abdel-Hamid, N.A. Al-Hassawi. *Analyst* **126**(2001), 609-614.
- [106] H. Hosotsubo. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **79** (1989), 421-427.
- [107] L. Zhang, Z. Jiao, Z.Q. Yao, Y. Zhong, M.K. Zhong, Y.Q. Yu. *Chromatographia.* **61**(2005) 245-251.
- [108] I.I. Salem, J. Idrees, J.I. al-Tamimi. *J. Chromatogr. B* **799** (2004), 103-109.
- [109] X. He, T.T. Batchelor, S. Grossman, J.G. Supko. *J. Chromatogr. B* **799** (2004), 281-291.
- [110] L.H. Miglioranza, R.E. Barrientos-Astigarraga, B.S. Schug, H.H. Blume, A.S. Pereira, G. de-Nucci. *J. Chromatogr. B* **814** (2005), 217-223.
- [111] N.C do-Carmo-Borges, G. Duarte-Mendes, A. Borges, S. Evandir-de-Oliveira, R.E. Barrientos-Astigarraga, G. de-Nucci. *J. Mass. Spectrom.* **39**(2004), 1562-1569.
- [112] H. Naik, D.J. Murry, L.E. Kirsch, L. Fleckenstein. *J. Chromatogr. B* **816** (2005), 233-242.
- [113] N. Koseki, H. Kawashita, M. Niina, Y. Nagae, N. Masuda. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2005), 1063-1072.
- [114] M.E. Abdel-Hamid, L. Novotny, M. Stankovicova, L. Benes. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28** (2005), 383-393.
- [115] L. Bajpai, M. Varshney, C.N. Seubert, D.M Dennis. *J. Chromatogr. B* **810** (2004), 291-296.
- [116] J.Y. Zhang, D.M. Fast, A.P. Breau. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33** (2003), 61-72.
- [117] L. Palleschi, L. Lucentini, E. Ferretti, F. Anastasi, M. Amoroso, G. Draisci. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003), 329-336.
- [118] S. Ripa, I. Ferrante, M Prena, *Chemotherapy* **42** (1996), 402-409.
- [119] C.J. Dunn, L.B. Barradell, *Drugs* **51** (1996), 483-505.
- [120] R. Gandhi, C.L. Kaul, R. Panchagnula, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23** (2000), 1073-1078.
- [121] F. Kees, S. Spangler, M. Wellenhofer, *J. Chromatogr. A* **812** (1998), 287-393.
- [122] M. Hedenmo, B.M. Eriksson, *J. Chromatogr. A* **692** (1995), 161-166.
- [123] H. Toreson, B.M. Eriksson, *J. Chromatogr. B* **673** (1995), 81-89.

- [124] C. Taninaka, H. Ohtani, E. Hanada, H. Kotaki, H. Sato, T. Iga, *J. Chromatogr. B* **738** (2000), 405-411.
- [125] C. Stubbs, J.M. Haigh, I. Kanfer, *J. Pharm. Sci.* **74** (1985), 1126-1128.
- [126] J. Sastre Torano, H.J. Guchelaar, *J. Chromatogr. B* **720** (1998), 89-97.
- [127] Z. Song, C. Wang, *Bioorganic and Medical Chem.* **11** (2003), 5375-5380.
- [128] J. Jiao, A.J. Carella, G.S. Steeno, R.T. Darrington, *Int. J. Mass Spectrom.* **216** (2002), 209-218.
- [129] D.F. Zhong, X.G. Shi, L. Sun, X.Y. Chen, *J. Chromatogr. B* **791** (2003), 45-53.
- [130] D.R. Luke, G. Foulds, *Clinical Pharm. and Ther.* (1997), 641-648.
- [131] G.W. Amsden, A.N. Nafzinger, G. Foulds, L.J. Cabelus, *J. Clin. Pharmacol.* **40** (2000), 1522-1527.
- [132] G.A. Shabir, *J. Chromatogr. A*, **987** (2003), 57-66.
- [133] Martindale, *The Extra-Pharmacopoeia, 30th Edition*, The Royal Pharmaceutical Society, 1993, pp. 993-994.
