

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**ANALYTICKÉ HODNOCENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK KAPALINOVOU
CHROMATOGRAFIÍ II.**

Úvodní studie do problematiky SPME

(diplomová práce)

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji panu Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při sestavování diplomové práce. Zároveň bych chtěl poděkovat i dalším členům katedry za ochotu při vypracovávání praktické části diplomové práci.

OBSAH

1. ÚVOD	str. 5
2. TEORETICKÁ ČÁST	str. 7
2.1 Chromatografie	str. 8
2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	str. 11
2.2.1 Definice základních principů	str. 11
2.2.2 Základní veličiny	str. 11
2.2.3 Základní části kapalinového chromatografu	str. 14
2.3 Biologický materiál	str. 20
2.3.1 Volba, odběr a základy zpracování biologického materiálu	str. 20
2.3.2 Úprava biologického materiálu deproteinací	str. 22
2.4 Extrakční procesy při úpravě kapalných vzorků pro následnou analýzu	str. 24
2.4.1 Extrakce kapalina-kapalina	str. 24
2.4.2 Extrakce tuhou fází	str. 25
2.4.3 Mikroextrakce tuhou fází	str. 30
2.5 Benzodiazepiny	str. 38
2.5.1 Oxazepam	str. 39
2.6 Rešerše	str. 40
3. CÍL PRÁCE	str. 44
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	str. 46
4.1 Použitý materiál	str. 47
4.2 Příprava standardů a vzorků	str. 49
4.3 Provedení extrakce PDMS vláknem	str. 50
4.4 Podmínky HPLC analýzy	str. 51
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	str. 52
5.1 Výběr chrom. podmínek pro HPLC analýzu vybraných benzodiazepinů ...	str. 53
5.2 Extrakce oxazepamu z vodného roztoku užitím PDMS vlákna	str. 57

5.2.1 Stanovení minimální detekovatelné koncentrace	str. 57
5.2.2 Porovnání výtěžků mikroextrakce při různých dobách trvání sorpce a desorpce	str. 60
5.2.3 Výpočet množství oxazepamu v extraktu	str. 65
5.2.4 Výsledné hodnoty konc. oxazepamu po provedení mikroextrakce .	str. 66
5.2.5 Porovnání extrakcí při pH nezměněném a upraveném	str. 70
5.3 Extrakce oxazepamu z plasmy užitím PDMS vlákna	str. 71
5.3.1 Zjištění výtěžnosti extrakce oxazepamu ze zředěné plasmy	str. 71
5.3.2 Zjištění výtěžnosti extrakce oxazepamu z plné plasmy	str. 76
6. ZÁVĚR	str. 78
7. LITERATURA	str. 80
8. SEZNAM ZKRATEK	str. 83

1. ÚVOD

Mezi separačními metodami hraje v současnosti jednu z hlavních rolí chromatografie. Do této skupiny patří několik různých metod, které mají jedno společné. Vždy během nich dochází k rozdělování složek analyzované směsi mezi dvě fáze, což se děje na základě různých fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých sloučenin. Chromatografie umožňuje vykonávat několik procesů najednou, a to dělení, identifikaci a rovněž kvantitativní stanovení chemických látek.

Mezi v současnosti používanými chromatografickými metodami zaujímá jednu z předních příček vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). K jejím hlavním přednostem patří vysoká citlivost a selektivita. Separace a vytvoření reprodukovatelného záznamu umožňujícího kvantitativní vyhodnocení lze navíc poměrně jednoduše dosáhnout v krátkém časovém horizontu. K výhodám HPLC bezesporu patří i to, jak velkou šíři látek od nízkomolekulárních až po ty s vyšší relativní molekulovou hmotností její pomocí lze stanovovat.

Při analýze tělních tekutin a jiného biologického materiálu je vždy třeba počítat s jeho různými složkami, které mohou nepříznivě ovlivnit průběh extrakce a zkreslit výsledné hodnoty analyzované látky. Během přípravy vzorků pro extrakci je třeba provést takové kroky, aby tento vliv byl v co největší míře eliminován. Jako efektivní extrakční metoda se v tomto směru jeví mikroextrakce tuhými fázemi. Jedná se o jednoduchou a účinnou sorpční a desorpční techniku zakoncentrování analytu, která nepotřebuje ani rozpouštědla ani komplikované aparatury. K provádění mikroextrakce se užívá speciálního vlákna, které při vhodném výběru umožní dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografie^[1,2,3]

Chromatografie je metodou, která umožňuje efektivně analyzovat směsi látek a poskytnout tak hodnocení jednotlivých separovaných složek z hlediska kvalitativního i kvantitativního. Jedná se tedy o metodu separační, což ji příkládá v analýze léčiv významné postavení. Širokého uplatnění se této metodě dostává na základě faktu, že se většina přírodních látek vyskytuje v podobě směsí.

Mezi chromatografické metody jsou zahrnuty všechny ty, při nichž dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi dvěma i více fázemi. Jedna fáze je umístěna v ploché vrstvě nebo koloně a podle toho se nazývá stacionární, zatímco ta druhá označovaná jako mobilní přes ni unáší separované látky. U dělených látek ve styku se stacionární a mobilní fází dochází k interakcím, které zajišťují jejich separaci. Interakce dělených látek se stacionární a mobilní fází jsou totiž vzájemně nestejně, a to zpravidla jak z hlediska velikosti vzájemně působících sil, tak povahy interakcí.

Chromatografické metody se dají podle různých hledisek dělit do několika typů. K základnímu rozlišení jednotlivých metod se dá využít dělení podle čtyř parametrů, a sice podle typu mobilní fáze, separačního mechanismu, pracovní techniky a prostorového uspořádání.

Dělení podle typu mobilní fáze^[1]

- a.) *Plynová*. Mobilní fáze je ve stavu plynném, zatímco stacionární tvoří kapalina (chromatografie plyn-kapalina) nebo pevná látka (chromatografie plyn-pevná látka)
- b.) *Kapalinová*. Mobilní fází tvoří kapalina, zatímco stacionární pevná látka (chromatografie kapalina-pevná látka) popřípadě kapalina s mobilní fází nemísitelná (chromatografie kapalina-kapalina)

Dělení podle separačního mechanismu^[1,2]

- a.) *Adsorpční*. K procesu separace zde dochází na základě rozdílné adsorbovatelnosti dělených látek na aktivní povrch stacionární fáze, která se v tomto případě označuje jako sorbent. Ten je charakterizován určitými kvantitativními a kvalitativními vlastnostmi svého povrchu. Nejčastěji se jako sorbent užívá silikagel nebo oxid hlinitý. Do této skupiny se řadí chromatografie pevná fáze – plyn a pevná fáze – kapalina.

- b.) *Rozdělovací.* V tomto případě je proces separace umožněn rozdílnou rozpustností dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách. K tomu dochází u kapalinové rozdělovací chromatografie, druhou možností je pak plynová rozdělovací chromatografie, kde dochází k separaci dělených látek unášených plynnou mobilní fází na kapalnou stacionární fází.
- c.) *Iontově výměnná.* U této chromatografie dochází k procesu výměny iontů, neboť zde stacionární fází tvoří tzv. iontoměničce. Dělené látky mají k jejich funkčním skupinám různou afinitu danou různou velikostí iontů, jejich mocností a rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin.
- d.) *Gelová.* Zde separace probíhá na základě rozdílné velikosti molekul dělených látek. Stacionární fází tvoří porézní materiál (gel), jímž pronikají molekuly rychlostí závislou na své velikosti. Látky s většími molekulami se tak soustavou pohybují rychleji, zatímco ty s menšími samozřejmě pronikají hlouběji do pórů a jejich pohyb je tím zbrzděn.
- e.) *Afinitní.* Tento typ zahrnuje specifické vysoce selektivní interakce mezi dvěma látkami u některých biologických a biochemických procesů. Ve své podstatě se však nejedná o chromatografický proces jako takový.

Dělení podle pracovní techniky^[3]

- a.) *Frontální.* U tohoto typu chromatografie je roztok dělených látek na kolonu přiváděn během celého jejího průběhu. V počátečních fázích se z kolony neuvolňuje žádná z látek a vychází z ní jen čistá mobilní fáze. Následně se po určité době ze stacionární fáze začne uvolňovat látka s nejmenší afinitou k této fázi. Posléze se začne uvolňovat i další z látek dané směsi a až v poslední fázi procesu kolonou prochází roztok dělených látek ve složení nezměněném oproti tomu, v jakém je na kolonu vháněn.
- b.) *Vytěšňovací.* Tento typ chromatografie se začíná nanesením směsi dělených látek na kolonu. Ve zbylém průběhu procesu již další množství této směsi na kolonu přiváděno není, pouze je přiváděna látka označovaná jako vytěšňovadlo. Jedná se o látku, která má vůči stacionární fázi vyšší afinitu než kterákoliv ze složek dělené směsi. Postupně tak během procesu chromatografie ze stacionární fáze vytěšňuje látky dělené směsi, z nichž kolonu jako první opouští látka s nejnižší afinitou. Následně jsou vytěšňovány i zbylé složky dělené směsi podle

jejich rostoucí afinity k stacionární fázi a jako poslední pak odtéká samo vytěšňovadlo.

