

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

HPLC analýza léčiv
Tomáš Kouřil

Diplomová práce

2018

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 3. září 2018

Tomáš Kouřil

PODĚKOVÁNÍ

Tímto chci poděkovat vedoucímu své diplomové práce, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc., za výborné odborné vedení práce a neocenitelné rady. Dále chci poděkovat prof. PharmDr. Milanu Nobilisovi, CSc. za poskytnutí vzorků k analýze a základních informací pro měření.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: *Tomáš Kouřil*

Konzultant: *Ing. Vladimír Kubíček, CSc.*

Název diplomové práce: *HPLC analýza léčiv*

Diplomová práce popisuje hledání nejvhodnějších podmínek pro separaci dvou enantiomerů léčiv betaxololu a bisoprololu pomocí metody HPLC.

Cílem bylo najít vhodnou isokratickou separační metodu pro tyto látky po extrakci z plazmy, která by mohla být využita při farmakokinetických experimentech. Byla použita kolona Dai-
cel Chiralcel® OD-R 4,6 mm x 250 mm. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se složením
mobilní fáze acetonitrilu a vodného roztoku chloristanu sodného (1 molární) v poměru 50:50
pro betaxolol a poměru 35:65 pro bisoprolol. Kolona byla termostatována na 25 °C. Během
experimentů byla používána UV detekce ($\lambda = 190$ nm). Jako vnitřní standardy byly testovány
tramadol a 0-desmethyltramadol. Dále byla zkoušena metoda LLE pro zpracování biolo-
gických vzorků před provedením vlastní HPLC.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: *Tomas Kouril*

Consultant: *Ing. Vladimír Kubicek, CSc.*

Title of Thesis: *HPLC analysis of Drugs*

The diploma thesis describes selection of the most suitable conditions for determination of a two enantiomers of drugs betaxolol and bisoprolol with a method HPLC.

The aim of the thesis was to find a suitable isocratic method for the substances for extraction from plasma. The chromatographic column Daicel Chiralcel ® OD-R 4,6 mm x 250 m was utilized. The best results were achieved with mobile phase consisting of acetonitrile and aqueous solution of sodium perchlorate (1 molar) in volume ratio 50:50 for betaxolol and 35:65 for bisoprolol. The column was thermostated at 25 °C. UV detection ($\lambda = 190$ nm) was applied to get a sufficient sensitivity. Tramadol and O-desmethyltramadol was tested as an internal standard. Biological samples were tested by LLE before the HPLC analyses. Furthermore, the LLE method for biological samples was tested before performing HPLC.

OBSAH

Prohlášení.....	2
Seznam zkratk.....	8
Úvod.....	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Beta-blokátory.....	10
1.2 Chiralita.....	14
1.3 Chromatografie.....	18
1.4 HPLC.....	20
1.4.1 Instrumentace HPLC.....	21
1.4.2 Účinnost metody HPLC.....	22
1.4.3 Vyhodnocování výsledků v HPLC.....	23
1.5 Chirální separace.....	24
1.6 Validace metody.....	28
2 Praktická část.....	30
2.1 Použité chemikálie, materiál a pomůcky.....	30
2.1.1 Struktura sledovaných léčiv.....	30
2.1.2 Chemikálie.....	30
2.1.3 Pomůcky.....	31
2.1.4 Použité přístroje.....	31
2.1.5 HPLC sestava.....	31
2.1.6 Kolona.....	32
2.2 Příprava roztoků.....	32
2.3 Příprava biologických vzorků pro validaci metody.....	32
2.4 Zpracování biologických vzorků před HPLC (LLE).....	32
3 Výsledky a diskuze.....	33

Závěr.....	43
Použitá literatura.....	44
Seznam obrázků.....	47
Seznam tabulek.....	48

SEZNAM ZKRATEK

ev.	eventuálně
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysok- účinná kapalinová chromatografie)
ISA	Intrinsic Sympathomimetic Activity (vnitřní sympatomi- metická aktivita)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (extrakce kapalina-kapalina)
MTBE	methyl (terc-butyl)ether
UV	Ultraviolet (ultrafialové)
VIS	Visible (viditelné)

ÚVOD

Skupina léčiv zvaná beta-blokátory jsou v praxi často používané léčivé látky, protože k jejich hlavní indikaci patří léčba kardiovaskulárních onemocnění. Jedná se o jednu z hlavních skupin pro léčbu infarktu myokardu, srdečního selhání a hypertenze. Již nyní miliony pacientů trpí uvedenými chorobami a s růstem incidence kardiovaskulárních onemocnění v populaci lze předpokládat ještě větší nárůst spotřeby léčiv s obsahem beta-blokátorů. Skupina beta-blokátorů je typickým příkladem tzv. me too drugs, což znamená velkou skupinu léčiv a každé léčivo má pouze minimálně obměněnou strukturu [1], [2].

Tématem této diplomové práce byla chirální separace dvou zástupců beta-blokátorů betaxololu a bisoprololu. Cílem práce bylo nalézt separační podmínky dvou enantiomerů obou látek, případně vyzkoušet možné vnitřní standardy. Separace obou enantiomerů je velice žádoucí, protože požadovaný účinek má pouze jeden z nich.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část práce se skládá z šesti částí. Nejprve se práce věnuje skupině léčiv beta-blokátorů, jejich vlastnostmi, účinky, farmakokinetikou aj. Druhá část se zabývá chiralitou a jejím vlivu na organismus. Ve třetí části se práce zabývá obecnými principy chromatografie a další část se věnuje přímo metodě HPLC. V páté kapitole je probírána chirální separace. Poslední část práce se zabývá validací metod.

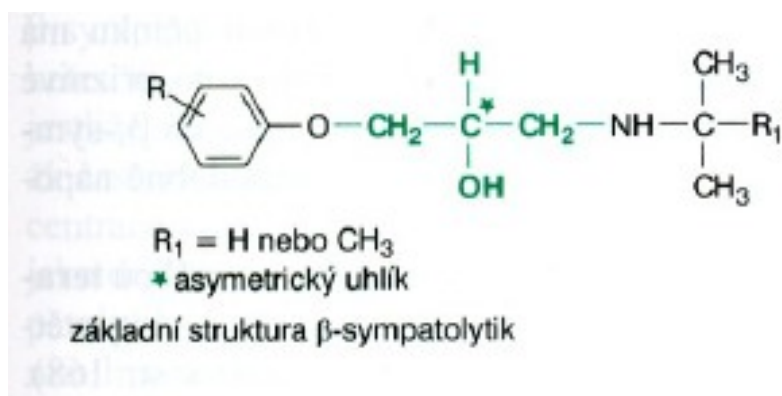
1.1 Beta-blokátory

Tato skupina léčiv je také nazývána jako betalytika nebo betaadrenolytika. Veškeré účinky beta-blokátorů jsou způsobeny blokadou β -adrenergických receptorů. Hlavními zprostředkovateli účinku adrenergických receptorů jsou stresové hormony adrenalin a noradrenalin. Adrenalin je uvolňován z dřene nadledvin a noradrenalin z postgangliových vláken v cílových orgánech a v centrálním nervovém systému. Aktivace β -adrenergických receptorů je spojena s připraveností organismu na fyzickou aktivitu v zátěžové situaci, např. uvolňování energie ze zásob, zvýšení krevního tlaku a zvýšení srdeční činnosti. Beta-blokátory β -adrenergické receptory zablokují, čímž zpomalují srdeční činnost, snižují krevní tlak a snižují odbourávání energetických zásob organismu. Jsou rozlišovány dva typy β -receptorů, a to β_1 a β_2 . Blokadou β_1 nebo β_2 receptorů jsou docíleny různé účinky léčiv. β_1 -receptory se vyskytují zejména v srdci, v gastrointestinálním traktu a v ledvinách, zatímco β_2 -receptory se nacházejí hlavně v bronchiálním traktu, cévách a děloze. Podle afinity k β -receptorům dělíme betablokátory na selektivní, které působí pouze na β_1 -receptory v srdci, a neselektivní, které působí na β_1 i β_2 -receptory (viz tabulka č. 1) [3], [4].

Tabulka 1: Rozdělení beta-blokátorů podle selektivity [5]

Neselektivní bez ISA	Neselektivní s ISA	Kardioselektivní bez ISA	Kardioselektivní s ISA
Metipranol	Bopindolol	Atenolol	Acebutolol
Sotalol	Pindolol	Betaxolol	
		Bisoprolol	
		Esmolol	
		Metoprolol	

Chemicky mají beta-blokátory poměrně jednotnou strukturu, jedná se o deriváty aryloxyaminopropanolu (viz obr. č. 1). Substituenty na izopropanolové skupině (vyznačeno zeleně) rozhodují o hydrofobicitě. Se stoupající hydrofobicitou se zvyšuje hromadění látky v membránách a také stabilizující účinek na membrány. Ve struktuře se nachází opticky aktivní uhlík (vyznačen hvězdičkou). Sympatolytický účinek má pouze S-(-)-forma a obě formy mají nescifické biologické účinky, např. stabilizace membrán nebo lokálně anestetické účinky. Ve většině případů (výjimkou je penbutolol a timolol) jsou beta-blokátory podávány ve formě racemických směsí s tím, že sympatolyticky působí pouze polovina dávky [4].



Obrázek 1:Obecný vzorec beta-blokátorů [6]

Důležitou roli hraje také vnitřní sympatomimetická aktivita (ISA), což znamená určitý rozsah β -adrenomimetického působení označované jako kompetitivní dualismus. Nedochozí k tak razantnímu snížení tepové frekvence, což lze interpretovat negativně z terapeutického hlediska, protože při infarktu myokardu závisí snížení mortality na snížení tepové frekvence [5].

Beta-blokátory se běžně používají k léčbě [5]:

- hyperkinetické cirkulace (zvýšení působení sympatiku na srdce),
- supraventrikulární arytmie,
- angina pectoris,
- esenciální a renální hypertenze,
- profylaxe reinfarktu,
- glaukom (lokálně).

Mimo selektivitu na receptory je důležitá pro výběr konkrétního léčiva také rozpustnost v tucích (lipofilita) nebo ve vodě (hydrofilie). Rozdělení beta-blokátorů podle lipofility/hydrofility lze nalézt v tabulce č. 2. Lipofilní beta-blokátory se metabolizují v játrech a mají kratší poločas účinku. Lipofilní beta-blokátory pronikají lehce přes buněčné membrány včetně bariéry centrální nervové soustavy, z čehož vyplývají nežádoucí účinky těchto léčiv—nespavost,

únava. Hydrofilní beta-blokátory se nemetabolizují v játrech a vylučují se ledvinami v nezměněné podobě. Nepronikají do centrální nervové soustavy a minimálně se vážou na plazmatické bílkoviny v krvi [5].

Tabulka 2: Rozdělení beta-blokátorů podle lipofility a hydrofility [5]

Lipofilní	Hydrofilní	Smíšené
Acebutol	Atenolol	Bisoprolol
Labetalol	Betaxolol	Bopindolol
Metoprolol	Esmolol	Carvedilol
	Sotalol	Celiprolol
		Pindolol

Nežádoucími účinky beta-blokátorů jsou [7]:

- Poruchy spánku,
- Deprese,
- Děsivé sny,
- Únava díky snížení síly stahu myokardu,
- Studené ruce a nohy díky zhoršenému prokrvení,
- Bradykardie,
- Atrio-ventrikulární blokáda
- Hyperkalémie a retence kyseliny močové při dlouhodobém podávání.

Mezi kontraindikace beta-blokátorů patří [7]:

- Bronchiální astma,
- Bradykardie (menší než 50 tepů/min),
- Hypotenze (menší než 100 mm Hg),
- Atrio-ventrikulární blokáda,
- Sick-sinus syndrom.

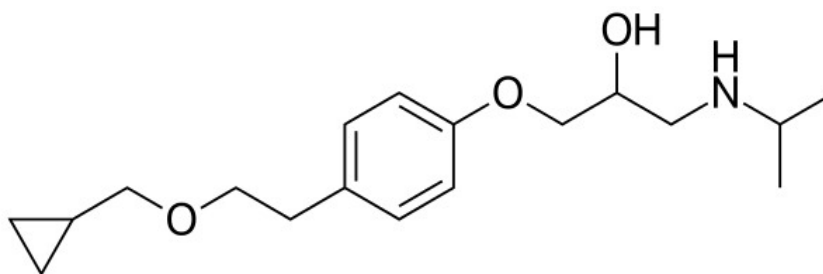
Nevhodná je kombinace beta-blokátorů s léky zpomalujícími srdeční frekvenci, např. verapamil, diltiazem, amiodaron a digoxin. V tomto případě dochází k potenciaci účinků a může vést k výrazné bradykardii a zástavě srdce. Beta-blokátory potencují účinek perorálních antidiabetik a inzulínu. Mohou také zakrýt příznaky hypoglykémie [7].

Betaxolol (viz obr. č. 2)Sumární vzorec: $C_{18}H_{29}NO_3$

Molekulová hmotnost: 307,21

Jméno podle IUPAC: 1-[4-[2-(cyclopropylmethoxy)ethyl]phenoxy]-3-(propan-2-ylamino)propan-2-ol

pKa: 9,4

Betaxolol je volně rozpustný ve vodě, metanolu, ethanolu a chloroformu. Rozpustnost ve vodě je 451 mg.L^{-1} .