- [134] H. Lennernäs, G. Fager, *Clin. Pharmacokinet.* **32** (1997), 403-425.
- [135] V.F. Mauro, *Clin. Pharmacokinet.* **24** (1993), 195-202.
- [136] J.-P. Desager, Y. Horsmans, *Clin. Pharmacokin.* **31** (1996), 348-371.
- [137] J.J. Lilja, K.T. Kivistö, P.J. Neuvonen, *Clin Pharm. Ther.* **64** (1998), 477-483.
- [138] S.M. Grundy, *New Engl. J. Med.* **319** (1988), 24-33.
- [139] *Arzneimittel-Kompendium der Schweiz*<sup>k</sup> 1999, 1998, pp. 2657 - 2659.
- [140] T. Takano, S. Abe, S. Hata, *Biomed. Environ. Mass Spectr.* **19** (1990), 577-586.
- [141] M.J. Morris, J.D. Gilbert, J.Y.-K. Hsieh, B.K. Matuszewski, H.G. Ramjit, W.F. Bayne, *Biomed. Environ. Mass Spectr.* **22** (1993), 1-8.
- [142] L. Wang, M. Asgharnjad, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21** (2000), 1243-1248.
- [143] G. Carlucci, P. Mazzeo, L. Biordi, M. Bologna, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10** (1992), 693-697.
- [144] H. Ochiai, N. Uchiyama, K. Imagaki, S. Hata, T. Kamei, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **694** (1997), 211-217.
- [145] X.S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A* **998** (2003), 133-141.
- [146] H. Yang, Y. Feng, Y. Luan, *J. Chromatogr. B* **785** (2003), 369-375.
- [147] M. Jemal, Z. Ouyang, M.L. Powell, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23** (2000), 323-340.
- [148] *Lipitor Tablets*, 10 mg, 20 mg, 40 mg, Summary of Product Characteristics, Parke Davis, UK, October 2002.
- [149] *Sortis® 10 mg, 20 mg, 40 mg*, Souhrn údajů o přípravku (Summary of Product Characteristics in Czech), PARKE-DAVIS GmbH, Germany, February 5, 2003.
- [150] A.P. Lea, D. McTavish, *Drugs* **53** (1997), 828-847.
- [151] T. Kantola, K.T. Kivistö, P.J. Neuvonen, *Clin Pharmacol Ther.* **64** (1998), 58-65.
- [152] J.J. Lilja, K.T. Kivistö, P.J. Neuvonen, *Clin Pharmacol Ther.* **66** (1999), 118-127.
- [153] S. Ertuk, E.S. Aktas, L. Ersoy, S. Ficiocioglu, *J Pharm Biomed Anal.* **33** (2003), 1017-1023.
- [154] N. Erk, *Crit Rev Anal Chem* **34** (2004), 1-7.
- [155] C.K. van Pelt, T.N. Corso, G.A. Schultz, S. Lowes, J. Henion, *Analytical chemistry* **73** (2001), 582-588.
- [156] M. Jemal, Z. Ouyang, B.C. Chen, D. Teitz, *Rapid-Commun-Mass-Spectrom* **13** (1999), 1003-1015.
- [157] W.W. Bullen, R.A. Miller, R.N. Hayes, *J Am Soc Mass Spectrom* **10** (1999), 55-66.
- [158] *The Complete Drug Reference* (monograph on CD-ROM), Pharmaceutical Press, London, 2003.
- [159] *Seroquel™*, Summary of Product Characteristics, AstraZeneca UK Limited, 23 2003.
- [160] [http://www.rxlist.com/cgi/generic2/quetiap\\_pi.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic2/quetiap_pi.htm), 31 (2003).
- [161] C.L. DeVane, C.B. Nemeroff, *Clin. Pharmacokin.* **40** (2001), 509.
- [162] P.T. Thyrum, Y.W. Wong, C. Yeh, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **24** (2000), 521.
- [163] E. Diletti, D. Hauschke, V.W. Steinijans, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* (1991) 29.
- [164] P.C. Davis, J. Wong, O. Gefvert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20** (1999), 271.