- c.) *Eluční*. V tomto příkladu chromatografie dochází nejprve k nanesení určitého malého množství roztoku směsi dělených látek na kolonu. Ta je v průběhu celého procesu promývána mobilní fází, kterou je látka nebo směs látek o afinitě ke stacionární fázi nižší oproti kterémukoliv členu směsi dělených látek. Každá složka směsi je vymývána individuálně nezávisle na ostatních a čas jejího vymytí koresponduje s její afinitou vůči stacionární fázi. Nejprve se tak z kolony dostává ta látka, která má z dané směsi afinitu nejnižší. Podle provádění lze eluci rozdělit na izokratickou (během celého procesu stále stejná mobilní fáze), vícestupňovou (dochází ke změně mobilní fáze během vymývání kolony, přičemž každá následující je silnějším eluentem) a gradientovou (složení mobilní fáze během procesu plynule měněno).

Dělení podle prostorového uspořádání^[1]

- a.) *Plošná*. Do této skupiny se řadí chromatografie papírová (PC) a na tenké vrstvě (TLC)
- b.) *Kolonová*. Sem patří vysokoúčinná kapalinová (HPLC) a plynová chromatografie (GC)

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie^[1]

2.2.1 Definice základních principů^[1]

Podstatou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je eluční vyvíjení, jehož výsledkem je záznam eluční křivky (píku) charakteristické pro dané látky obsažené v eluátu. Celý proces začíná nanesení směsi dělených látek na kolonu, čímž se na ní vytvoří eluční pás. Jeho složky jsou následně unášeny mobilní fází kolonou a během toho dochází k jejich interakci se stacionární fází (rozdělováním, adsorpcí apod.) a zpětnému přecházení do mobilní fáze, se kterou můžou rovněž interagovat. Tento proces se mnohonásobně opakuje a při dostatečné odlišnosti distribučních konstant jednotlivých dělených látek dojde po určité době k jejich částečnému nebo úplnému rozdělení do izolovaných pásů. Oddělené látky opouštějí kolonu v různém retenčním (elučním) čase, který závisí na velikosti jejich interakcí se stacionární fází. Čím jsou tyto interakce silnější, tím je samozřejmě retenční čas větší a daná látka se z kolony vymývá později.

2.2.2 Základní veličiny^[1]

Charakteristickými veličinami pro každou dělenou látku pomocí HPLC jsou retenční čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas vyjadřuje dobu, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky, zatímco retenční objem vyjadřuje objemové množství mobilní fáze proteklé za tuto dobu. Vzájemně spolu tyto dvě veličiny souvisejí vztahem: ^[1]

$$V_R = t_R F_M$$

(F_M – objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času)

Retenční objem sestává ze součtu dvou objemových veličin, kterými jsou redukovaný retenční objem V'_R a mrtvý objem představující celkový objem V_M , který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor.

Pro vyjádření účinnosti dělení lze využít několika následujících veličin, které vystihují kvantitativní i kvalitativní vztahy mezi dvěma separovanými látkami. Jedná se o relativní ostrost vyjádřenou vztahem: ^[1]

$$o = V_R / Y_V$$

(Y_V – šířka píku v základně vyjádřená v jednotkách objemu)

Dále do této skupiny patří relativní dělení dvou látek vyjádřené vztahem: ^[1]

$$S_{1,2} = (V_{R2} - V_{R1}) / V_{R2}$$

(V_{R1} – retenční objem dělené látky 1, V_{R2} – retenční objem dělené látky 2)

Součin dvou výše uvedených veličin relativní ostrosti a relativního dělení dvou látek se označuje jako relativní účinnost kolony. K vyjádření účinnosti dělení je dále využita ještě veličina rozlišení, kterou vyjadřuje vztah: ^[1]

$$R_{1,2} = 2 (V_{R2} - V_{R1}) / (Y_{V1} + Y_{V2})$$

Tímto způsobem lze hodnotu rozlišení vypočítat, ovšem nelze z takového vztahu zjistit, které veličiny ji ovlivňují. To je však důležité pro podstatu chromatografického procesu a zjištění způsobu, jakým zásahem do systému separaci zlepšit. Jednou z těchto veličin ovlivňujících rozlišení je kapacitní poměr, dalšími pak distribuční konstanta a účinnost. Kapacitní poměr je charakterizován následujícím vztahem: ^[1]

$$k = K_D V_S / V_M$$

(K_D – distribuční konstanta, V_S – objem stacionární fáze, V_M – mrtvý objem)

V praxi je možno kapacitní poměr vypočítat ze zjednodušeného vztahu vyjadřujícího, kolikrát je retenční objem separované látky větší než mrtvý objem: ^[1]

$$k = (V_R - V_M) / V_M$$

Z pohledu rozlišení se při volbě ideálních podmínek nemusí dosahovat co nejvyšší hodnoty, hlavní je docílit potřebného rozlišení v přijatelné době. S rostoucím rozlišením totiž stoupají požadavky na trvání analýzy a pracovní tlak, což není žádoucí. Zpravidla je dostačující dosáhnout rozlišení $R_{1,2} = 1$, kdy se vzdálenost mezi maximy obou píků právě rovná střední šířce píku a píky se jen nepatrně překrývají. Při hodnotě 1,5 se pak již dosáhne dokonalého rozdělení obou píků až na základní linii. Větší rozlišení již není žádoucí kvůli zbytečnému prodlužování doby analýzy. Po úpravě výše uvedeného vzorce pro rozlišení za využití hodnot kapacitního poměru, retenčního poměru a počtu teoretických pater, dostaneme následující vztah: ^[1]

$$R_{1,2} = 1/4 (r_{1,2} - 1) / r_{1,2} \sqrt{n_{ef}}$$

$n_{ef} = n [k / (1+k)]^2$ – efektivní počet pater kolony

K hodnocení vzniklého chromatogramu, který je výstupem měření, lze využít několik veličin. Jednou z nich je faktor symetrie, jenž hodnotí kvalitu píku z hlediska vzájemné symetrie jeho vzestupné a sestupné části. Ideální hodnotou značící naprostou symetrii píku je 1,0. Vypočítat faktor symetrie lze následujícím způsobem: ^[1]

$$A_S = w_{0,05} / 2d$$

($w_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky)

V případě neúplného oddělení nečistoty od stanovované látky lze využít jako kritérium způsobilosti systému poměr výšky píku k sedlu, jenž se vypočítá z tohoto vztahu: ^[1]

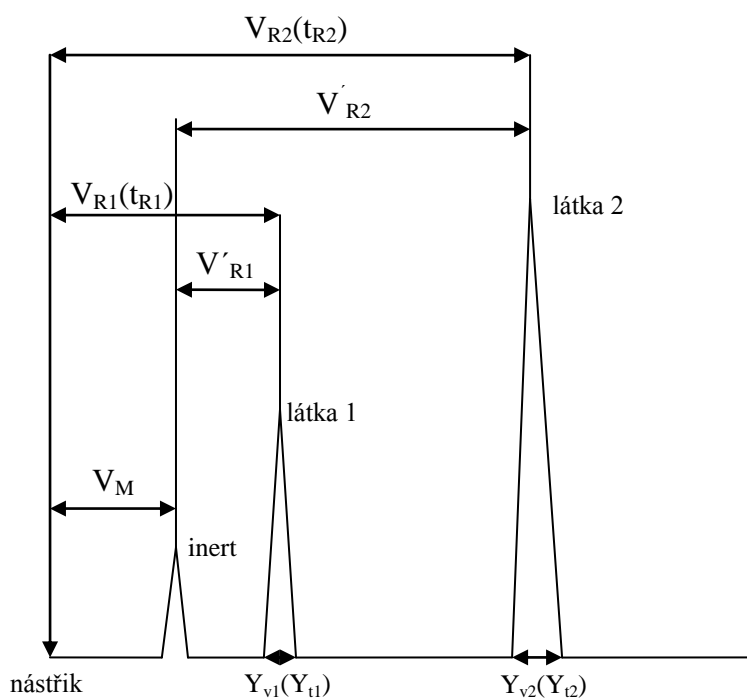
$$p/v = H_P / H_V$$

(H_P – výška píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií, H_V – výška nejnižšího bodu křivky oddělující pík nečistoty od píku stanovované látky nad extrapolovanou základní linií)