Obrázek 2: Vzorec betaxololu [8]

Betaxolol je kardioselektivní antagonist β_1 -adrenergických receptorů bez vnitřní sympatometické aktivity. Betaxolol se selektivně a kompetitivně váže na receptory β_1 a blokuje β_1 receptory v srdci, čímž snižuje kontraktilitu srdce a tepovou frekvenci. To vede ke snížení srdečního výdeje a krevního tlaku. Při topické aplikaci do oka snižuje sekreci nitrooční tekutiny, což vede ke snížení nitroočního tlaku. Nadále betaxolol zabraňuje sekreci reninu. Renin je hormon uvolňovaný ledvinami a jeho účinkem se zužují cévy. Blokáci uvolnění reninu je dosaženo snížením krevního tlaku. Betaxolol je racemickou směsí [9], [10].

Biologická dostupnost betaxololu po perorálním podání je cca 90 %. Maximální koncentrace léčiva v krvi se dosáhne po 1,5 až 6 hodinách a cca 50 % je navázáno na plazmatické bílkoviny. Biologický poločas je mezi 14 a 22 hodinami. Eliminace léčiva probíhá ledvinami po předchozí transformaci v játrech [9], [10].

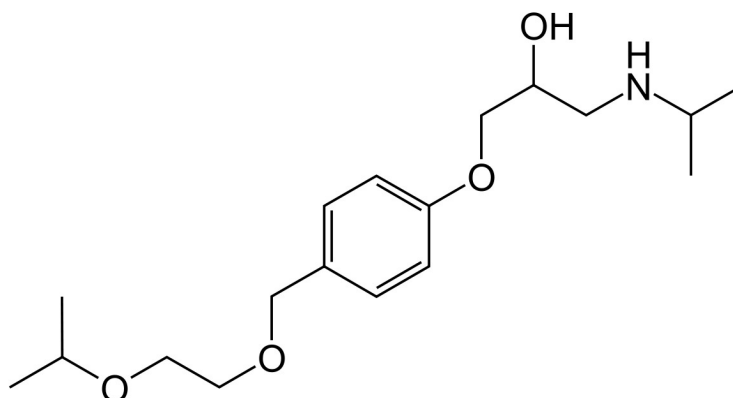
Bisoprolol (viz obr. č. 3)Sumární vzorec: $C_{18}H_{31}NO_4$

Molekulová hmotnost: 325,45

Jméno podle IUPAC: 1-(propan-2-ylamino)-3-[4-(2-propan-2-yloxyethoxymethyl)phenoxy]propan-2-ol

pKa: 9,27 a 14,09

Bisoprolol je volně rozpustný ve vodě, metanolu, ethanolu a chloroformu. Rozpustnost ve vodě je 2240 mg.L⁻¹.



Obrázek 3: Vzorec bisoprololu [11]

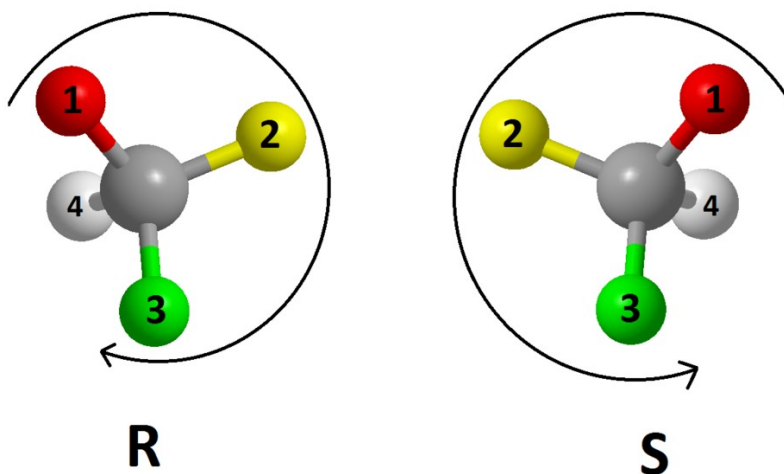
Bisoprolol má stejné farmakologické účinky jako betaxolol (viz výše). Biologická dostupnost bisoprololu po perorálním podání je cca 80 %. Maximální koncentrace léčiva v krvi se dosáhne po 2 až 4 hodinách a cca 30 % je navázáno na plazmatické bílkoviny. Biologický poločas je mezi 9 a 12 hodinami. Eliminace léčiva probíhá ledvinami. Farmakokinetické charakteristiky obou enantiomerů jsou stejné [12], [13].

1.2 Chiralita

S otázkou chiralit chemické molekuly souvisí pojmy symetrie a asymetrie molekuly. Molekulu lze nazvat asymetrickou tehdy, když neobsahuje žádný prvek symetrie (rovina symetrie nebo střed symetrie). Asymetrie je základním předpokladem pro existenci enantiomerů. Typickým příkladem asymetrie je atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty, který lze označit za střed chiralit. Enantiomery jsou nazývány molekuly, které jsou zrcadlovými obrazy jedna druhé. Pro lepší pochopení jsou uváděny příklady levé a pravé ruky. Enantiomery jsou v názvu sloučeniny rozlišovány pomocí předpony (+) nebo (-) podle toho, jakým směrem otáčí rovinu polarizovaného světla. Enantiomery se ve struktuře navzájem liší absolutní konfigurací. Absolutní konfigurace vyjadřuje přesnou formu zápisu jedné ze dvou enantiomerních forem. Jednoznačným vyjádřením absolutní konfigurace je nakreslení vzorce molekuly. Při písemném vyjádření absolutní konfigurace je nejčastěji využívána konvence R/S [14].

K určení konfigurace R/S jsou používána Cahn-Ingold-Prelogova pravidla posloupnosti [14]:

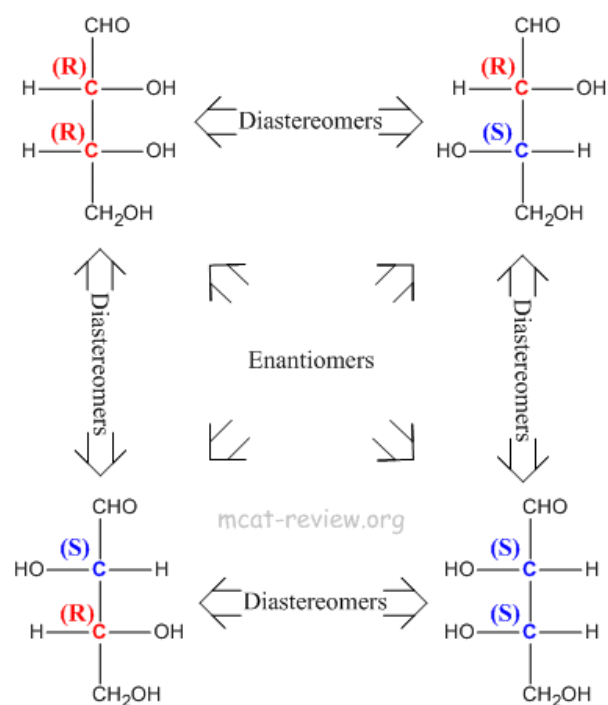
1. Atomům přímo připojeným k stereogennímu centru je přiřazena priorita podle klesajících protonových čísel. Atom s nejvyšším protonovým číslem je označen jako první a atom s nejnižším protonovým číslem jako čtvrtý.
2. Nejde-li o priority rozhodnout dle předchozího bodu, jsou porovnávána protonová čísla druhých atomů v každém substituentu. Je-li to nutné, lze pokračovat do dalších stupňů.
3. Jsou-li atomy vázány násobnými vazbami, je s nimi počítáno jako s ekvivalentními stejnému počtu atomů připojených jednoduchou vazbou.



Obrázek 4: Absolutní konfigurace dle Cahn-Ingold-Prelovova systému [15]

Po přiřazení priority všem čtyřem atomům je třeba natočit molekulu tak, aby atom s nejnižším číslem priority směřoval od pozorovatele směrem dozadu (viz obr. č. 4). Zbývající tři substituenty jsou seřazeny od nejvyšší po nejmenší. Jestliže je postupováno od 1 do 3 ve směru hodinových ručiček, jedná se o R-konfiguraci a naopak, jestliže je postup od 1 do 3 proti směru hodinových ručiček, jedná se o S-konfiguraci [14].

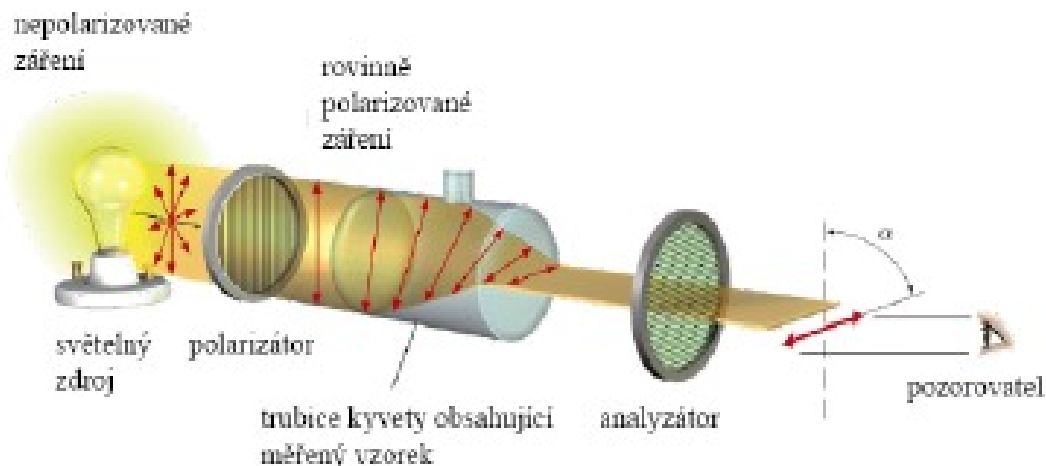
Diastereoizomery jsou stereoizomery, které nejsou enantiomery. Tzn. diastereoizomery jsou stereoizomery, které navzájem nejsou zrcadlovými obrazy. Rozdíl mezi enantiomery a diastereoizomery spočívá v tom, že enantiomery mají navzájem opačnou konfiguraci na všech chirálních centrech. Naopak diastereoizomery mají opačnou konfiguraci pouze na některých chirálních centrech. Rozdíl mezi diastereoizomery a diastereoizomery je patrný na obr. č. 5. Enantiomery mají stejné fyzikální a chemické vlastnosti, naopak diastereoizomery mají rozdílné chemické vlastnosti [16], [17].



Obrázek 5: Konfigurace enantiomerů a diastereoizomerů [18]

S tématem ještě souvisí dva významné termíny, a to meso-sloučenina a racemická směs. Meso-sloučeniny mají sice v molekule stereogenní centra, ale jsou achirální. Je to dáno tím, že molekula obsahuje rovinu symetrie. Racemickou směsí je označována každá látka, která obsahuje ekvimolární množství enantiomerů [16].

Za chirální je označována molekula, která není totožná se svým zrcadlovým obrazem a existuje ve dvou enantiomerních formách. Molekula nemůže být chirální v případě, že má rovinu nebo střed symetrie. Molekula, která je ztotožnitelná se svým obrazem je achirální. Zjednodušeně lze říci, že asymetrická molekula je vždy chirální, ale naopak chirální struktura nemusí být asymetrickou. Veškeré chirální molekuly jsou látky separovatelné v enantiomery. Všechny molekuly opticky aktivních látek jsou chirální. Jinak lze říci, že racemát je chirální a také oba enantiomery. V případě chiralit je nutným předpokladem definovaná a alespoň dočasně neměnná konfigurace a konformace [16].



Obrázek 6: Princip polarimetru [19]

Světlo tvoří elektro-magnetické vlny, které kmitají kolmo na rovinu směru šíření světla. V případě nepolarizovaného světla probíhají kmity v nekonečně mnoho rovinách. Pokud dojde k polarizaci světla polarizátorem, projdou pouze elektromagnetické vlny v jedné rovině. Opticky aktivní látky rovinu polarizovaného světla odklání o určitý úhel α . Úhel otáčení je měřen pomocí přístroje zvaný polarimetr (viz obr. č. 6). Analyzovaná molekula může stáčet rovinu polarizovaného světla doleva, potom lze mluvit o levotočivé molekule, nebo doprava, pak lze mluvit o pravotočivé molekule. Konvence značení levotočivých sloučenin je (-), u pravotočivých jde o (+). Značení je uváděno na začátku názvu molekuly, např. (+)-betaxolol. Optická otáčivost daných molekul závisí na koncentraci sloučeniny a délce kyvety. Pro potřeby porovnání optických otáčivostí molekul mezi sebou byla zavedena veličina specifická optická otáčivost $[\alpha]_D$ [14]:

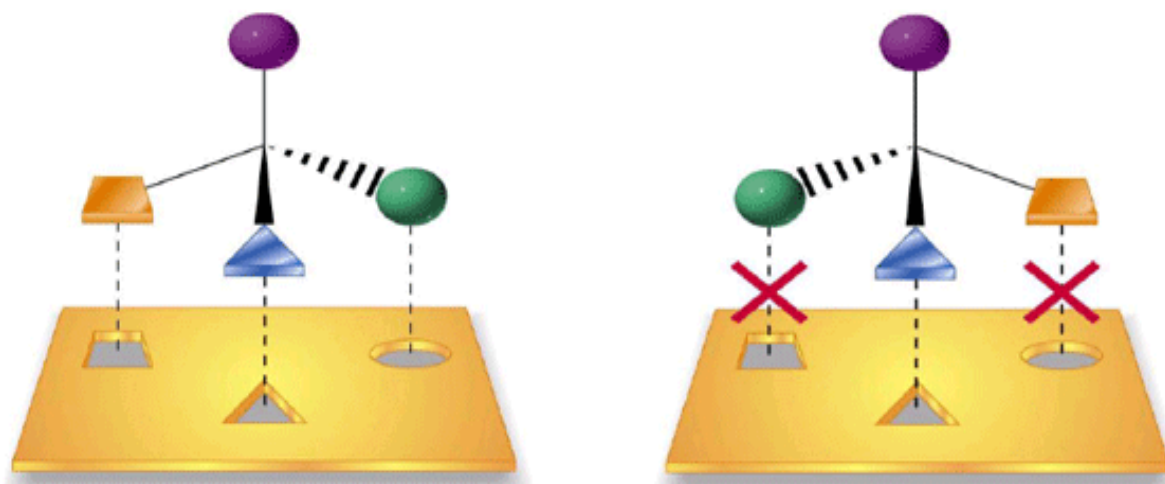
$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{l \cdot c} ,$$

kde α je pozorovaný úhel rotace v $^\circ$,

l je délka kyvety v dm,

c je koncentrace v g.ml^{-1} .