- [165] R. Mandrioli, S. Fanali, A. Ferranti, M.A. Raggi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002), 969.
- [166] C. Frahnert, M.L. Rao, K. Grasmaeder, *J. Chromatogr. B*, **794** (2003), 35.
- [167] J. Hasselstrom, K. Linet, *J. Chromatogr. B* **798** (2003), 9.
- [168] D.T. Anderson, K.L. Fritz, *J. Anal. Toxicol.* **24** (2000), 300.
- [169] A. Pelander, I. Ojanpera, J. Sistonen, I. Rasenen, E. Vuori, *J. Anal. Toxicol.* **27** (2003), 226.
- [170] Z. Zhou, X. Li, K. Li, Z. Xie, Z. Cheng, W. Peng, F. Wang, R. Zhu, H. Li, *J. Chromatogr. B* **802** (2004), 257.

## Příloha

### SEZNAM PŘIKLÁDANÝCH PUBLIKACÍ

1. M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki, L. Felzl: Predictive Toxicology and Mixtures of Chemicals. V knize: *Predictive Toxicology of Chemicals: Experiences and Impact of AI Tools* (G.C. Ginni, A.R. Karitzky, red.), ISBN 1-57735-073-1, AAAI Press, Menlo Park, CA, 1999, str.152-155.
2. M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki: Worms (*Tubifex tubifex*) and partition coefficients for estimation of acute toxicity. V knize: *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*. (M. Balls, A.-M. van Zeller, M.E. Halder, red.), ISBN 0-444-50529-6, Elsevier Science B.V., 2000, str. 513-520.
3. M. Tichý, M. Rucki, V. Bořek-Dohalský, L. Felzl: Partition Coefficients of Binary Mixtures of Chemicals: Possibility for the QSAR Analysis. V knize: *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity* (K. Gundertofte, F.S. Jørgensen, red.), ISBN 0-306-46217-6, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000, str. 311-313.
4. M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, M. Rucki, J. Reitmajer, L. Felzl. Risk Assessment of Mixtures: Possibility of Prediction of Interaction Between Chemicals. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **75** (2002), Suppl. S133-S136.
5. M. Tichý, V. Bořek-Dohalský, D. Matoušová, M. Rucki, L. Felzl, Z. Roth. Prediction of acute toxicity of chemicals in mixtures: worms *Tubifex tubifex* and gas/liquid distribution. *SAR QSAR Environ. Res.* **13** (2002), 261-269.
6. M. Tichý, Z. Roth, M. Rucki, V. Bořek-Dohalský, L. Felzl. Possibilities of QSAR Analysis in Toxicity Assessment of Binary Mixtures? V knize: *QSAR in Environmental Toxicology VIII., Proceedings of the Eight International Workshop on QSARs in Environmental Sciences* (J. Walker, red.). Baltimore, Maryland, přijato, sborník dosud nevyšel.
7. V. Bořek-Dohalský, J. Reitmajer, M. Rucki, D. Matoušová, M. Tichý: Test with worms *Tubifex tubifex* and gas/liquid distribution coefficients: acute toxicity of mixtures of chemicals. V knize: ATLA 2002 proceedings, přijato, sborník dosud nevyšel.
8. B. Barrett, V. Bořek-Dohalský, P. Fejt, S. Vaingátová, J. Huclová, B. Němec, I. Jelínek. Validated HPLC–MS–MS method for determination of azithromycin in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **383** (2005), 210-223.
9. B. Barrett, J. Huclová, V. Bořek-Dohalský, B. Němec, I. Jelínek. Validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2006), in press.
10. V. Bořek-Dohalský, J. Huclová, B. Barrett, B. Němec, I. Ulč, I. Jelínek. Validated HPLC–MS/MS method for simultaneous determination of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma – pharmacokinetic study. *Anal. Bioanal. Chem.*, přijato, odeslána revize.
11. V. Bořek-Dohalský, B. Barrett, M. Holčápek, J. Huclová, P. Fejt, B. Němec, I. Jelínek. Validated HPLC-MS/MS method for determination of quetiapine in human plasma, *J. Chromatogr. B*, přijato, odeslána revize.