Při stanovování obsahu složek hraje podstatnou roli poměr signálu k šumu, který ovlivňuje přesnost stanovení. Vypočítat jej lze následujícím způsobem: ^[1]

$$S/N = 2H / h$$

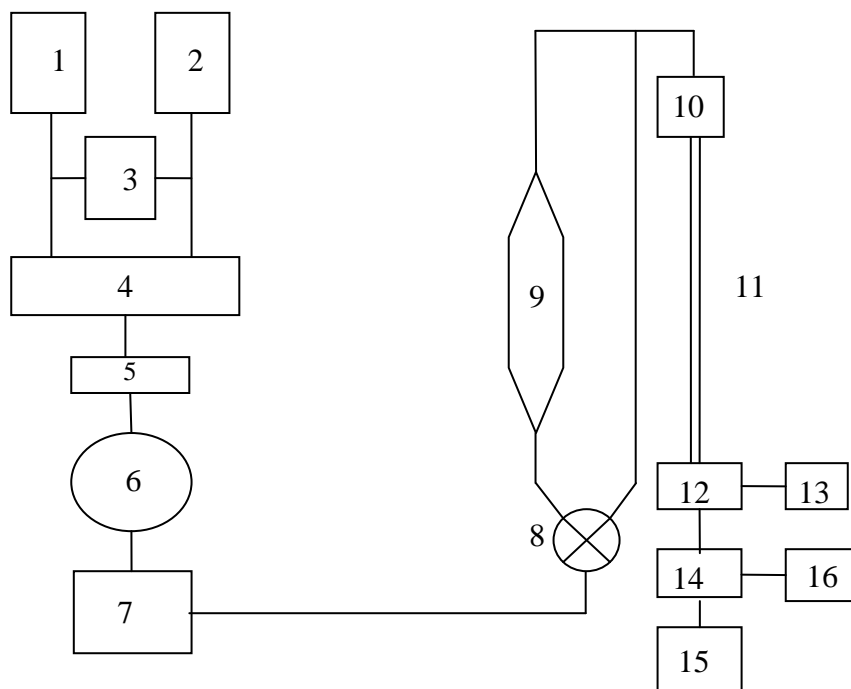
(H - výška píku, h – rozpětí šumu pozadí)



Obr. č. 1 Vzhled chromatografického záznamu dvou látek a nesorbujícího se inertu ^[1]

2.2.3 Základní části kapalinového chromatografu^[1]

Kapalinový chromatograf se musí skládat z takových částí, které zabezpečí čtyři základní úkony, a to transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. K tomu slouží základní části, které je možno vidět na Obr. č. 2. Ne vždy musí být všechny díly v chromatografu obsaženy, může dojít k řadě obměn, ale v zásadě musí být dodrženo řazení základních částí za sebou. Při konstrukci zařízení je třeba myslet i na vliv mrtvých prostorů, které by vedly k rozšiřování elučních křivek nad únosnou míru. Spoje mezi nástřikovým zařízením, kolonou a detektorem tak musí být konstruovány s ohledem na to, aby vzniklé mrtvé objemy byly co nejmenší.



1,2 – zásobníky mobilní fáze; 3 – programování gradientu; 4 – směšovač; 5 – odplyňovač; 6 – vysokotlaké čerpadlo; 7 – tlumič tlakových pulsů; 8 – trojcestný ventil; 9 – saturační předkolona; 10 – dávkovací zařízení; 11 – kolona; 12 – detektor; 13 – jímač frakcí; 14 – zesilovač; 15 – zapisovač; 16 - integrátor

Obr. č. 2 Blokové schéma kapalinového chromatografu^[1]

Zásobníky mobilní fáze

Jako zásobníků mobilní fáze se využívá skleněných nebo nerezových nádob o obsahu většinou do 2 litrů, které jsou umístěny v samostatném uzavřeném prostoru chromatografu, kde jsou chráněny před světlem a otevřeným ohněm.

Čerpadla

K procesu čerpání mobilní fáze je využíváno několika typů čerpadel. U pneumatických čerpadel je zdrojem energie stlačený plyn, který je buď zaveden přímo na hladinu stlačované kapaliny, nebo svou práci vykonává přes píst. V prvním případě je značnou nevýhodou fakt, že je stlačený plyn v bezprostředním kontaktu s kapalinou, což může vyústit v klesání účinnosti systému kvůli uvolňování plynu a u samotné detekce pak obsažené bublinky snižují její kvalitu. Výhodou všech typů pneumatických čerpadel je jejich nízká cena a dosažitelnost konstantního tlaku. Pro analytickou chromatografii však nejsou zrovna výhodná, neboť neposkytují konstantní průtok mobilní fáze a získané chromatogramy tak nejsou zvláště přesné a těžko se dají srovnávat na základě retenčních časů.

Následující skupinou jsou čerpadla s mechanickým pohonem, u nichž je tlak přenášený na píst či membránu vyvolán mechanicky pomocí elektromotorů. Řadí se sem čerpadla pracující na principu velkoobjemové injekční stříkačky, které jsou schopny dosahovat konstantního průtoku a nepulsujícího tlaku. Jako nevýhoda se však jeví limitovaný objem mobilní fáze a vysoká cena.

Čerpadla s malým objemem účinné části jsou taková, pro něž je charakteristická pulzní charakteristika tlaku a objemového průtoku v závislosti na čase. K vytlačování čerpané kapaliny dochází pístem nebo membránou. V případě druhého typu je navíc v hlavě čerpadla umístěna membrána zprostředkávající styk vytlačované hydraulické kapaliny s mobilní fází. Nevýhodou tohoto membránového typu čerpadla je mnohem větší mrtvý objem.

Dávkovací systémy

Po rozpuštění vzorku ve vhodném rozpouštědle je třeba jej nadávkovat do kolony, což se provádí za užití dávkovacích vysokotlakých ventilů se smyčkou nebo autosampleru se zásobníkem vzorku. Dokonalé dávkování vzorku do značné míry ovlivňuje účinnost celého chromatografického systému a při jeho nedokonalém provedení může vést k nadměrnému rozšiřování elučního píku a snižování účinnosti celého systému.

Kolony

Výběr správné kolony hraje v HPLC rozhodující význam. Její účinnost závisí kromě kvality použitého materiálu i na její délce, tvaru, materiálu, ze kterého je zhotovena, nebo vnitřním povrchu. Co se týče zmíněného materiálu, na výrobu kolon se zpravidla používá nerezové oceli nebo borosilikátového skla. Skleněné kolony jsou oproti odolnějším ocelovým daleko citlivější na hodnotu maximálního tlaku a zpravidla se nedoporučuje překračovat u nich hodnotu 10 MPa. Ve výjimečných případech se užívá k zhotovení kolony plastického polymeru umístěného do speciálního kovového pouzdra.

Účinnost kolony závisí na materiálu, kterým je naplněna, a na počtu teoretických pater potřebných k separaci dané směsi látek. Při posuzování délky z hlediska materiálu, kterým je kolona naplněna, se vychází z velikosti částic sorbentu. Při velikosti částic do 15 μm se délka kolony pohybuje od 10 do 30 cm, v případě zrn velikých od 20 do 70 μm pak tato hodnota stoupá do rozmezí 30 až 100 cm. Kolona je tedy tím kratší, čím je menší zrnění sorbentu.

Detektory

Na indikaci látek vycházejících z kolony se využívá detektorů, které pomocí vhodného snímače sledují některou z vlastností eluátu a signál po zesílení přivádí do zapisovače. Výsledkem je pak záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. Základně se detektory rozlišují na dva typy. U univerzálního je signál úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku obsahujícího mobilní fázi a daný vzorek. V případě selektivního je signál dán pouze koncentrací detekovaného vzorku. Přístroj by měl být správně vybaven oběma typy detektorů.

Na detektor jsou kladeny různé požadavky, které lze shrnout do následujících bodů:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- co nejmenší mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost vůči změnám průtoku mobilní fáze, tlaku a teploty
- umožnění provádění gradientové eluce

Detektory je možné rozdělit i podle okamžité odezvy, která buď na rychlosti přivodu mobilní fáze se separovanou látkou do detektoru závisí (koncentrační typ), nebo na ní stejně jako na jejích výkyvech závislá není (hmotnostní typ). Hlavní rozdělování detektorů probíhá na základě měřených veličin, jak je uvedeno v Tab. č. 1.