V rámci standardizovaných podmínek měření je používána tzv. sodíková čára, což je žluté světlo o vlnové délce 589 nm [14].



Obrázek 7: Interakce páru enantiomerů s chirálním receptorem [20]

Enantiomery chirálních molekul mají stejné fyzikální vlastnosti, ale mohou se lišit biologickými účinky. Odlišné účinky enantiomerů jsou způsobeny stavbou chirálního receptoru, kam zapadne pouze enantiomer s určitou konformací. Druhý enantiomer nehodící se stavbou do receptoru nezpůsobí požadovaný účinek (viz obr. č. 7). Popsaný stav značně ovlivňuje účinek léčiv na lidský organizmus. Typickým příkladem je látka ibuprofen, kdy je účinný pouze (S)-forma a (R)-forma je neúčinná, ale v léčivech je používána racemická směs. Stejným případem jsou také beta-blokátory, což bylo uvedeno výše. Chiralita léčiv je důležitým tématem, protože byl zaznamenán případ otravy po požití relativně bezpečného dextrometorfanu při současném požití levometorfanu. Zatímco první enantiomer je antitusikum, druhý enantiomer je velmi účinným narkotikem s úzkým terapeutickým rozmezím. Notoricky známým je případ thalidomidu [21].

1.3 Chromatografie

Principem chromatografie je rozdělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, kterými jsou jedna nepohyblivá- stacionární a druhá pohyblivá- mobilní. Při chromatografické analýze dochází k neustálému nalézání rovnovážného stavu mezi stacionární a mobilní fází. K separaci dojde na principu různé afinity dělené látky k oběma fázím. Stacionární fáze je reprezentovaná náplní kolony nebo plošnou vrstvou a mobilní fáze volně unáší analyzovanou látku. Uvedenou technikou lze oddělit jednotlivé složky analyzované směsi a určit jejich koncentraci [22].

Podle typu mobilní fáze lze chromatografické metody rozdělit na [22]:

- Plynovou chromatografii (GC), kde je mobilní fází plyn,
- Kapalinovou chromatografii (LC), kde je mobilní fází kapalina.

Kapalinová chromatografie má dvě formy provedení [22]:

- Plošné uspořádání, např. tenkovrstvá chromatografie (TLC) nebo papírová chromatografie (PC),
- Kolonové uspořádání, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Další možné dělení chromatografických metod je podle podstaty separačního procesu [22]:

- Adsorpční chromatografie, jejíž podstatou je separace na základě rozdílné adsorpce na povrchu absorbentu. Nejčastěji používanými adsorbenty je silikagel a oxid hlinitý.
- Rozdělovací chromatografie, jejíž podstatou je separace na základě rozdílné rozpustnosti separovaných látek ve dvou navzájem nemísitelných kapalinách. Jedna z kapalin je použita jako stacionární fáze a musí být zakotvena na vhodném nosiči.
- Iontově výměnná chromatografie (IEC), jejíž podstatou je separace na základě rozdílné afinity dělené látky k iontovýměnným skupinám. Dělené látky jsou zpravidla v iontové formě.
- Gelová chromatografie, jejíž podstatou je separace na základě velikosti molekul. Kolona je naplněna gelem, kterým protéká mobilní fáze s analyzovaným vzorkem. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí a naopak velké molekuly do pórů malých velikostí neproniknou. Schopnost separace je závislá na velikosti pórů gelu.
- Afinitní chromatografie, jejíž podstatou je použití imobilizovaného ligandu reagujícího specificky s enzymem, který má být separován. Využívá výjimečné biologické schopnosti některých látek specificky a reverzibilně vázat komplementární látky (nejčastěji bílkoviny nebo nukleové kyseliny), např. vazba enzym-substrát nebo protilátka-antigen [23].

Důležitým ukazatelem pro chromatografii je rozdělovací koeficient, kterým se vyjadřuje poměr rovnovážných koncentrací látky v obou fázích. Při procesu chromatografie opakovaně dochází k přechodu látek do stacionární fáze a zpátky do mobilní fáze. V okamžiku přiblížení rovnovážnému stavu lze rozdělení látky mezi obě fáze popsat rozdělovacím koeficientem K , kdy:

$$K = [A]_s/[A]_m.$$

Rozdělovací koeficient je, jako podíl dvou koncentrací, bezrozměrný. Obvykle vyjadřován v logaritmickém tvaru $\log K$. Jelikož je hodnota K závislá na okolních podmínkách, např. teplota a pH, je nezbytné definovat stálé podmínky prostředí. [24].

Dalším důležitým ukazatelem pro chromatografické metody je veličina retenční čas t_R . Retenčním časem rozumíme dobu, která uběhne od nástřiku analyzované látky do dosažení vrcholu píku. Retenční čas je kvalitativní charakteristika látek. Retenčním objemem V_R rozumíme objem mobilní fáze, který proteče kolonou za retenční čas. Retenční objem lze vyjádřit vztahem [25], [26]:

$$V_R = F_m \cdot t_R,$$

kde F_m znamená průtok mobilní fáze udávaný v $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

1.4 HPLC

HPLC je zkratkou anglického High Performance Liquid Chromatography, což lze přeložit jako vysokoučinná kapalinová chromatografie [22].

Principem separace při HPLC je různá afinita složek vzorku k mobilní a stacionární fázi. S rostoucí afinitou dané látky ke stacionární fázi se snižuje pohyb složek vzorku chromatografickým systémem. Při postupu vzorku kolonou se jednotlivé složky vzorku dělí a potom dospějí k detektoru v různých retenčních časech. Jak je patrné z názvu metody, mobilní fází je kapalina a stacionární fází je film dané látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent [27], [28].

HPLC je v současnosti široce používaná separační technika. Aplikace metody HPLC je ve všech oblastech, kde je alespoň minimálně využívána analytická chemie, tj. v klinické, environmentální, průmyslové, soudní a především farmaceutické analýze. Dále je možné HPLC použít v analýze potravin a živých organismů. I přes více než stoletou historii metody, dochází k neustálé modifikaci a vylepšování. Zvyšuje se počet látek, které lze současně analyzovat v jednom experimentu. Největší pokroky jsou dosahovány ve vývoji nových separačních médií, která urychlují postupy, zvyšují účinnost, rychlost a selektivitu separace [27], [28].

Separace pomocí HPLC může probíhat ve dvou variantách [28]:

- Normální HPLC znamená, že stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní.
- Reverzní HPLC znamená, že mobilní fáze je polárnější než fáze stacionární.

V současné době je více používána separace pomocí reverzní HPLC.

Pro HPLC analýzu je klíčové složení mobilní fáze, zda je konstantní nebo se v průběhu analýzy mění. Izokratická eluce znamená konstantní složení mobilní fáze po celou dobu analýzy a naopak při gradientové eluci se složení mobilní fáze mění tak, že složení mobilní fáze se mění ve prospěch eluční složky s vyšší eluční silou. Izokratická eluce je výhodná k separaci směsí

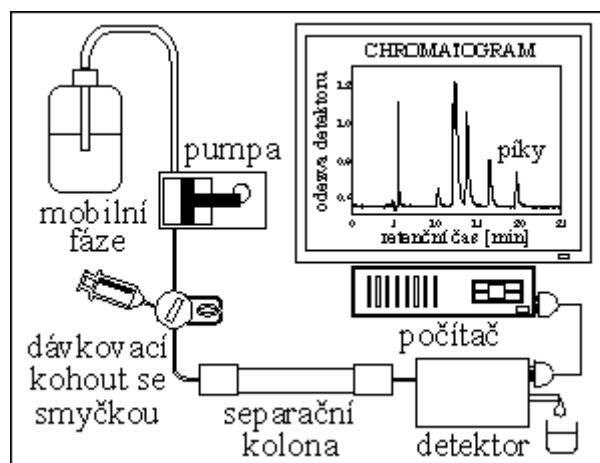
s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a naopak gradientová eluce je vhodná pro separaci látek s vysoce odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [27].

1.4.1 Instrumentace HPLC

Zjednodušené schéma chromatografu je uvedeno na obr. č. 8. Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které musí zajistit základní funkce [29]:

- Uchování a transport mobilní fáze (zásobník mobilní fáze a čerpadlo),
- Dávkování vzorku (autosampler),
- Separace analyzovaných látek (chromatografická kolona),
- Detekce analyzovaných látek (detektor),
- Zaznamenávání dat (počítač).

Při transportu mobilní fáze je důležitým přístrojem odplynovač mobilní fáze. Jestliže je v mobilní fázi přítomen vzdušný kyslík dochází ke zkreslení výsledků analýzy [22].



Obrázek 8: Jednoduché schéma HPLC [30]

Různé typy detektorů jsou založeny na různých chemicko-fyzikálních jevech [22]:

- *Detektory UV/VIS* jsou založeny na absorpci ultrafialového a viditelného záření v oblasti vlnových délek 190 až 800 nm,
- *Fluorescenční detektory* měří sekundární záření, které látky vydávají po přijetí primárního excitačního elektromagnetického záření,
- *Elektrochemické detektory* měří některou z elektrických veličin (proud, elektrodový potenciál atd.) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru,
- *Vodivostní detektor*, měří elektrickou vodivost analytu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na které je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod.
- *Chemiluminiscenční detektor* měří fluorescenci, která je vyvolaná chemickou reakcí,

- *Detektor ELSD* (Evaporative Light Scattering HPLC Detector) slouží hlavně k detekci látek, které ve své molekule neobsahují žádný chromofor nebo fluorofor, např. fosfolipidů, mastných kyselin, sacharidů, aminokyselin aj.
- *Detektor CORONA* pracuje na principu detekce kladně nabitých částic, které mají rozdílnou pohyblivost (hmotnost)

1.4.2 Účinnost metody HPLC

Jako u každé metody je i u HPLC potřeba měřit účinnost. Účinnost chromatografické metody je vyjadřováno pomocí veličiny počet teoretických pater N , která je vyjádřena vztahem:

$$N = V_R^2/\sigma_V^2 = t_R^2/\sigma_t^2 = L^2/\sigma_L^2,$$

kde V_R^2 je retenční objem (viz výše), t_R^2 je retenční čas (viz výše), L^2 je délka kolony a σ_V^2 , σ_t^2 , σ_L^2 jsou směrodatné odchylky uvedené v objemových, časových nebo délkových jednotkách. Uvedený vztah pro výpočet počtu teoretických pater je v praxi nepoužitelný a aplikuje se jiný vztah:

$$N = 5,54 \cdot (V_R/w)^2,$$

kde w je šířka píku v polovině jeho výšky. Počet teoretických pater N je bezrozměrná veličina a platí, že čím vyšší je hodnota, tím vyšší účinnost kolony. Počet pater není pro jednotlivou kolonu konstantou, ale dále závisí na retenčním faktoru analyzované látky a na historii používání kolony.

Trendem posledních let je zvyšování účinnosti v podobě metody zvané ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), která využívá chromatografické kolony s částicemi menšími než $2\mu\text{m}$ [31].

Kvalita HPLC je vyjádřena pomocí dvou veličin, a to faktor chvostování a faktoru asymetrie. Faktor chvostování T_f je vyjádřen vztahem:

$$T_f = w_{0,05}/2f,$$

Kde $w_{0,05}$ je šířka píku v 5 % jeho výšky a f je šířka píku jeho vzestupné části.

Faktor asymetrie A je vyjádřen vztahem:

$$A = t/f,$$

kde t je šířka píku v jeho sestupné části a f je šířka píku jeho vzestupné části, obě v 5 % výšky píku [32], [29].

1.4.3 Vyhodnocování výsledků v HPLC

Ke kvalitativní analýze (identifikaci) látek je používáno retenčních časů, případně retenčních objemů, kdy jsou srovnány se standardy. Kvantitativní analýza (stanovení) slouží ke zjištění množství analyzované látky, nejčastěji je užíván výpočet z koncentrace z plochy píku a výšky píku. Při kvantitativní analýze jsou využívány především tyto metody [32]:

- Metoda vnějšího standardu,

- Metoda standardního přídávku,
- Metoda vnitřního standardu,
- Metoda vnitřní normalizace.