Měřená veličina	Detektor
absorpce záření	spektrofotometrický
index lomu	refraktometrický
fluorescence	fluorimetrický
elektrolytický proud	polarografický
elektrická vodivost	vodivostní
permitivita	kapacitní, permitivitní
elektrodotový potenciál	potenciometrický
ionizační proud	transportní s plamenoionizační detekcí
sorpční teplo (teplota)	mikroadsorpční
radioaktivita	radiometrický

Tab. č. 1 – Rozdělení detektorů podle měřených veličin^[1]

Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory pracují na základě proměření absorbance elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu procházejícího celou detektorem. Detektory této skupiny se vyznačují značnou citlivostí (10^{-9} - 10^{-8} g/ml) a je možné je využít i při gradientové eluci. Z podstaty jejich fungování vyplývá, že lze k měření využít celého spektra elektromagnetického záření od ultrafialové oblasti přes viditelnou až po infračervené záření. Poslední jmenované se využívá minimálně, neboť právě v této oblasti absorbuje většina rozpouštědel, což je nežádoucí. U barevných látek lze využít detektorů pro oblast viditelného světla, ovšem zcela největší zastoupení nejen v této skupině detektorů, ale mezi detektory obecně, mají ultrafialové detektory.

Nejjednoduššími a cenově nejvýhodnějšími UV detektory jsou ty s fixní vlnovou délkou, která bývá nejčastěji 254 nebo 280 nm. Při těchto vlnových délkách totiž absorbuje většina léčiv. U dalšího typu detektorů této skupiny je možno vlnovou délku libovolně podle potřeby měnit. Scanning UV detektor umožňuje snímat během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku analyzovaného léčiva. Diode array detektor je nejsložitějším, když umožňuje na základě řízení počítačem vytvářet trojrozměrnou projekci. Snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při více vlnových délkách a porovnává poměry absorbancí.

Refraktometrické detektory

Při použití těchto detektorů dochází k měření celkového indexu lomu analyzované látky i rozpouštědla tvořícího mobilní fázi. Jeho citlivost, která je obecně o dva až tři řády

nižší než u UV detektoru, koreluje s rozdílem mezi indexem lomu analyzované látky a indexem lomu rozpouštědla. Čím je tento rozdíl větší, tím je větší i citlivost. To je jedna z jeho nevýhod, mezi další pak patří nutnost udržovat měřící celou detektoru na konstantní teplotě a nemožnost provádět jím gradientovou eluci.

Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou použitelné pro látky schopné emitovat fluorescenční záření. Tyto látky procházejí celou detektoru, kde z intenzivního zdroje absorbují ultrafialové záření dodávající látce energii na následnou fluorescenci. Pokud analyzovaná látka není schopna vykazovat fluorescenční záření, je možné ji derivatizací s vhodnými činidly na fluoreskující deriváty převést. Oproti UV detektorům se fluorimetrické vyznačují menší univerzálností, ale větší selektivitou ($10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml). Oproti refraktometrickým pak možností provádět gradientovou eluci.

Elektrochemické detektory

Uplatnění tyto detektory nacházejí u těch analyzovaných látek, kde lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda – roztok. Roztok obsahující analyzované látky je veden do detektorové cely, která obsahuje dvě až tři elektrody. Tam dochází k proměřování elektrochemické veličiny, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzované látky. Tyto detektory jsou velmi citlivé ($10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml), ovšem většina z nich je nepoužitelná při gradientové eluci.

Detekce hmotnostní spektrometrií

Základem tohoto způsobu detekce je po výstupu eluátu z kolony odstranění mobilní fáze a převedení analyzované látky do plynného stavu. Molekuly látky jsou pak v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje a jako výstup je zaznamenáno jejich hmotnostní spektrum. Tento způsob detekce je vysoce citlivý a vysoce selektivní, ovšem zároveň finančně velmi náročný.

Transportní detektory

Detekce u tohoto typu detektorů spočívá v unášení eluátu vycházejícího z kolony do prostoru, kde je odpařeno rozpouštědlo, a teprve pak do vlastního detekčního systému, kterým může být např. plamenoionizační detektor. Toto zařízení je z důvodu odpařování rozpouštědla použitelné jen pro málo těkavé látky a dnes se již prakticky nepoužívá.

Mikroadsorpční detektory

Mikroadsorpční detektory využívají adsorpčního a desorpčního tepla, které zaznamenávají v závislosti na množství proteklého eluátu. Podobně jako refraktometrické jsou velmi citlivé na kolísání teplot a vyžadují tak neustále termostatování. To společně s problematickým vyhodnocováním chromatogramů obsahujících pro jednu složku dva píky vedlo k jejich stáhnutí z trhu.

Vyhodnocovací zařízení

U současných vysokoúčinných kapalinových chromatografů se jako vyhodnocovacího zařízení využívá výpočetní techniky. Ta kromě samotného vyhodnocování a vytváření záznamů o provedené analýze zajišťuje řízení celého zařízení.

2.3 Biologický materiál^[4]

2.3.1 Volba, odběr a základní zpracování biologického materiálu^[4]

Vyšetřovaný biologický materiál tvoří zpravidla velmi komplikovanou směs navzájem se ovlivňujících složek, která pozitivním nebo negativním způsobem působí na chování analytu a vlastní průběh reakce. Zejména se jedná o přítomnost bílkovin s jejich možností tvorby vazeb, stav komplexu udržujícího pH s jeho odchylkami a pufrovací kapacitou nebo parciální tlaky plynů v nativním systému a další. Nelze zanedbat ani přítomnost poměrně rozsáhlého množství organických a anorganických látek i celou řadu fyzikálně chemických vlastností celého prostředí.

Vedle dříve nejčastěji používaných materiálů krve a moči dnes nacházejí uplatnění rovněž sliny, likvor, mateřské mléko, slzy, žluč, pot a stolice. Technika zpracování těchto materiálů je snazší u těch, které jsou tekutější a složkově jednodušší. Na první tři místa se tak řadí moč, slzy a pot, zatímco krvi patří až předposlední místo před stolicí. Přímé zpracování materiálů je v případě krve a dalších složitějších systémů obtížné a málo spolehlivé.

Krev

Ač je krev značně složitou soustavou, je používána nejčastěji. Při zpracování je třeba požadovat izotonii ředícího roztoku, opatrné zacházení s teplotními výkyvy (zahřátí, zmrazení) a ubránění se mechanickému poškození (nešetrný odběr, úzké jehly, vysoký podtlak při odběru, tlak při míchání, centrifugace apod.). Pevné složky (krvinky) jsou zde součástí intracelulárního systému, který se nachází s okolním extracelulárním v rovnovážném stavu. Při změně vlastností okolí tak může dojít k difúzi složek intracelulárního obsahu krvinek do extracelulárního systému (např. různé ionty, plyny apod.). Porušením membrány v důsledku lýzy nebo ptýzy dochází k totálnímu vyplavení intracelulárního obsahu (hemoglobinu, iontů a některých specifických bílkovin a enzymů), čehož je třeba se vyvarovat. Vliv na výsledek analýzy má i rozdílnost hematokritu v různém místě odběru.

Krevní sérum

Krevní sérum se připravuje stáním krve, během kterého dojde k vysrážení a oddělení krevního koláče. Tento děj probíhá zhruba 1 – 2 hodiny, přičemž na délku trvání má vliv typ nádoby a hladkost jejího vnitřního povrchu. Přidání kuliček zvětšujících povrch, zdrsnění vnitřní plochy nádoby nebo záměna plastové nádoby za skleněnou vede k urychlení celého procesu srážení. Vysrážená krev se odstředí, následkem čehož dojde k zřetelnému oddělení séra od krevního koláče. Při odběru séra je třeba dávat pozor, aby nedošlo k jeho promísení se zbytky krevního koláče. V případě materiálů o malých objemech lze využít speciálního přípravku hydrofobní povahy (silikonový gel), který po přidání a odstředění vytvoří mezi sérem a krví pevný prstenec uzavírající krevní koláč.

Plazma

Po přidání antikoagulačních prostředků do vzorku krve nedojde k vysrážení fibrinogenu na fibrin a tím ani ke vzniku krevního koláče. Vznikne tedy vzorek schopný okamžitého dalšího zpracování. Plazma se snadněji dělí centrifugací a objemový zisk vzorku je oproti séru větší. Jako antikoagulačních přísad se nejčastěji používá heparinu, EDTA, citrátu sodného, oxalátu sodného nebo amonného a fluoridu sodného. Vždy se přidávají ve formě příslušně koncentrovaných roztoků tak, aby přidané množství činilo 0,1 – 1 ml, a následně jsou odpařeny do sucha.

Moč

Význam moči je v případě monitorování lékové terapie většinou minimální a používá se jen výjimečně třeba při zjišťování acetylační schopnosti jater nebo detekci metabolitů chlorochinu během antimalarické terapie. Mnohem větší uplatnění moč nachází v toxikologii, kde je hlavním biologickým materiálem. Většina endogenních látek přítomných v moči je dobře rozpustná ve vodě. Léky patří zpravidla k méně polárnějším látkám a mohou být snadno extrahovány organickými rozpouštědly. V případě léků vázaných v podobě polárních konjugátů je třeba tyto nejprve hydrolyzovat.

Velkou komplikací analýzy moči je její objem závislý na množství a způsobu konzumace různých nápojů a jiných diureticky působících přípravků. Z analýzy časově nekontrolovaného odebraného vzorku moči je tak obtížné provádět kvantitativní přepočty. Problémy způsobuje i velká variabilita pH závislá rovněž na příjmu potravy a léčiv. Vedle

antacid moč alkalizuje i její samotné stání. Různé pH ovlivňuje rychlost vylučování léčiv, kdy se v kyselé moči rychleji vylučují bazické látky.

Sliny

Hlavní přednost stanovování látek ze slin je jejich snadná dostupnost a jednoduchost získání materiálu. Do slin přechází většina léčiv a jejich hladina je tam v určité korelaci s plazmatickou koncentrací zejména jejich nevázaného podílu. Průnik do slin ovlivňuje hlavně rozpustnost a ionizovatelnost léčiva v krvi. V případě karbamazepinu se jako problém při stanovování hladiny léčiv ze slin ukázala retence léčiva v ústech. Až dvě hodiny po perorální aplikaci došlo k přiblížení koncentrace této látky ve slinách a v krvi. U lithia pak nebyla získána žádná korelace v základních parametrech biologické dostupnosti (poločas, clearance, distribuční objem). U steroidních hormonů, prokainamidu, digoxinu nebo teofylinu však využití slin na monitorování lékových hladin vyznělo příznivě.

2.3.2 Úprava biologického materiálu deproteinací^[4]

Biologický materiál tvoří, jak již bylo uvedeno výše (viz. Kap. 2.3.1), komplikovaná směs navzájem se ovlivňujících složek. Nejdůležitější roli zde hrají bílkoviny, které mohou při vlastní reakci interferovat. Zároveň je však třeba přihlédnout k faktu, že část daného analyzovaného léčiva je ve formě volné a část vázána na bílkoviny. Po deproteinaci však analyzujeme celkové množství léčiva získané z obou částí. Problémem může být i samo deproteinační činidlo, které může přímo či nepřímo interferovat při analytických reakcích.

Deproteinace musí splňovat tři základní podmínky, kterými jsou:

- kompletní odstranění proteinů včetně těch o malé molekulové hmotnosti
- samotný precipitát nesmí adsorbovat na svůj povrch sledované léčivo
- deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo, ovlivňovat další postupy (např. extrakci), interferovat při vlastní detekční reakci a ani jinak nesmí ovlivňovat analytickou výtěžnost

Precipitační deproteinace

Základem precipitační deproteinace je proces precipitace, během kterého dochází k vysrážení proteinové složky z biologického vzorku. K tomu se využívá kyselin jako

trichloroctové, metafosforečné koncentrované nebo chlorovodíkové koncentrované. Další možností je použití těžkých kovů (síran zinečnatý, hydroxid lithný, wolframian sodný, chlorid rtuťnatý nebo chlorid hlinitý) a organických rozpouštědel (ethanol koncentrovaný v dvojnásobném množství vůči vzorku, acetonitril v 1,5násobném poměru nebo methanol či aceton).

Enzymová deproteinace

V tomto typu dochází k deproteinaci pomocí proteolytických enzymů jako subtilisinu, trypsinu, papainu nebo ketodasy.

Ultrafiltrace

Narozdíl od předešlých dvou způsobů, kdy se po jejich provedení uvolňuje do supernatantu složka léčiva vázaná na bílkoviny, zůstává při ultrafiltraci vázaná složka léčiva společně s proteiny na stejné membráně a membránou prošlý ultrafiltrát obsahuje jen volnou složku. Vhodnou volbou velikosti pórů membrány můžeme roztřídit zachycené molekuly podle jejich hmotnosti.

2.4 Extrakční procesy při úpravě kapalných vzorků pro následnou analýzu^[5,6,7,8,9,10]

Úpravu kapalných vzorků před následnou analýzou lze provádět několika možnými způsoby, mezi které patří i rozpouštění, odpařování, destilace nebo lyofilizace. V případě provádění analýzy pomocí HPLC se však nejčastěji využívá metod extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME).

2.4.1 Extrakce kapalina-kapalina^[5]

Tento typ extrakce (LLE) se používá pro oddělování analytu rozdělováním složek analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jednu z fází zpravidla tvoří voda a druhou organické rozpouštědlo. Hydrofilnější látky přecházejí do vodní složky, zatímco hydrofobnější lze nalézt hlavně v organické části. Analyty extrahované do organické fáze lze jednoduše získat odpařením rozpouštědla. Látky z vodné fáze jsou většinou přímo nastříkány na kolonu HPLC s reverzní fází.

Během extrakčního procesu dochází v určitém momentu k nastolení rovnováhy, během které může výrazný podíl analyzované látky zůstat v obou fázích. To samozřejmě výrazně limituje použitelnost metody za daných podmínek. K zlepšení výtěžku extrakce a potlačení extrahování nečistot lze využít úpravy pH, iontových vazeb, tvorby komplexů a dalších.

Na použité organické rozpouštědlo jsou v LLE kladeny následující nároky:

- nízká rozpustnost ve vodě (< 10%)
- těkavost umožňující jednoduché odstranění a tím zvýšení koncentrace po extrakci
- kompatibilita s detekcí pomocí HPLC, která je následně využita k provedení analýzy (vyhnout se rozpouštědlům silně absorbujícím UV záření)
- polarita a schopnost tvorby vodíkových můstků zvyšující výtěžek analytu v organické fázi
- vysoká čistota kvůli minimalizaci kontaminace vzorku

Teorie procesu LLE vychází ze základního Nernstova rozdělovacího zákona, který charakterizuje rozdělení látky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze a je vyjádřen následující rovnicí: [5]

$$K_D = C_0/C_{aq}$$

(K_D – distribuční konstanta, C_0 – koncentrace látky v organické fázi, C_{aq} – koncentrace látky ve vodné fázi)

Daleko výstižnější je pak vyjádření podílu analytu extrahovaného do organické složky, který lze získat z následující rovnice: [5]

$$E = C_0V_0 / (C_0V_0 + C_{aq}V_{aq}) = K_DV / (1 + K_DV)$$

(E – podíl extrahovaného analytu, V_0 – objem organické fáze, V_{aq} – objem vodné fáze, V – fázový poměr V_0/V_{aq})

V případě biologického materiálu se LLE provádí v zábrusových zkumavkách za použití menších objemů vzorku. Pro jedнокrokové extrakce, jaké jsou typické pro biologický materiál, musí být distribuční konstanta K_D vysoká (tj. > 10), aby došlo ke kvantitativnímu rozdělení analytu (tj. $> 99\%$) do jedné z fází. Současně s tím musí fázový poměr V zůstat v prakticky použitelném rozmezí hodnot 0,1 – 10. Na zvýšení hodnoty distribuční konstanty lze využít několik následujících kroků:

- změna organického činidla
- u iontových a ionizovatelných analytů potlačit jejich ionizaci a zvýšit tak jejich rozpustnost v organické fázi nebo je vypárovat do organické fáze přidáním reagens o opačném náboji
- vysolování za užití neutrální soli (např. síranu sodného), čímž dojde ke snížení koncentrace analytu ve vodné fázi

2.4.2 Extrakce tuhou fází^[5]

Extrakce tuhou fází (SPE) je důležitou metodou při přípravě vzorků pro následnou analýzu pomocí různých chromatografických metod, mezi nimi samozřejmě i HPLC. Ve svém použití se podobá metodě LLE (viz. Kap. 2.4.1), která je však na rozdíl od ní vícečrokovým separačním procesem. Oproti LLE skýtá extrakce tuhou fází ještě několik dalších výhod:

- úplnější extrakce analytu
- účinnější oddělení rušivých látek od analytu
- nižší spotřeba organického rozpouštědla
- jednodušší získání celé frakce analytu
- snadnější manuální operace
- odstranění vedlejších částic
- jednodušší automatizace

Jelikož je SPE oproti LLE daleko efektivnější separační metodou, je možné tímto způsobem získat větší výtěžek analytu. Metoda extrakce tuhou fází zároveň umožňuje daleko kompletnější odstranění rušivých látek od frakce analytu. Nejpopulárnější je u SPE technika reverzní fáze, jenž umožňuje pro eluci použít pouze malé množství organického rozpouštědla udržujícího vysokou koncentraci analytu. Vzhledem k tomu, že u SPE nedochází k separaci mezi dvěma fázemi, které by mohly vzájemně ovlivňovat svůj objem, je daleko jednodušší získat celkovou frakci analytu a zároveň se vyhnout nepřesnostem způsobeným variabilním nebo nepřesně změřeným objemem obou fází. Látky tvořící u SPE tuhou fází zajišťují zachycení větších částic a brání jim tak dostat se do frakce analytu.