Metoda vnějšího standardu má nevýhodu v tom, že je potřeba nejprve nastříknout standard (CRL, chemická referenční látka) a potom analyzovaný vzorek, což může výsledek zkreslit pod vlivem dvou nástřiků. Koncentrace analyzované látky se potom spočítá ze vztahu:

$$c_i = \frac{A_i \cdot c_s}{A_s} ,$$

kde c_i je koncentrace analyzované látky a A_i je plocha píku analyzované látky, obdobně jde o koncentraci standardu a plochu píku standardu (c_s a A_s).

Metoda standardního přídávku omezuje vznik chyby měření vlivem matrice vzorku. Principem metody je přidání přesného množství té samé látky, u které se stanovuje koncentrace. Vždy se musí udělat nejméně dva nástřiky vzorku – při prvním se dávkuje přesné množství vzorku, při druhém se dávkuje přesné množství směsi.

Metoda vnitřního standardu má oproti metodě vnějšího standardu výhodu v tom, že probíhá v jediném nástřiku. Tzn. úsporu času a zvýšení přesnosti při přidání vnitřního standardu k analyzovanému vzorku. Vhodný vnitřní standard by měl mít podobný retenční čas s analytem, podobnou koncentraci a měl by být chemicky inertní.

$$c_i = R_{IS} \cdot \frac{V_s}{V_i} \cdot \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s ,$$

kde R_{IS} je relativní odezva detektoru stanovované látky vůči vnitřnímu standardu a V_s (V_i) jsou objemy standardu, respektive analytu. Zbylé hodnoty ve vzorci odpovídají výše uvedenému vzorci pro výpočet vnějšího standardu.

Metoda vnitřní normalizace má nevýhodu v tom, že je nutné znát všechny odezvové faktory a k tomu je potřeba úplné identifikace chromatogramu. Výpočet je potom velmi jednoduchý:

$$c_s = \frac{A_x \cdot CRF_x}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot CRF_i} .$$

Výsledkem je bezrozměrné číslo, které udává zastoupení dané složky ve vzorku v procentech. Největší chybou vyhodnocení chromatografických píků je nepřesné určení základní linie na chromatogramu.

1.5 Chirální separace

Separace enantiomerů na běžných stacionárních fázích za normálních podmínek není možná, ale je uskutečňována za předpokladu chirální chromatografie. V první řadě je třeba zajistit vznik diastereoizomerů, které umožňují separaci páru enantiomerů. To se děje dvěma různými způsoby [33], [29]:

- Přímá separace je dána vznikem tzv. transitního diastereoizomeru, který vznikne mezi chirální stacionární fází nebo chirálním aditivem v mobilní fázi a enantiomerem.
- Nepřímá separace spočívá ve vzniku diastereoizomerů, které vznikají chemickou reakcí mezi enantiomery a chirálním činidlem. Nepřímá separace probíhá v achirálním prostředí.

Mechanismem chirální separace je schopnost tvorby krátkodobého diastereoizomerního komplexu, který je vytvořen na základě vodíkových vazeb, komplexů, p-p interakcí, interakce dipól-dipól nebo stérických efektů. K rozlišení dvou enantiomerů je nutné, aby působily kontinuálně minimálně tři interakce mezi analytem a stacionární fází. Pravděpodobně nejdůležitějším faktorem při chirální separaci je chirální stacionární fáze. Separace enantiomerů na chirální stacionární fázi závisí na objemové frakci organického rozpouštědla, hodnotě pH, teplotě, koncentraci a typu pufru. V současné době existují čtyři hlavní typy chirální stacionární fáze: proteinová, cyklodextrinová, polysacharidová a Pirklovy stacionární fáze. Dále existují méně rozšířené chirální stacionární fáze, např. chirální ligand-výměnná chromatografie, chirální crownethery, enzymy s vysokou stereoselektivitou pro určité substráty na silikagelu, syntetické polymery a makrocyclická antibiotika (viz dále) [33],[29].

Chirální derivatizace je reakce zkoumané látky s chirálním derivatizačním činidlem, jejímž výsledkem je vznik dvou diastereoizomerních derivátů. Vzniklé diastereoizomerní deriváty mohou být separovány konvenční chromatografií, což lze považovat za určitou výhodu metody. Nevýhodami jsou vysoká náročnost přípravy derivátů a nutnost opticky čistého derivatizačního činidla. V současné době je metoda již nevyužívaná a v minulosti byla používána pro separaci diastereoizomerů amidů, karbamátů a derivátů močoviny [33], [29].

Chirální aditiva mobilní fáze zajišťují vznik diastereoizomerního komplexu, který lze separovat konvenční chromatografií. Enantiomery jsou separovány na základě tvorby různě stabilních komplexů s chirálním selektorem. Tato metoda separace je málo používána z několika důvodů, a to nízké selektivity a účinnosti a vysoké ceny aditiv. Nejčastěji jsou chirální aditiva využívána jako metoda pro screening a následně je užita chirální stacionární fáze [33], [29].

Chirální stacionární fáze vzniká vazbou chirálního selektoru na vhodný nosič. Jako nosič je nejčastěji používán silikagel. Chirální selektor může být na nosič navázán kovalentně nebo iontově, případně může být nosič chirálním selektorem pokryt dynamicky. Nadále zde budou uvedeny nejvýznamnější a komerčně dostupné chirální stacionární fáze [33], [29]:

- Makrocyklické proteiny,
- Polysacharidové chirální stacionární fáze,
- Crowneterové chirální stacionární fáze,
- Cyklodextrinové chirální stacionární fáze,
- Glykoproteinové chirální stacionární fáze,

Pro chirální kolony na bázi **makrocyklických glykoproteinů** jsou používána makrocyklická antibiotika vankomycin, teikoplanin a ristocetin A. U těchto látek se vyskytuje velké množství chirálních center (např. teikoplanin obsahuje 23 chirálních center), proto existuje velká pravděpodobnost tvorby diastereoizomerních komplexů s analytem a tedy i vysoká pravděpodobnost chirální separace. Makrocykly jsou kovalentně vázány na silikagel. Makrocyklické fáze jsou vysoce selektivní v normální i reverzní variantě HPLC. Selektivita těchto fází je závislá především na složení mobilní fáze, hodnoty pH, teplotě a organickém modifikátoru. Hodnota pH se musí pohybovat mezi hodnotami 3,5 a 7,0, protože mimo uvedené rozmezí dochází k hydrolyze chirální stacionární fáze. Při normální variantě HPLC jako mobilní fáze slouží bezvodý metanol nebo acetonitril, ke kterým se přidává kyselina, base nebo pufr. Jako kyselina se používají kyseliny octová, trifluoroctová nebo mravenčí, jako base slouží triethylamin, diethylamin nebo ethylendiamin. Jako pufr funguje octan amonný nebo mravenčan amonný. Při reverzní HPLC slouží jako organické modifikátory metanol, acetonitril, tetrahydrofuran, dioxan nebo etanol. Tyto modifikátory ovlivňují selektivitu separace. Mimo modifikátory ovlivňují selektivitu hodnota pH, složení a koncentrace vodných pufrů [33].

Pro **polysacharidové chirální stacionární fáze** jsou používány přírodní polysacharidy celulóza a amyulóza, které jsou opticky aktivními látkami. Nelze ovšem použít samotnou celulózu nebo amyulózu pro jejich nízkou selektivitu. Tento problém byl vyřešen přípravou derivátů, např. trikarbamátů. Derivatizované polysacharidy jsou na nosič silikagel navázány kovalentně nebo jednoduše nanoseny. Je velmi obtížné zvolit pro danou sloučeninu nejvhodnější chirální stacionární fázi, protože jich existuje velké množství a odhadovat nejlepší fázi je značně obtížné. Pro úspěšnou separaci je nutná součinnost chirální stacionární fáze, mobilní fáze a vzorku. Obecně lze říci, že amyulóza dosahuje větší selektivitu než celulóza. Lepších výsledků se též získává při aplikaci reverzní varianty HPLC, zřejmě proto, že při použití aprotických

rozpouštědel při normálním módu HPLC je zmenšena síla vodíkových vazeb a při reverzní HPLC dochází k solvataci stacionární fáze a separovaného vzorku. Důležitým hlediskem chirální separace je složení mobilní fáze, které závisí na použitém módu HPLC, rozpustnosti a struktuře zkoumané látky. Zjednodušeně lze říci, že v normálním módu HPLC se jako mobilní fáze používá směs alkanů (nejčastěji hexan) s tzv. modifikátory—nízkými alkoholy (např. etanol, propanol). Druh alkoholu a jeho koncentrace ovlivňuje retenční čas a rozlišení—se zvyšující se koncentrací alkoholu klesá retence i rozlišení. Jestliže je separována kyselina nebo base, je používáno doplnění kyselinou (nejčastěji octové nebo trifluoroctové) nebo aminu (nejčastěji triethylamin nebo diethylamin) v koncentraci mezi 0,01 až 1,00 % [33].

V normálním módu HPLC je vhodné použít aprotická rozpouštědla (např. aceton), která mohou zvýšit selektivitu. Také jsou v daném módu užívány modifikátory mobilní fáze, např. dichlormethan nebo ethylacetát. V reverzním módu HPLC se používá voda nebo vodné pufrы (např. fosfáty, octany nebo chloristany) ve směsi s acetonitrilem nebo s alkoholy, které jsou mísitelné s vodou. Výhodné pro separaci je možnost ovlivnit pH mobilní fáze, proto se separace nejčastěji ovlivňuje změnou koncentrace organické složky nebo pH mobilní fáze. Pro analýzu kyselých látek se používá kyselá mobilní fáze a naopak pro analýzu bazických látek se používá bazická mobilní fáze. Pro oba módy HPLC platí, že je separace ovlivněna průtokem mobilní fáze. Obecně lze říci, že je dosahováno lepších výsledků při malém průtoku [33].

V případě **crownerových chirálních stacionárních fází** jde o syntetické makrocyclické polyethery s etylenoxidovým můstkem ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). Ve vazbě vzniká dutina, jejíž velikost je ovlivněna počtem etylenoxidových skupin. Chirální crownethery vzniknou vazbou chirální molekuly (nejčastěji kyseliny vinná a 3,3-diphenyl-1,1'-binaphtyl) na crownether. Diastereoizomerní komplex vzniká mezi chirálním selektorem a amoniovým iontem, proto jsou crownetherové chirální stacionární fáze výhodné při separaci primárních aminů, které jsou blízko chirálního centra. Jako mobilní fáze jsou využívány kyselina chloristá, kyselina dusičná nebo kyselina trifluoroctová a jako modifikátor je používán methanol. Mobilní fáze se používá o hodnotě pH 1 až 2, přičemž platí, že s nižší hodnotou pH roste selektivita, ale zhoršuje se životnost kolony [33].

Při použití **cyklodextrinové chirální stacionární fáze** vznikají tzv. inkluzní komplexy, které se rozvíjejí v prostředí polárních rozpouštědel. Cyklodextriny jsou oligosacharidy, obsahující šest, sedm nebo osm glukózových jednotek a podle toho jsou rozlišovány α , β nebo γ -cyklodextrin. Jednotlivé glukózové jednotky jsou navázány glykosidickou vazbou a vytvářejí geometrické uspořádání, které formuje dutinu. Vnější část dutiny je tvořena hydroxylovými sku-

pinami, proto je tato část hydrofilní. Vnitřní část dutiny tvoří kyslíky v etherické vazbě a vodíky, což zajišťuje lipofilitu vnitřní části dutiny. Nepochybně část analyzované molekuly vnikne dovnitř molekuly a je stabilizována řadou vazeb (van der Waalsovy, vodíkové a disperzní vazby). Takto je charakterizován vznik inkluzních komplexů, které jsou zodpovědné za retenci analyzovaných látek. Velikost dutiny je hlavní determinanta pro vznik inkluzních komplexů. Jestliže je dutina menší než nepolární část analyzované látky, komplexy jsou nestabilní či nevznikají vůbec a naopak. Má-li být analyzovaná látka rozseparována, musejí vzniknout inkluzní komplexy. Výsledné vlastnosti cyklodextrinů lze ovlivnit chemickou modifikací. Při použití reverzního módu HPLC je k enantioseparaci důležitým momentem vznik inkluzních komplexů a jako modifikátory mobilní fáze jsou používány methanol, acetonitril nebo ethanol. Při aplikaci normálního módu HPLC, který se užívá minimálně u nederivatizovaných cyklodextrinů a je doporučován pro derivatizované cyklodextriny, mobilní fáze váže vnitřek dutiny a analyzovaná látka je navázána na povrchu. U normálního módu nedochází ke vzniku inkluzních komplexů [33].

Glykoproteinové chirální stacionární fáze se skládají z řetězců L-aminokyselin spojených peptidickou vazbou. Příklady glykoproteinových selektorů jsou α -1-acid glycoprotein (AGP), ovomucoid (OVM) a hovězí sérum albumin (BSA). Tyto chirální selektory jsou imobilizovány na silikagelu. Ideální hodnota pH je mezi 4 a 7. Jako organický modifikátor se používají propanol, methanol a acetonitril. Glykoproteinové kolony mají malou kapacitu a nízký limit kolony pro tlak. Další nevýhodou kolon je, že se zvyšující koncentrací výrazně klesá účinnost [33].