Metoda extrakce tuhou fází oproti LLE skýtá i několik nevýhod. Zaprvé je třeba zmínit variabilitu v reprodukovatelnosti výsledků, která je způsobena velkými rozdíly v tuhé fázi u SPE. Oproti tomu je u extrakce kapalina-kapalina užíváno čistých a přesně definovaných rozpouštědel. Nevýhodou oproti LLE je u extrakce tuhou fází rovněž větší plocha povrchu zařízení, v němž je extrakce prováděna, což zvyšuje větší pravděpodobnost nevratného navázání analytu a tím pádem snížení výtěžku.

Využití metody SPE v přípravě vzorků pro následnou analýzu spočívá v šesti základních výhodách:

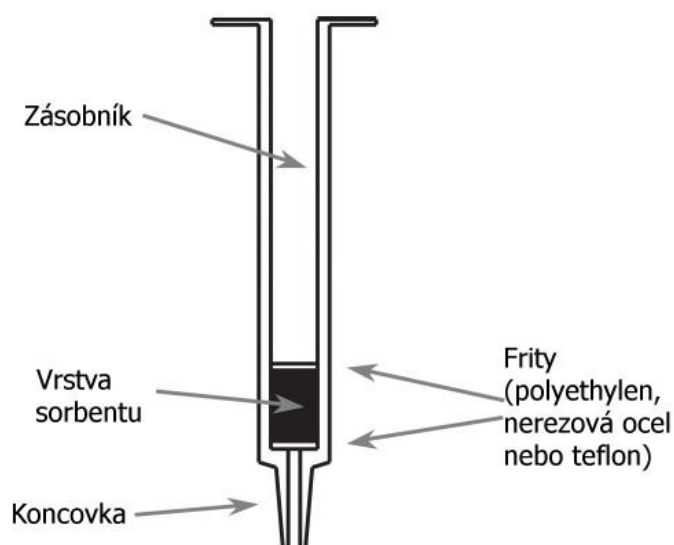
- oddělení látek biologické matrice a látek nebezpečných pro kolonu (tzv. zabíjáci kolon)
- koncentrace nebo obohacení stopy analytu
- odstranění solí
- výměna rozpouštědla
- in-situ derivatizace
- uchovávání a transport vzorku

Rušivé látky překrývající pík analytu mohou při analýze pomocí HPLC významně ovlivnit její výsledky. V některých případech mohou totiž takové látky obsažené ve vzorku

způsobit ve výsledném chromatogramu, že nebude možné je oddělit od píku pro analyzovanou látku. Výhoda SPE spočívá v tom, že může vliv látek biologického materiálu toto způsobujících zmírnit anebo jej úplně eliminovat. Nebezpečí pro HPLC analýzu skýtají i tzv. zabíjecí kolony, kterými jsou látky schopné zanést nebo deaktivovat HPLC kolonu. Většinou se jim lze ubránit použitím SPE s reverzní fází (dále jen RP-SPE), která je schopná je ze vzorku odstranit. Těmito látkami jsou například hydrofobní substance (tuky a oleje) nebo polymery.

Extrakci pevnou fází lze použít rovněž k zvýšení koncentrace analyzované látky. Pokud zvolíme jako pevnou fází látku, která umožní, aby byla pro analyt hodnota $k \gg 1$, pak je možné použít relativně velký objem vzorku, než dojde k nasycení pevné fáze. Na následnou eluci se použije silné rozpouštědlo ($k < 1$), které umožní eluci analytu do malého objemu a tím tak dojde k zvětšení jeho koncentrace a zvýšení senzitivity při detekci. RP-SPE se dá rovněž využít k odstranění solí ze vzorku, což se využívá zejména v případě HPLC s iontovou výměnou. Podmínky takového procesu, z hlediska hodnoty pH a procentuálního obsahu organického rozpouštědla, jsou vybrány tak, aby došlo k zachycení analytu a anorganické soli bylo možno z povrchu tuhé fáze vymýt vodou. Následná eluce analytu organickým rozpouštědlem tak již probíhá bez solí.

Na provádění extrakce tuhými fázemi je využíváno několik zařízení, mezi které patří kolonka, disk nebo mikrovlákno. V případě posledního jmenovaného se však už jedná o zařízení pro odlišnou metodu mikroextrakce tuhými fázemi (viz. Kap. 2.4.3). Z prvních dvou má hlavní využití kolonka (viz. Obr. č. 3). Její obal je tvořen vysoce čistým pro medicínské využití upraveným polypropylenem, u kterého je zaručeno, že během extrakce nebude uvolňovat látky (např. plastifikátory nebo stabilizátory) a kontaminovat jimi vzorek. V případech, kdy je prováděna extrakce vzorku s opravdu minimálním obsahem analyzované látky, lze využít kolonky ze skla nebo čistého polytetrafluorethylenu (PTFE). Kolonka z polypropyleny by zde i přes svou vysokou čistotu mohla způsobit nežádoucí navýšení množství extrahovatelných nečistot. Výtok z vnitřního válečku je opatřen špičkou umožňující napojení jehly, která zajistí přímý odtok eluátu do vialky. Frita udržující ložisko se sorbentem v kolonce je vyrobena z PTFE, polypropyleny nebo nerezové oceli s porositou od 10 do 20 μm zajišťující malý odpor toku eluátu.



Obr. č. 3 – Kolonka používaná pro provádění SPE^[13]

Mikrokolonky pro SPE jsou vyráběny v různých tvarech a velikostech odpovídajících jejich použití, hlavně se jedná o jejich pasování do automatizovaných zařízení. Z objemového hlediska je jejich rozmezí od 0,5 do 10 ml. Pro extrémní případy tzv. „špinavých“ vzorků, které by zahltily klasické kolonky, jsou vyráběny větší o objemu 60 ml. Tato velká zařízení váží 10 g, zatímco u klasických kolonek se hmotnost pohybuje mezi 35 mg až 2 g. Ve většině případů je žádoucí, aby byl daný analyt eluován do co nejmenšího objemu, čemuž odpovídá i výběr kolonek, které by měly být pokud možno co nejmenší. Zároveň však je třeba dbát na to, aby nebyla zvolena příliš malá kolonka, u které by došlo k jejímu přesycení.

Druhou možností, jak provést extrakci tuhou fází, je využití disku, který připomíná membránové filtry a právě jejich výhody vhodně kombinuje s výhodami SPE. Samotný disk je 1 mm tenký s průměrem od 4 do 96 mm a je umístěn v držáku tvořeném odnímatelnou horní a dolní polovinou. Materiály tvořícími disk jsou síť pružného nebo pěnového PTFE doplněného silikátovým nebo pryskyřičným obalem, pevné skleněné vlákno s vloženým obalovým materiálem, PVC s naimpregnovaným obalem nebo derivatizované membrány.

Samotné provedení extrakce vzorku tuhou fází sestává z několika základních kroků:

- aktivace sorbentu promýváním rozpouštědlem
- nanesení vzorku
- promývání tuhé fáze (odstranění nežádoucích látek)

- získání požadovaného analytu

Aktivace sorbentu je důležitou operací, která se provádí ještě před nanesením samotného vzorku. Jejím účelem je zaprvé odstranit nečistoty, které se dostaly z laboratorního ovzduší do kontaktu se sorbentem a kterých je před samotnou extrakcí potřeba se zbavit. Druhým neméně podstatným účelem je solvatace sorbentu. Vyschlý sorbent v případě RP-SPE často způsobuje sníženou retenci vzorku. Aktivací sorbentu se rovněž zabrání tomu, aby při jednotlivých extrakcích kolísala jeho suchost, což by mohlo vést k rozdílným výtěžkům analytu. K promývání se využívá acetonitrilu nebo methanolu, který je v případě RP-SPE a u polárně vázaných fází nejčastěji používaným. U silikátových gelů ovšem způsobuje jejich deaktivaci, tudíž se zde užívá středně polárních rozpouštědel jako např. methylen-chloridu. Tam, kde se do SPE aplikují vodné vzorky, připadá v úvahu rovněž promytí vodou.