Pro chirální separaci lze také využít **ligandovou výměnu** (LEC—ligand exchange chromatography) Principem ligandové výměny je tvorba koordinačních komplexů, které se skládají z centrálního iontu přechodného kovu a minimálně dvou chirálních bifunkčních ligandů (chirální selektor a separovaný enantiomer). Koordinační komplexy jsou charakterizovány konstantami stability, které jsou ovlivněny geometrií a orientací ligandů a vzájemnou interakcí selektoru s analyzovanou látkou. Separace probíhá u komplexů, které mají konstanty stability dostatečně rozdílné. Jedna z prvních připravených kolon tohoto typu vznikla vazbou aminokyseliny L-prolinu na polystyren-divinylbenzenový nosič a jako zdroj centrálního iontu byl použit síran hořečnatý (přidaný do mobilní fáze jako aditivum). Později byl jako nosič použit výhodnější silikagel. Metoda ligandové výměny je vhodná pro chirální separaci aminokyselin, aminoalkoholů a hydroxykyselin. Ligandová výměna se používá málo, protože lze analyzovat pouze látky tvořící komplexy [33].

Závěrem lze říci, že chirální separace HPLC je závislá na těchto proměnných [33], [29]:

- Výběru chirální stacionární fáze,
- Výběru separačního módu,
- Množství organického modifikátoru v mobilní fázi,
- pH,
- Iontové síle,
- Teplotě,
- Průtoku mobilní fáze,
- Množství dávkovaného vzorku.

Aplikace chirální separace je mimo farmaceutické odvětví, kdy jsou rozlišovány účinné enantiomery od těch neúčinných, např. beta-blokátory nebo thalidomid, používána také v agrochemii, kdy je užívána kyselina fenoxipropanová jako herbicid pouze v jednom enantiomeru a druhý je neúčinný [33], [29].

1.6 Validace metody

Validace metody znamená získání důkazů, že daný proces je schopen opakovaně poskytovat daný výsledek s vysokým stupněm jistoty. Další vyjádření formulují validaci metody jako prokázání toho, že postup je vhodný pro zamýšlené použití nebo jako postup, při kterém je určována vhodnost použití určitého procesu pro získání relevantních dat. O validaci se jedná, jestliže se ověřuje a kalibruje proces. Naopak jestliže se ověřuje zařízení nebo systém, jedná se o kvalifikaci. Kritickým bodem pro validaci je výběr validačních parametrů. Základním kritériem je získání dostatku údajů k posouzení, jestli je metoda vhodná pro zamýšlené použití. Ke statistickému prokázání spolehlivosti analytické metody slouží validační program, který stanovuje základní pravidla pro plánování a organizaci validace metody. Validací program by měl obsahovat tyto základní části: pracovní postupy, validační parametry, podmínky revalidace systému, validační protokol a řešerše s konzultacemi [32].

Pro validaci metody jsou důležité pojmy správnost, přesnost, odchylka, chyba a interval spolehlivosti. Správností metody se rozumí stupeň, do kterého stanovená hodnota vzorku koresponduje s přijatými referenčními hodnotami. Přesností metody se rozumí úzkost intervalu nezávislých výsledků získaných za předem definovaných podmínek. Přesnost se obvykle vyjadřuje pomocí relativní směrodatné odchylky (viz obr. č. 9) [32]:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Obrázek 9: Směrodatná odchylka [34]

Chybu výsledku dostaneme jako odečet dohodnuté referenční hodnoty od výsledku zkoušky a odchylku dostaneme jako odečet referenční hodnoty od střední hodnoty výsledku [32].

Interval spolehlivosti je interval, ve kterém leží hledaná hodnota s předem zvolenou pravděpodobností. Zpravidla je zvolenou pravděpodobností hodnota 95 %. Zjednodušeně lze říci, že interval spolehlivosti říká, že s 95 % pravděpodobností další naměřený výsledek bude ve zvoleném intervalu. Robustností metody se rozumí vlastnost, kdy malá změna metody vede pořád k správným a přesným výsledkům [32].

Posledním termínem souvisejícím s validací metody HPLC je konfirmace. Metrologická konfirmace znamená konstantní udržování měřicího přístroje v trvale validovaném stavu. Jde o soubory činností, které jsou potřebné k vyhovujícímu používání metody [32].

2 PRAKTICKÁ ČÁST

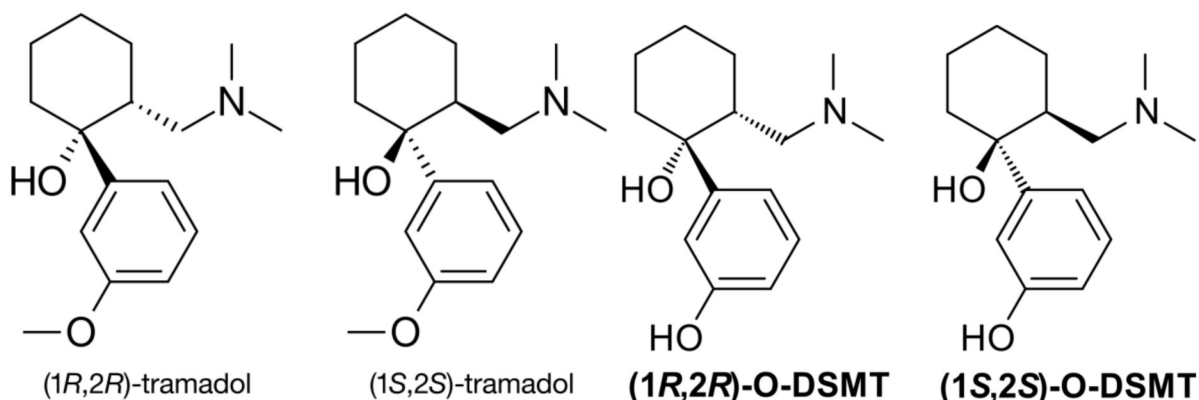
Kapitola se zabývá výčtem použitého materiálu, chemikálií a pomůcek. V další části jsou uvedeny postupy přípravy roztoků použitých k HPLC analýze.

2.1 Použité chemikálie, materiál a pomůcky

V kapitole je popsána struktura sledovaných léčiv, soupis chemikálií, pomůcek a přístrojů, sestava HPLC a kolona.

2.1.1 Struktura sledovaných léčiv

Studovanými strukturami jsou betaxolol a bisoprolol. Struktura je uvedena na obr. č. 2 a 3 (viz výše). Jako vnitřní standardy byly testovány tramadol a O-desmethyltramadol (viz obr. č. 10). Všechny čtyři uvedené látky pocházejí z daru prof. PharmDr. Milana Nobilise, CSc (Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF UK).



Obrázek 10: Vzorce testovaných vnitřních standardů tramadolu a O-desmethyltramadolu [35], [36]

2.1.2 Chemikálie

K analýze byly použity tyto chemikálie:

- Acetonitril (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Fischer Scientific UK)
- Sodium perchlorate monohydrate (Fluka Analytical)
- Ultračistá voda čištěná reverzní osmózou.

2.1.3 Pomůcky

Pro analýzu byly použity následující pomůcky:

- Kádinky,

- Erlenmeyerovy baňky,
- Pipety,
- Odměrné baňky,
- Vialky,
- Laboratorní lžička,
- Váženka,
- Skleněná nálevka,
- Injekční stříkačka,
- Automatické pipety.

2.1.4 Použité přístroje

- Laboratorní analytické váhy (Sartorius)
- Centrifuga Z 100 M (Hermle)
- Laboratorní třepačka Lab Dancer (IKA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Bandelin)

2.1.5 HPLC sestava

K separaci byl použit kapalinový chromatogram Shimadzu, který je složen z těchto částí:

- Degasér DGU A5,
- Vysokotlaká pumpa LC-10ADvp,
- Autosampler SIL-10ADvp,
- Kolonový termostat CTO-10Avp,
- PDA detektor SPD-M10Avp,
- Fluorescenční detektor RF-10AXL.

Chromatograf je řízen přes řídicí jednotku SCL-10Avp z počítače pomocí chromatografického software CLASS-VP.

2.1.6 Kolona

K analýze byla použita kolona Daicel Chiralcel ® OD-R 4,6 mm x 250 mm, particle size 10 µm, Part No. 14625.

2.2 Příprava roztoků

Roztoky obou vzorků (betaxololu i bisoprololu) byly připraveny rozpuštěním 1 mg betaxololu, ev. bisoprololu ve vodě v 25 ml odměrné baňce. Roztok byl naředěn ultračistou vodou čištěnou reverzní osmózou. Výsledná koncentrace obou roztoků je $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Vodné roztoky vnitřních standardů tramadolu a O-desmethyltramadolu pochází z daru prof. Nobilise. Původní koncentrace darovaných vzorků je $200 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$, proto bylo nutné vzorky naředit (5x) na koncentraci srovnatelnou se zkoumanými vzorky betaxololu a bisoprololu— $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$.

2.3 Příprava biologických vzorků pro validaci metody

K 1 ml čisté krysí plazmy bylo přidáno 10 μl roztoků betaxololu a bisoprololu o koncentracích $0,0004 \text{ mg.ml}^{-1}$, který byl získán ředěním základního roztoků vodou. Tato směs byla protřepána na laboratorní třepačce a promíchána pomocí automatické pipety.

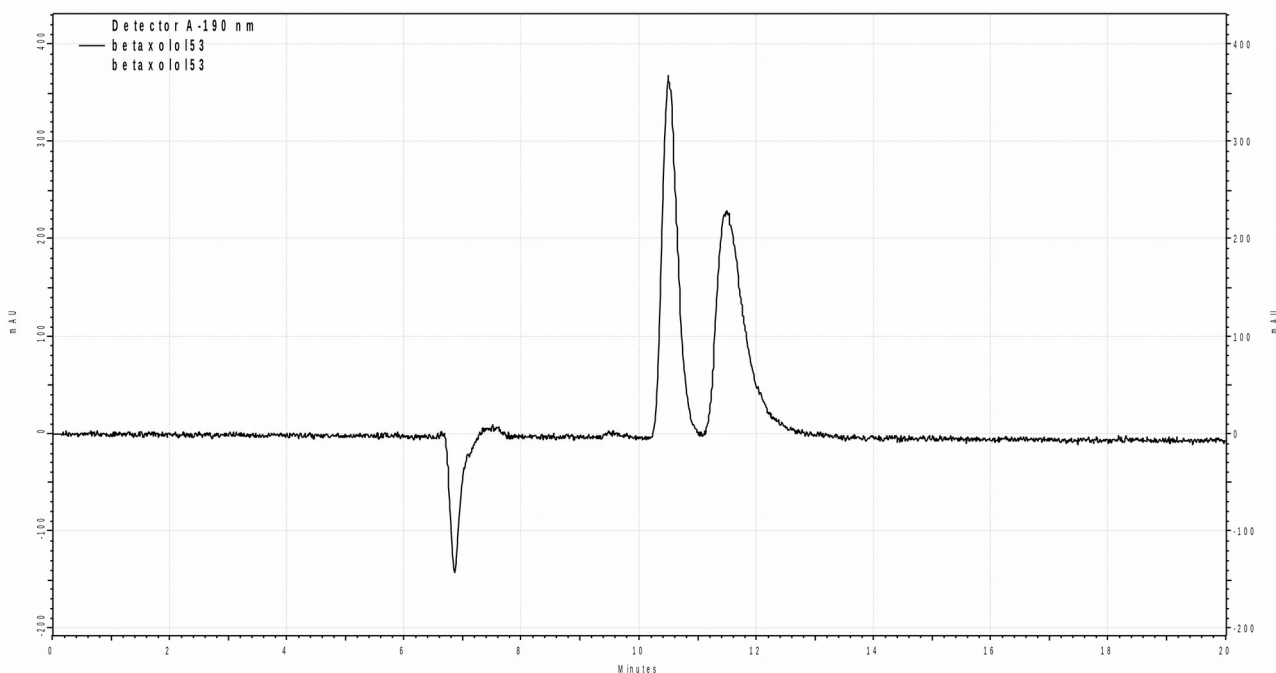
2.4 Zpracování biologických vzorků před HPLC (LLE)

Směs vzorku potkaní plazmy (100 μl), roztoku amoniaku 25 % (10 μl), roztoku vnitřního standardu $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$ (10 μl) a MTBE (300 μl) v plastové mikrozkuhavce (Eppendorf) byla 5 min třepána, poté byla 3 min odstředována. 280 μl MTBE vrstvy bylo odebráno do čisté plastové mikrozkuhavky (Eppendorf) a odpařeno. Odparek byl rekonstituován ve 100 μl mobilní fáze za použití ultrazvuku (5 min). Takto upravené vzorky byly nastříkovány ze skleněných vialek s kónickými inzerty.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

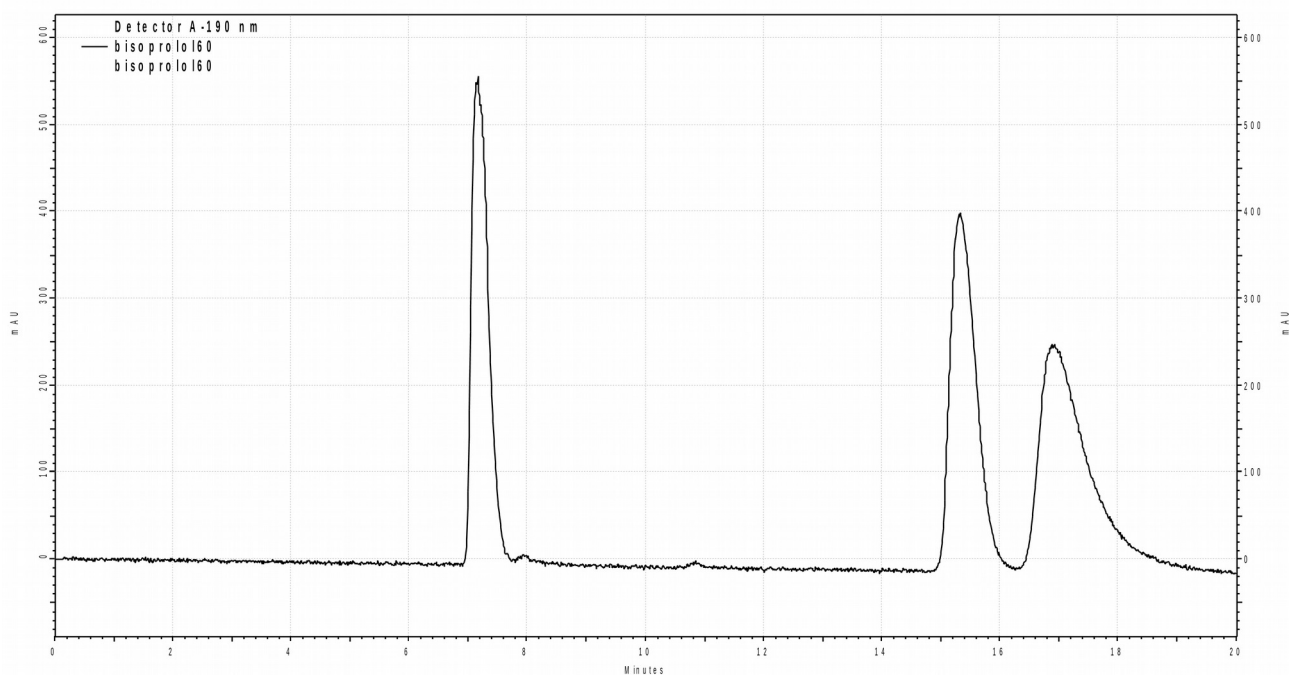
V první části práce byly zkoušeny mobilní fáze acetonitril+voda a metanol+voda. Byly prováděny pokusy s koncentracemi mobilní fáze od 100:0 až do 65:35 u obou uvedených kombinací mobilní fáze. Změna koncentrace mobilní fáze byla prováděna skokem o 5 %. S těmito mobilními fázemi nebylo dosaženo separace enantiomerů, proto nejsou uvedeny žádné chromatogramy z těchto pokusů.

Následně se ukázalo, že ani při použití roztoku chloristanu sodného o koncentraci 1 mol.l^{-1} a methanolu není separace uspokojivá, proto byla v roli mobilní fáze dále testována pouze směs acetonitril+chloristan sodný (1 mol.l^{-1}). Dosažení optima bylo opět dosaženo opět po sestupné změně mobilní fáze o 5 % ve prospěch vodné fáze. Po provedení řady pokusů bylo v případě betaxololu dosaženo velmi dobré separace, jak ukazuje obr. 11.



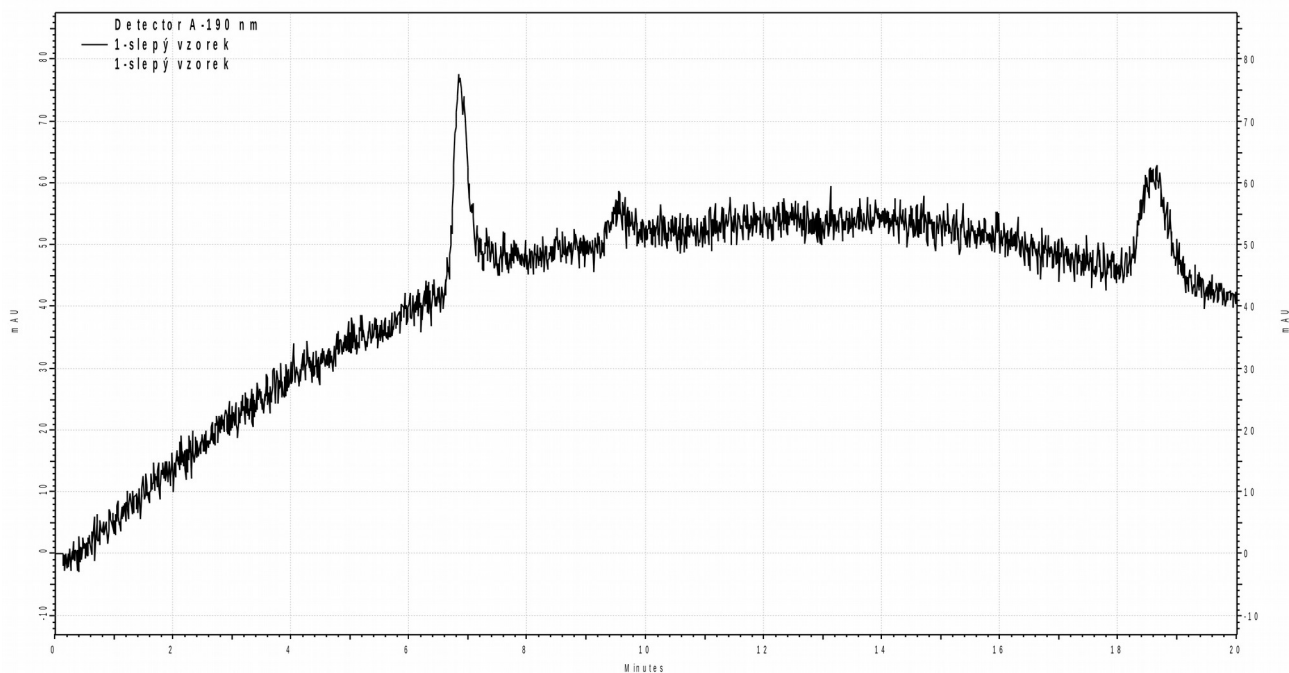
Obrázek 11: Chromatogram vzorku betaxololu, Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok $0,5 \text{ ml/min}$, teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$, nástřik $5 \text{ } \mu\text{l}$, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190 \text{ nm}$, $t_R = 10,45$ a $11,47 \text{ min}$.

V případě bisoprololu byly oba enantiomery rovněž úspěšně odděleny, ovšem za poněkud jiných podmínek (obr. 12).



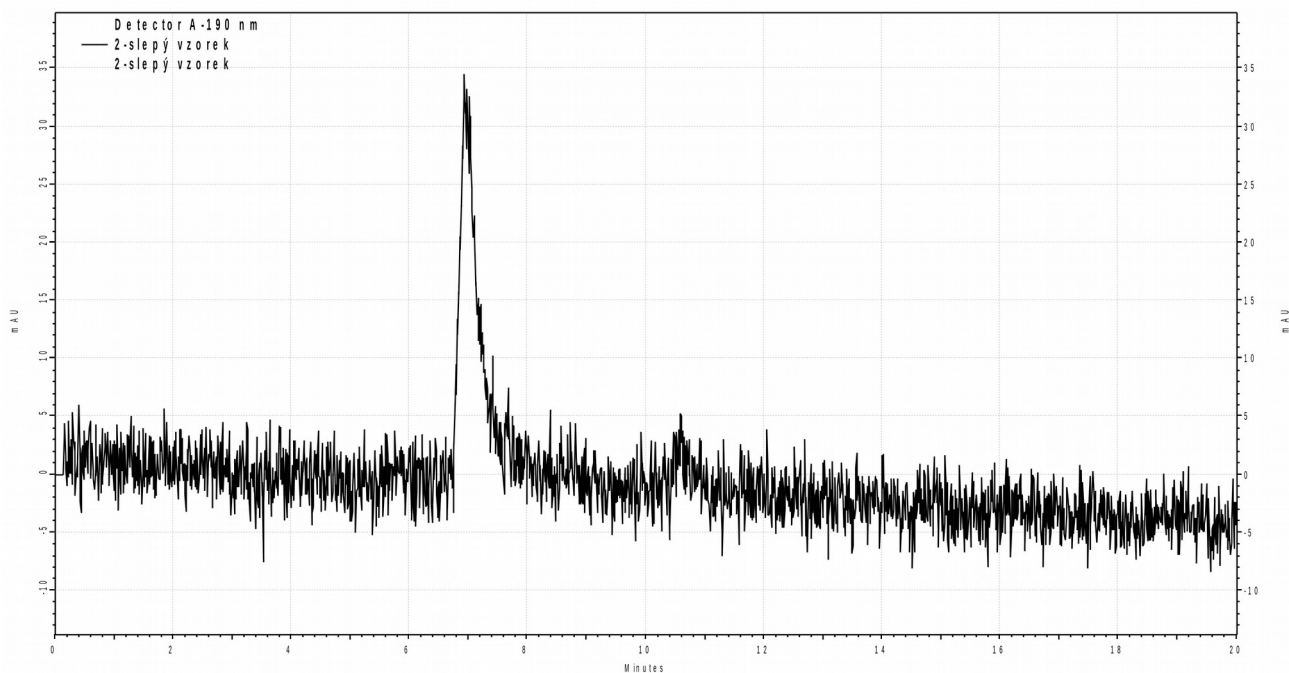
Obrázek 12: Chromatogram vzorku bisoprololu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 15,42$ a $16,95$ min.

Dále byla provedena extrakce čisté krysí plazmy podle popisu v odstavci 2.4. Chromatogramy slepého vzorku za podmínek pro stanovení betaxololu i bisoprololu uvádějí obr. 13 a 14. Z těchto chromatogramů je zřejmé, že v retenčních časech příslušných enantiomerů neeluují žádné endogenní látky. Vzhledem ke strukturám obou studovaných látek se může zdát použití amoniaku jako sporné, avšak některé literární zdroje, například [37] dokonce uvádějí použití hydroxidu sodného. Následující dva chromatogramy (viz obr. 15 a 16) již ukazují separaci enantiomerů po extrakci z krysí plazmy. Koncentrace betaxololu i bisoprololu v plazmě byla $0,0004 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.



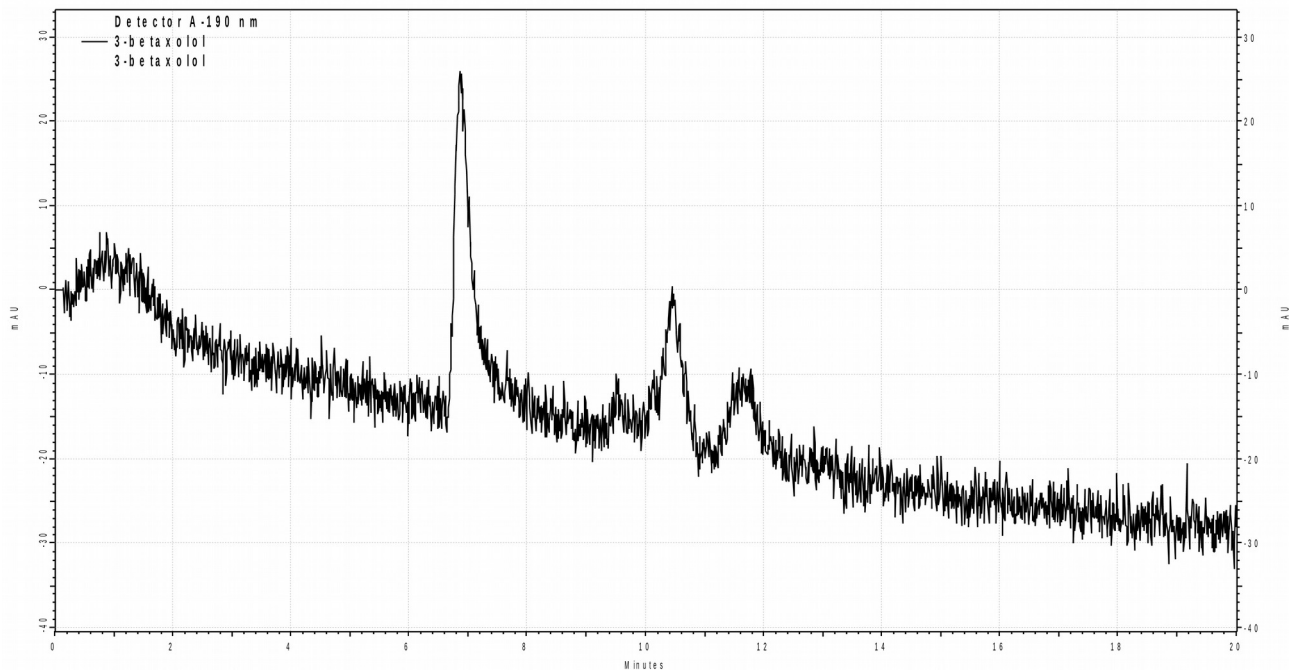
Obrázek 13: Chromatogram slepého vzorku. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm

Chromatogramy obou slepých vzorků (obr. č. 13 a 14) neudrží stabilní baselinu, což může být dáno nízkými odezvami vzorků. Na obou chromatogramech lze identifikovat systémové píky při retenčním čase okolo 7 min. Tyto systémové píky lze identifikovat na všech chromatogramech (viz obr. 11 až 20).