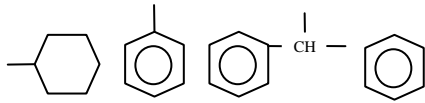
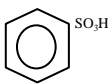
Po provedení aktivace sorbentu se přechází ke druhému kroku, kterým je nanesení samotného vzorku. To se provede pomocí pipety, injekční stříkačky nebo v případě vzorků o větším objemu pumpou. Vzorek je nanášen buď ve své původní podobě, nebo je možno jeho rozpouštědlo zaměnit za jiné. Vždy jím však musí být slabé rozpouštědlo, které umožní silné zadržení analytu na tuhé fázi. Pokud je analyt rozpuštěn ve vodě nebo pufru s obsahem organické složky (methanol nebo acetonitril) do 10 %, pak se provádí RP-SPE. Uhlovodíková nebo jiná nepolární rozpouštědla jsou typická pro tzv. SPE s normální fází. Iontové a ionizovatelné analyty jsou většinou rozpuštěny ve vodě nebo pufru a extrahují se užitím RP-SPE nebo iontovou výměnou.

Třetí krok procesu extrakce tuhou fází se provádí za účelem odstranění co největšího množství rušivých látek, které by se mohly ze sorbentu při eluci uvolňovat společně s analytem do rozpouštědla. V ideálním případě by mělo toto promývání probíhat až do doby, než se již začne ze sorbentu uvolňovat i analyt. Ten však musí po tomto kroku zůstat stále sorbovaný a proto je zapotřebí vedle optimální délky promývání zvolit i vhodnou látku. Tou je z pohledu analytu středně silné rozpouštědlo (tj. $3 < k < 10$). V případě RP-SPE se využívá vody nebo pufru s malým obsahem organické složky, která zajistí odstranění hydrofobnějších látek a zároveň nevymyje sledovaný analyt.

Závěrečným krokem celého procesu SPE je eluce analytu vhodným rozpouštědlem. K tomu se dá užít silného rozpouštědla ($k = 0$), kterého stačí pro eluci malé množství. Tato alternativa je vhodná tam, kde je zapotřebí dosáhnout určité větší detekční citlivosti při následné analýze pomocí HPLC. Užitím slabšího rozpouštědla ($k = 1$) je možné se vyhnout eluci silně vázaných rušivých látek, které nebylo možno vymýt během předchozího kroku.

Objem eluátu je u slabšího rozpouštědla ovšem větší a z toho důvodu je potřeba ještě před následným nástříkem do HPLC provést jeden krok. Tím je odpaření do sucha a následné rozpuštění analytu ve vhodném jiném rozpouštědle, ideálně ve složení užití mobilní fáze.

Ideálním rozpouštědlem je vzhledem k navazující analýze pomocí HPLC látka nebo směs látek, jaké jsou slabou mobilní fází. V takovém případě mohou být přímo nastříknuty větší objemy frakce analytu a dosáhne se větší detekční citlivosti. Docílit toho lze dvěma způsoby. 1.) Pokud je analytem kyselina nebo zásada, pak se vhodnou úpravou pH potlačí ionizace a maximalizuje se retence analytu během kroků č. 2 a 3 RP-SPE. Po získání analytu během závěrečného kroku extrakce je možno pH upravit znovu s ohledem na následnou HPLC analýzu. 2.) Za využití slabého sorbentu je umožněno, aby šlo na eluci analytu užit slabšího rozpouštědla. Pro HPLC analýzu je pak vhodné užit „silné“ kolony (např. C₁₈).

Typ SPE	Tuhá fáze
Normální fáze	-SiOH, AlOH, Mg ₂ SiO ₃ , -CN, -NH ₂ , -CH(OH)-CH(OH)-
Reverzní fáze	(-CH ₂ -) ₁₇ CH ₃ , (-CH ₂ -) ₇ CH ₃ , (-CH ₂ -) ₃ CH ₃ , -C ₂ H ₅ , -CH ₃ 
Aniontová výměna	(-CH ₂ -) ₃ NH ₂ , (-CH ₂ -) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ , (-CH ₂ -) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃
Kationtová výměna	(-CH ₂ -) ₃ COOH, (-CH ₂ -) ₃ SO ₃ H, 

Tab. č. 2 – Látky používané u SPE jako tuhé fáze^[5]

2.4.3 Mikroextrakce tuhými fázemi^[6,7,8,9,10]

Mikroextrakce tuhými fázemi (SPME) byla vyvinuta s cílem vytvoření rychlé metody přípravy kapalných a plynných vzorků pro následnou analýzu v nich obsažené cílové látky. Zjednodušeně lze tuto metodu popsat jako jednoduchou a účinnou sorpční a desorpční techniku zakoncentrování analytu, která se obejde bez užití rozpouštědel nebo

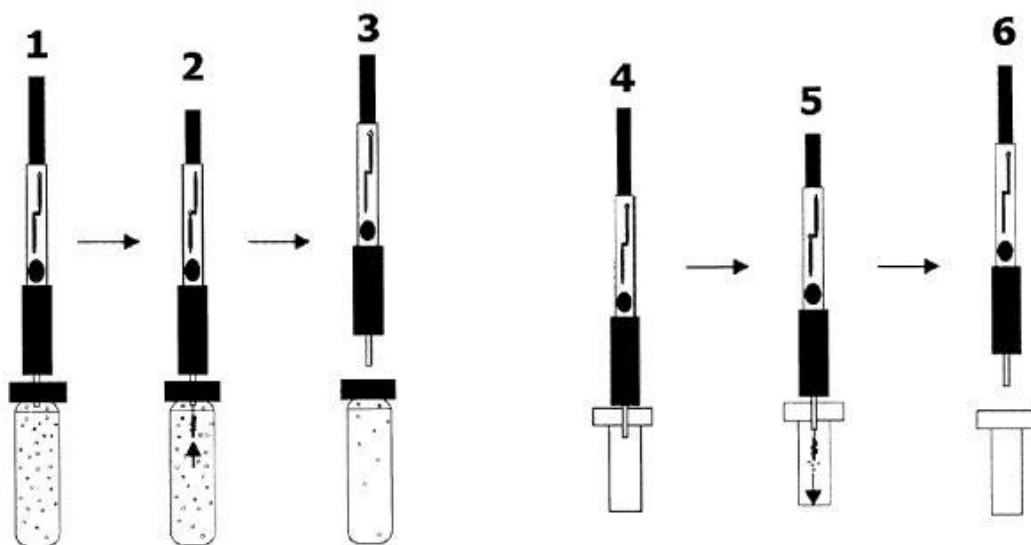
komplikovaných aparatur. Její využití je možné jak v terénu, tak v laboratorních podmínkách, a to ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií.

Základním principem metody je vystavení malého množství extrakční fáze kapalnému nebo plynnému vzorku. Tím dochází k nasorbování sledovaného analytu na povrch této fáze. Tento děj probíhá do ustanovení rovnováhy koncentrace analytu v matrici vzorku a na stacionární fázi. Po vytvoření rovnovážného stavu již k další akumulaci analytu na povrch sorbentu nedochází. Hlavním cílem SPME tedy není kompletní extrakce celého množství analytu, hlavní pozornost je upřena na pohodlnou a rychlou proveditelnost.

Porovnání SPME s jinými extrakčními metodami^[6,8]

V porovnání s tradičními technikami je možné užitím SPME dosáhnout obdobně přesných výsledků. Při porovnání s technikami jako LLE a SPE, u nichž dochází k úplnému oddělení celého množství analyzované látky, docházíme k základnímu rozdílu. V případě mikroextrakce tuhou fází je extrahováno jen takové množství analytu, jaké odpovídá jeho volné koncentraci ve vzorku. To skýtá výhodu v možnosti zjišťování biologicky dostupného množství analyzované látky ve vzorku. Touto metodou rovněž můžeme analyzovat vazebné parametry dané látky ve vzorku. Na druhou stranu je z tohoto důvodu zapotřebí kalibrace, a to užitím vnějšího standardu v ekvivalentní matrici, vnitřního standardu nebo standardu sloučeniny svými vlastnostmi velmi blízké stanovované látce. Těmito způsoby se pak lze dobrat k přesnému množství obsaženého analytu ve vzorku. Oproti výše zmíněným metodám tak je nutné u SPME provést větší množství optimalizačních procedur.