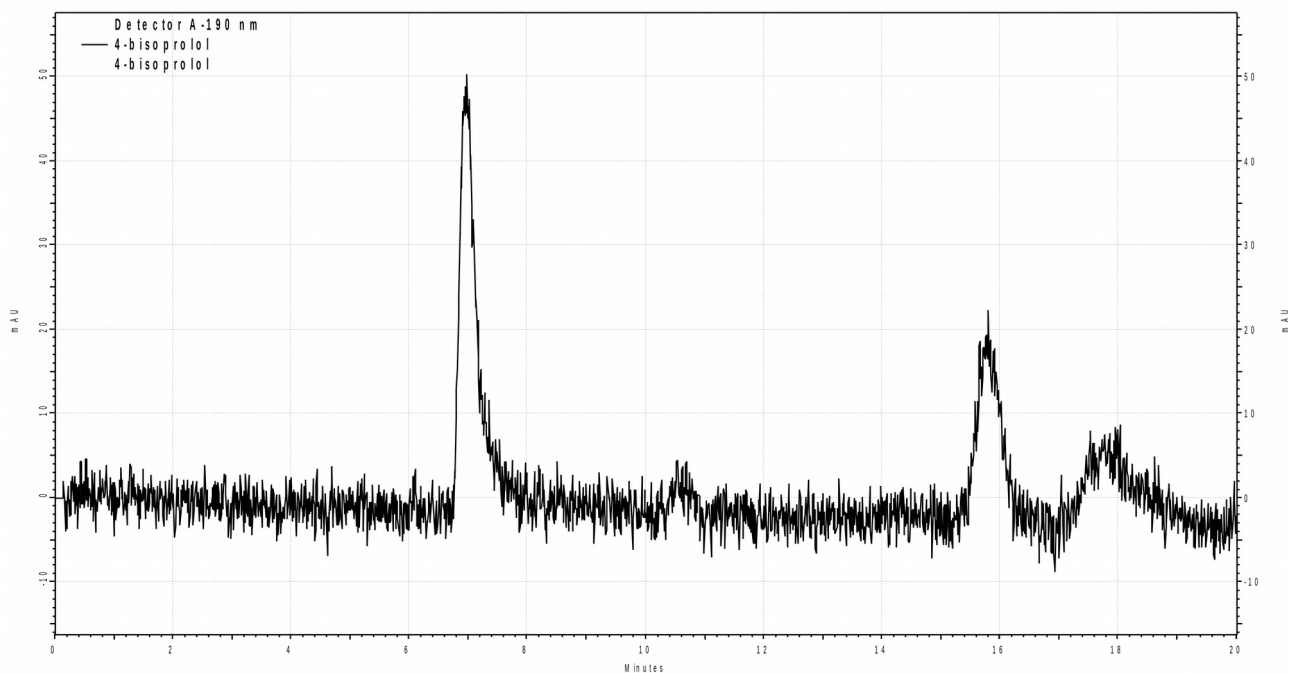
Obrázek 14: Chromatogram slepého vzorku. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm

Na obr. č. 15 lze vidět vzorek betaxololu v krysí plazmě. Na chromatogramu lze identifikovat rozdělené enantiomery betaxololu se shodnými retenčními časy jako chromatogram na obr. č. 11. Chromatogram opět nedrží rovnou baselinu díky nízké odezvě vzorků. Separace betaxololu v plazmě je možno dále využít v praxi k identifikaci látek v krvi.



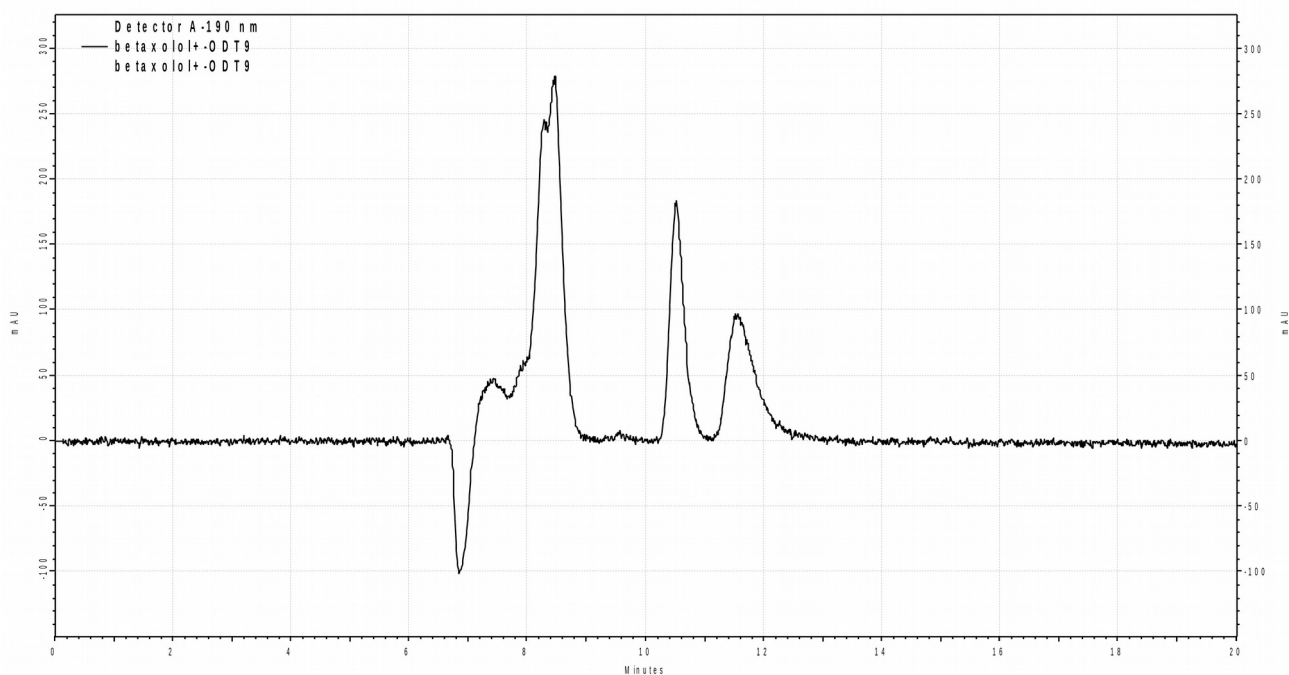
Obrázek 15: Chromatogram vzorku betaxololu v plazmě. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 10,42$ a $11,75$ min.

Na obr. č. 16 je uveden chromatogram separace bisoprololu v kyslí plazmě, kde lze identifikovat dva rozdělené enantiomery v retenčních časech podobných s retenčními časy v optimu, který je uveden na obr. č. 12. Opět je problém s nízkou odezvou vzorků a poměrně nestabilní baselinou.



Obrázek 16: Chromatogram vzorku bisoprololu v plazmě. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 15,82$ a $17,88$ min.

Na obr. č. 17 je uveden chromatogram se vzorkem betaxololu a potenciálním vnitřním standardem O-desmethyltramadolu s retenčním časem cca 8,25 min. Z analýzy je patrné, že není použitelný pro praxi z důvodu obtížného zjištění plochy píku a následné nepřesné určení koncentrace vzorků.

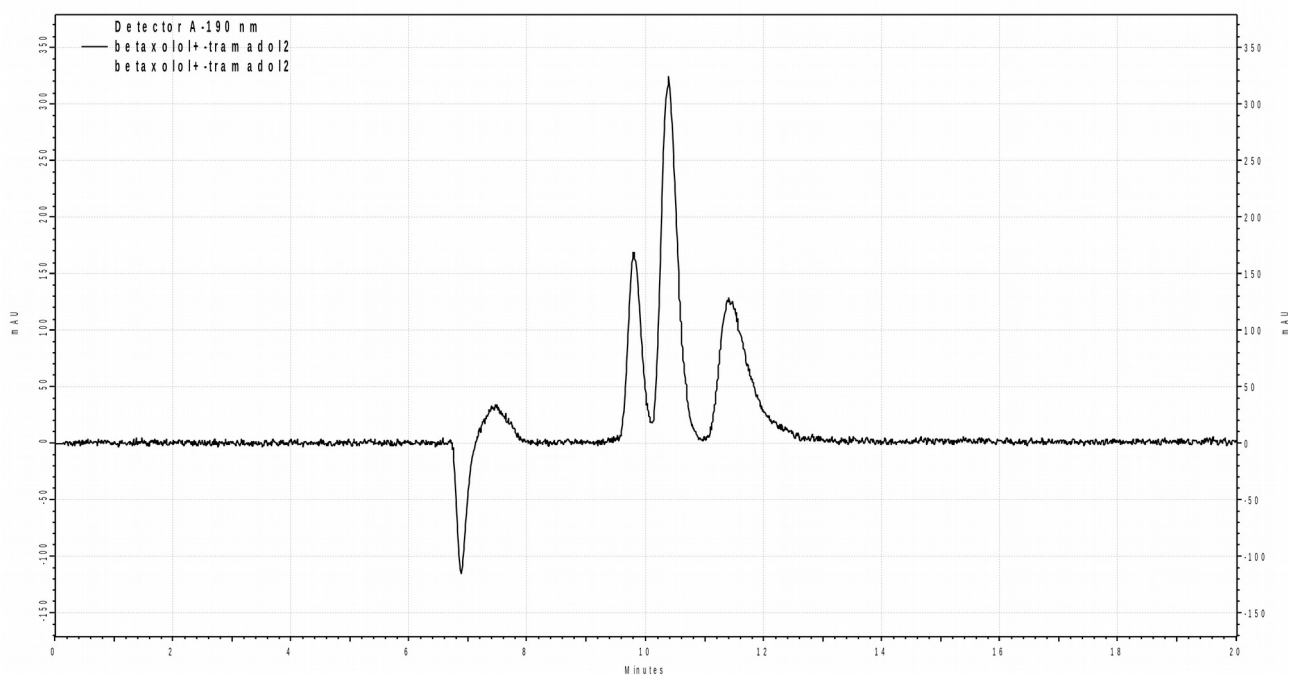


Obrázek 17: Chromatogram vzorku betaxololu a vnitřního standardu O-desmethyltramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 10,51$ a $11,44$ min.

Obr. č. 18 zobrazuje chromatogram betaxololu s potenciálním vnitřním standardem tramadolem. K separaci enantiomerů dochází nejen u betaxololu, ale také u vnitřního standardu. Nevýhodou separace je, že splývají píky jednoho enantiomeru betaxololu a jednoho enantiomeru tramadolu. Tato nevýhoda znemožňuje využití tramadolu jako vnitřního standardu.

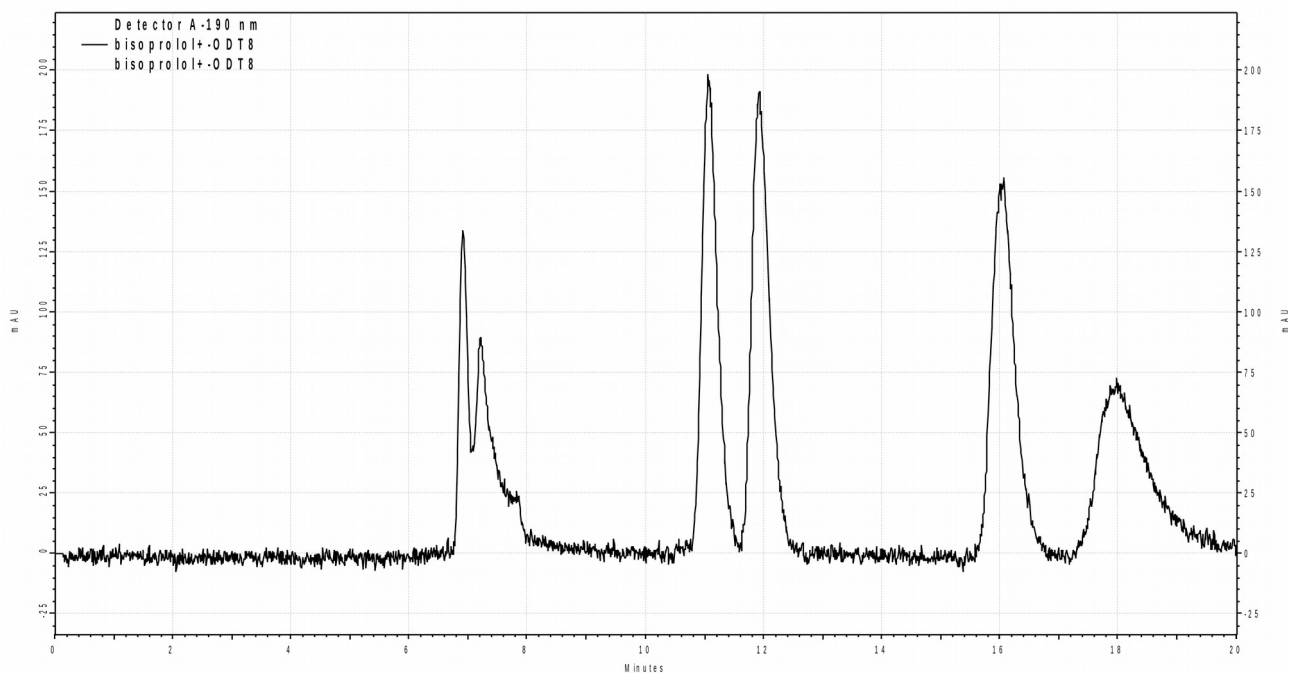
Shrneme-li chromatogramy s betaxololem a vnitřními standardy tramadolem a O-desmethyltramadolem, oba vnitřní standardy jsou pro praxi nepoužitelné. Pík O-desmethyltramadolu interferuje se systémovým píkem a pík tramadolu splývá s píkem jednoho enantiomeru betaxololu.

Analýza byla provedena změnou mobilní fáze kolem optima pro oddělení systémového píku a píku O-desmethyltramadolu, ale nebylo dosaženo požadovaného výsledku. Změna mobilní fáze byla prováděna pro koncentrace mobilní fáze acetonitril+chloristan sodný 51:49, 52:48, 49:51 a 48:52. Uvedenou změnou koncentrací mobilní fáze pouze došlo k rozmytí posledního píku.



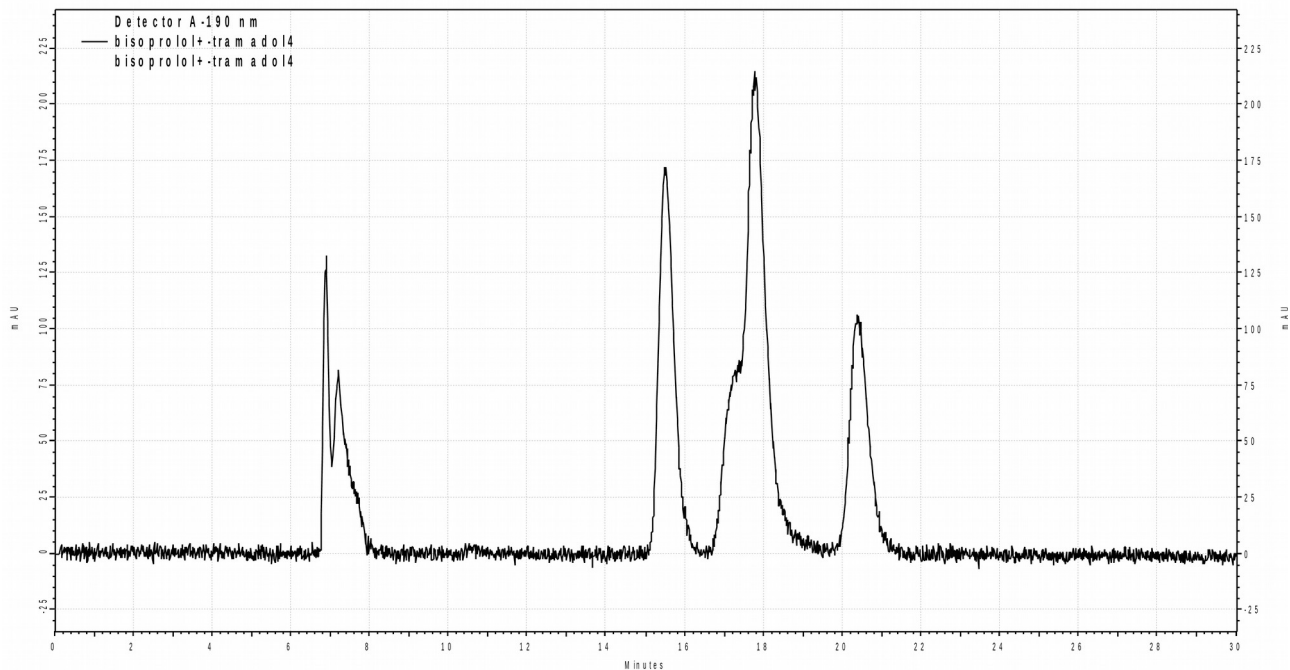
Obrázek 18: Chromatogram vzorku betaxololu a vnitřního standardu tramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 10,41$ a $11,46$ min.

Na obr. č. 19 lze rozpoznat systémový pík s retenčním časem okolo 7 min., dále následují dva píky rozdělených enantiomerů vnitřního standardu O-desmethyltramadolu s retenčními časy 11,07 a 11,94. Poslední dva píky patří rozděleným enantiomerům bisoprololu. O-desmethyltramadol je tedy použitelný jako vnitřní standard, jestliže bude počítáno se součtem ploch píků obou enantiomerů vnitřního standardu.



Obrázek 19: Chromatogram vzorku bisoprololu a vnitřního standardu O-desmethyltramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 16,02$ a $18,01$ min.

Tramadolu není kompatibilní s užitím jako vnitřní standard při separaci bisoprololu, což je patrné na obr. č. 20. Opět dochází k separaci vnitřního standardu tramadolu a zároveň pík jednoho z enantiomerů tramadolu splývá s píkem enatiomeru bisoprololu.



Obrázek 20: Chromatogram vzorku bisoprololu a vnitřního standardu tramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, $t_R = 17,77$ a 20,36 min.

Jako vnitřní standard k separaci bisoprololu se jeví použitelný pouze O-desmethyltramadol.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala hledáním složením optimální koncentrace mobilní fáze pro separaci dvou enantiomerů betaxololu a bisoprololu. Pro analýzu pomocí HPLC byla použita chirální kolona Daicel Chiralcel ® OD-R 4,6 mm x 250 mm, particle size 10 µm, Part No. 14625.

Pro separaci dvou enantiomerů betaxololu bylo nalezeno optimum v koncentraci mobilní fáze acetonitril+chloristan sodný ($c=1 \text{ mol.l}^{-1}$) 50:50 a pro bisoprolol je optimum při stejném složení mobilní fáze acetonitril+chloristan sodný 35:65.

Dále bylo ověřeno analýzou slepého vzorku (extraktu krysí plazmy), že nedochází k překryvu píků analytů a píků endogenních látek.

Byl rovněž učiněn pokus vyhledat vhodné vnitřní standardy. V této roli byly testovány tramadol a O-desmethyltramadol. V případě betaxololu nebyla v uvedené roli použitelná ani jedna z těchto látek. V případě bisoprololu lze použít O-desmethyltramadol jako vnitřní standard.

Tím byly cíle této práce splněny.

K dopracování vyvíjených metod bude třeba dokončit hledání vnitřního standardu pro betaxolol a dále zkusit najít citlivější detekci. Protože použití UV-detekce nebude patrně potřebné, nebyla s touto detekcí provedena úplná validace obou metod.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ALI I., GAITONDEB V. D., ABOUL-EINEIN H. Y., HUSSAIN A. Chiral separation of β -adrenergic blockers on CelluCoat column by HPLC. *Talanta* 78 (2009), 458-463
- [2] MORANTE-ZARCERO S., SIERRA I., Comparative HPLC methods for β -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62 (2012). 33– 41
- [3] MARTÍNKOVÁ J., a kol., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-3
- [4] LÉKAŘI-ONLINE. CZ. Betablokátory nejen snižují krevní tlak, ale mají i další pozitivní účinky na lidský organismus. Čtěte více! [online]. 2013 [cit. 23. 6. 2018]. Dostupné z: <https://www.lekari-online.cz/health-and-beauty/betablokatory>
- [5] ŘIHÁČEK I., SOUČEK M., FRÁŇA P. Betablokátory v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. *Medicína pro praxi* 2 (2005). 58-61
- [6] LULLMANN H., MOHR K., HEIN L., *Barevný atlas farmakologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3908-3
- [7] RUDOLF K., MALÝ J. Co by měl lékárník vědět o lékových interakcích a nežádoucích účincích kardiovaskulární terapie. *Praktické lékařství* 5 (2010). 240-243
- [8] WIKIWAND. Betaxolol [online]. 2018 [cit. 6. 8. 2018]. Dostupné z: <http://www.wikiwand.com/en/Betaxolol>
- [9] PUBCHEM. Betaxolol [online]. 2018 [cit. 23. 6. 2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2369#section=Top>
- [10] DRUGS.COM. Betaxolol tablets [online]. 2018 [cit. 23. 6. 2018]. Dostupné z : <https://www.drugs.com/pro/betaxolol-tablets.html>
- [11] WIKIPEDIA. Bisoprolol [online]. 2018 [cit. 6. 8. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bisoprolol>

- [12] DRUGS.COM. Bisoprolol [online]. 2018 [cit. 24. 6. 2018]. Dostupné z : <https://www.drugs.com/pro/bisoprolol.html>
- [13] PUBCHEM. Bisoprolol [online]. 2018 [cit. 24. 6. 2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2405#section=Top>
- [14] MCMURRY J., Organická chemie. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8
- [15] WIKIPEDIA. Chiralita [online]. 2018 [cit. 6. 8. 2018]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chiralita>
- [16] ČERVINKA O., Chiralita a pojmy s ní související. Chemické listy 93 (1999), 294-305
- [17] DAVANKOV V. A., Analytical Chiral Separation Methods. IUPAC Recommendations 1997.
- [18] SOCRATIC. How do diastereomers differ from optical isomers? [online]. 2016 [cit. 7. 8. 2018]. Dostupné z: <https://socratic.org/questions/how-do-diastereomers-differ-from-optical-isomers>
- [19] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UPOL. Cvičení z instrumentálních metod [online]. 2015 [cit. 7. 8. 2018]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/files/Skriptum-IMC-v2.pdf>
- [20] JAPI. Rediscovering Chirality – Role of S-Metoprolol in Cardiovascular Disease Management [online]. 2017 [cit. 7. 8. 2018]. Dostupné z: <https://www.semantic-scholar.org/paper/Rediscovering-Chirality-Role-of-S-Metoprolol-in-Mohan-Shah/7806cc5240d3b1bd29b866219fc44a2b711f8ee4>
- [21] ANZENBACHER P., JEZDINSKÝ J. Léčiva a chiralita. Klinická farmakologie 17 (2003). 148-150
- [22] KLIMEŠ J., a kol., Kontrola léčiv I., Praha: Karolinum, 2004. ISBN 978-80-246-1613-1
- [23] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY. Afinitní chromatografie [online]. 1996 [cit. 15. 7. 2018]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~suchan/AC.pdf>

- [24] INFORMAČNÍ SYSTÉM MASARYKOVY UNIVERZITY. Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda [online]. 2018 [cit. 15. 7. 2018]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/p9qdf/Appendix_III_vysledky.pdf
- [25] KATEDRA FYZIKY PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UJEP. Chromatografické metody [online]. 2018 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf
- [26] ÚSTAV ANALYTICKÉ CHEMIE VŠCHT PRAHA. Chromatografie [online]. 2015 [cit. 15. 7. 2018]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/4OPPAst.pdf>
- [27] HPLC.CZ. Teorie HPLC / Základy HPLC [online]. 2016 [cit. 16. 7. 2018]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [28] ÚSTAV FYZIKY A MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ UNIVERZITY TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ. Chromatografie [online]. 2009 [cit. 15. 7. 2018]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf
- [29] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kol.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- [30] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [online]. 1996 [cit. 14. 7. 2018]. Dostupné z : <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [31] JANDERA P., Pokroky v současné vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Chemagazín 26 (2016)
- [32] HPLC.CZ. Validace analytických metod [online]. 2016 [cit. 1. 8. 2018]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [33] HPLC.CZ. Chirální separace [online]. 2016 [cit. 29. 7. 2018]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [34] FILOZOFICKÁ FAKULTA UK. Určení spolehlivosti měření metodou náhodných vzorků [online]. 2016 [cit. 7. 8. 2018]. Dostupné z : <http://ucnk.korpus.cz/bonito/nahoda.php>

- [35] WIKIPEDIA. Desmetramadol [online]. 2018 [cit. 28. 8. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Desmetramadol>
- [36] WIKIPEDIA. Tramadol [online]. 2018 [cit. 28. 8. 2018]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tramadol>
- [37] DULGER B., BASCI N. E., SAGDIC-YLAVAC I., TEMIZER A., Determination of betaxolol in human aqueous humour by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr. B 772 (2002), 179 – 183.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1:Obecný vzorec beta-blokátorů [6].....	11
Obrázek 2: Vzorec betaxololu [8].....	13
Obrázek 3: Vzorec bisoprololu [11].....	14
Obrázek 4: Absolutní konfigurace dle Cahn-Ingold-Prelovova systému [15].....	15
Obrázek 5:Konfigurace enantiomerů a diastereoizomerů [18].....	16
Obrázek 6: Princip polarimetru [19].....	17
Obrázek 7: Interakce páru enantiomerů s chirálním receptorem [20].....	18
Obrázek 8: Jednoduché schéma HPLC [30].....	21
Obrázek 9: Směrodatná odchylka [34].....	29
Obrázek 10: Vzorce testovaných vnitřních standardů tramadolu a O-desmethyltramadolu [35], [36].....	31
Obrázek 11: Chromatogram vzorku betaxololu, Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 10,45 a 11,47 min.....	34
Obrázek 12: Chromatogram vzorku bisoprololu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 15,42 a 16,95 min.....	35
Obrázek 13: Chromatogram slepého vzorku. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm.....	36
Obrázek 14: Chromatogram slepého vzorku. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm.....	37
Obrázek 15: Chromatogram vzorku betaxololu v plazmě. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 10,42 a 11,75 min.....	38
Obrázek 16: Chromatogram vzorku bisoprololu v plazmě. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 15,82 a 17,88 min.....	39
Obrázek 17: Chromatogram vzorku betaxololu a vnitřního standardu O-desmethyltramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 10,51 a 11,44 min.....	40

Obrázek 18: Chromatogram vzorku betaxololu a vnitřního standardu tramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 50:50, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 10,41 a 11,46 min.....41

Obrázek 19: Chromatogram vzorku bisoprololu a vnitřního standardu O-desmethyltramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 16,02 a 18,01 min.....42

Obrázek 20: Chromatogram vzorku bisoprololu a vnitřního standardu tramadolu. Mobilní fáze: acetonitril+chloristan sodný (1 mol/l) 35:65, průtok 0,5 ml/min, teplota 25 °C, nástřik 5 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 190$ nm, tR = 17,77 a 20,36 min.....43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení beta-blokátorů podle selektivity [5].....10

Tabulka 2: Rozdělení beta-blokátorů podle lipofility a hydrofility [5].....12