SPME je velmi často považována za jinou formu SPE. Tyto dvě metody si však jsou v některých ohledech značně odlišné. SPE je procesem o třech základních krocích (viz. Kap. 2.4.2). V prvním dochází při prolévání vzorku přes povrch sorbentu k nasorbování celého množství analytu. Ve druhém se následně proléváním sorbentu vhodným rozpouštědlem zbavujeme nečistot a jiných rušivých látek. A konečně v posledním kroku je za užití vhodného rozpouštědla extrahován kýžený analyt. Naproti tomu SPME probíhá ve dvou krocích a oproti SPE zde dochází k selektivní sorpci látky z matrice na povrch sorbentu do ustanovení rovnovážného stavu. V prvním kroku je sorbent vystaven vzorku, čímž dochází k selektivní sorpci analytů s vyšší afinitou na jeho povrch. Následně je celý tento obsah desorbován do vhodného rozpouštědla, zpravidla však za použití automatizovaného zařízení přímo do mobilní fáze, a mezi tyto dva kroky (sorpce a desorpce) není normálně vložena žádná promývací fáze. (viz. Obr. č. 4)



Extrakce (fáze 1 - 3): 1 - propíchnutí septa vialky se vzorkem, 2 - vystavení vlákna vzorku (probíhá sorpce analytu), 3 - vytáhnutí vlákna z vialky
 Resorpce (fáze 4 - 6): 4 - Propíchnutí septa vialky s insertem s malým množstvím rozpouštědla nebo přímé připojení na chromatograf, 5 - samotná desorpce analytu, 6 - vytáhnutí vlákna

Obr. č. 4 – Schematické znázornění jednotlivých kroků při provádění SPME^[8]

Pro jakoukoliv přípravu vzorků je zapotřebí určitý stupeň selektivity, jelikož není nikterak praktické přenášet všechny látky obsažené ve vzorku do výsledné analýzy podrobované směsi. Samozřejmě musí být vyloučeny látky inkompatibilní s analýzou provádějícím zařízením, kterými se myslí hlavně složky matrice vzorku. Zároveň je vhodné se zbavit nechtěných látek, které by mohly zkreslit výsledky analýzy. SPME při výběru vhodného vlákna poskytuje selektivní extrakci a výše zmíněným problémům se tak dá ubránit.

Zatímco v SPME hraje podstatnou roli při výběru sorbentu právě jeho selektivita pro určité skupiny analytů, v případě srovnávané metody SPE je daleko důležitější dostatečná kapacita povrchu sorbentu, byť i neselektivně pro širší skupinu látek. Při nedostatečné kapacitě pro dané množství analytu by mohlo dojít k prolomení sorbentu a tím ke znehodnocení celého procesu. U SPME probíhající do rovnovážného stavu však k ničemu takovému dojít nemůže a hlavním cílem je tedy zvolit jako sorbent látku s vhodnou selektivitou.

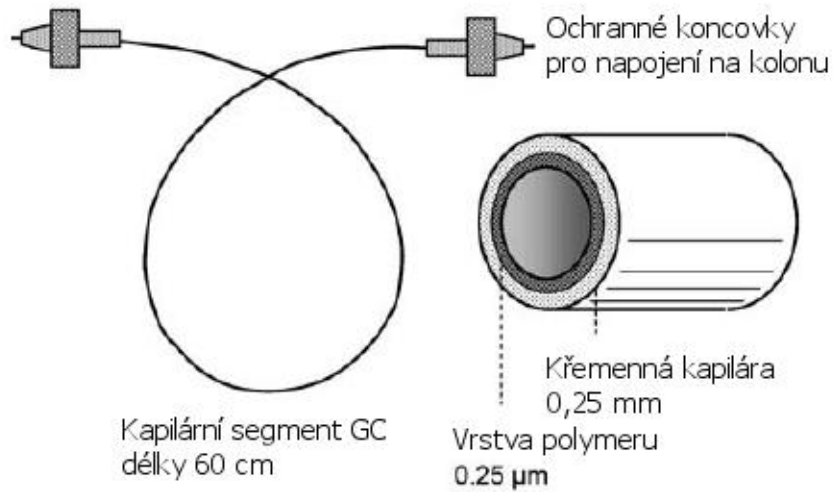
Obě výše porovnávané metody od sebe odděluje i další důležitá vlastnost použitého sorbentu. V případě SPE je jeho objem natolik velký, že mu uděluje potenciál udržovat nesorbované látky v tzv. prázdném objemu. Vzhledem k tomu, že je velmi náročné provést

takový promývací proces, kterým by se odstranily nechtěné látky zcela bez ovlivnění cílového analytu, zůstává zde možnost jejich setrvání v sorbované nebo nesorbované formě v prostoru extrakční kolonky. Metoda SPME tím, která jsou navrženy součásti její aparatury, zajišťuje, že se zpravidla v době desorpce na vlákně žádné nechtěné látky nenacházejí. Selektivitu procesu dále v případě SPME zvyšuje možnost užití tzv. headspace SPME. Ta probíhá u těkavých látek, které jsou na povrch sorbentu sorbovány jeho vystavením plynnému podílu nad hladinou kapalného vzorku. Tímto způsobem je tak možné oddělit těkavé látky od netěkavých. Pro prevenci sorpce nechtěných makromolekul se dá využít materiálů s omezeným přístupem (RAM – restricted access materials), kterými jsou porózní látky překrývající samotný sorbent.

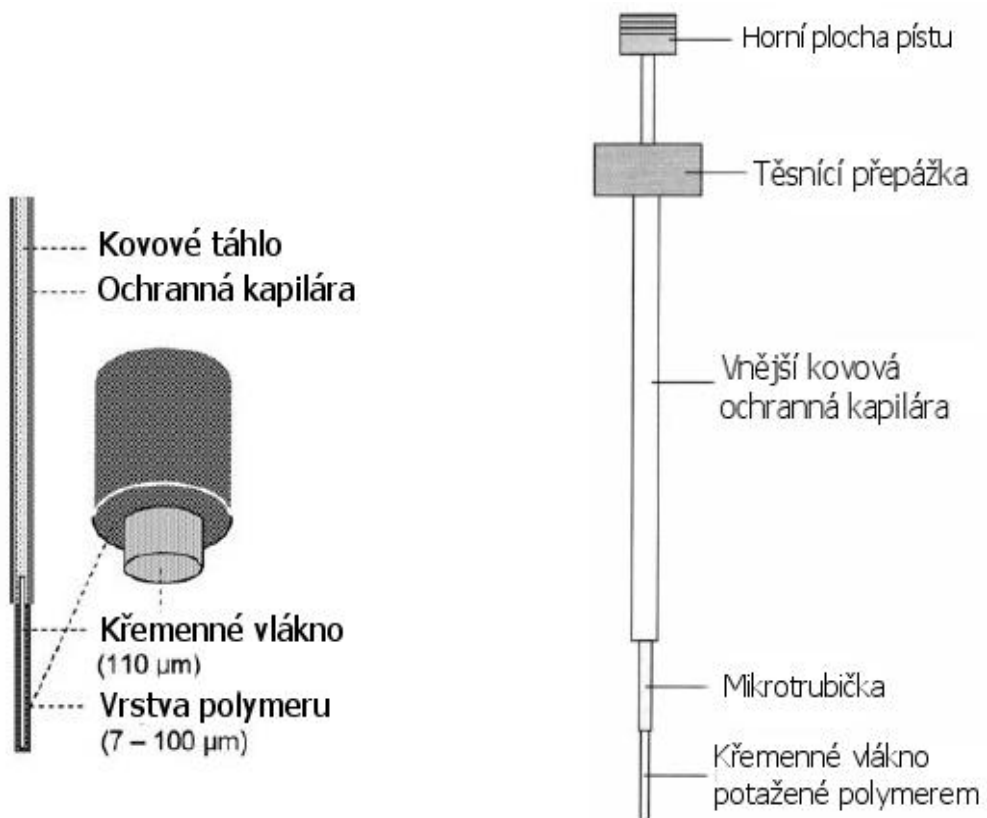
Vybavení pro provádění SPME^[6,7,8,9]

Mikroextrakci tuhou fází lze provádět užitím dvou základních zařízení lišících se od sebe prostorovým uspořádáním sorbentu. Zaprvé se jedná o tzv. in-tube SPME, u níž je tuhá fáze nanášena na vnitřní plochu kapiláry. Takovéto uspořádání vzdáleně připomíná techniku SPE (viz. Obr. č. 5). Druhou a nejvíce používanou aparaturou pro SPME je ta, kde je tuhá fáze umístěna na vnějším povrchu vlákna (viz. Obr. č. 6).

Tuhou fází je zpravidla polymerní látka, jejíž volba souvisí s typem extrahovaného analytu a dalších specifik dané prováděné extrakce. Tento polymer je vždy v tenké vrstvě nanášen na vlákně z taveného křemene. Kvůli zajištění ochrany musí být toto křehké vlákno vhodně upraveno pro činnosti jako je manipulace a penetrace septa vialky se vzorkem, popř. chromatografického injektoru. Ochranu zde tvoří kapilára z nerezové oceli, do níž se při výše zmíněných manipulacích vlákno zasouvá. Během provádění samotné extrakce musí být samozřejmě vysunuto, aby byl umožněn jeho kontakt se vzorkem. Celkové rozvržení zařízení umožňuje nasazení vlákna na nastřikovací zařízení chromatogramu.



Obr. č. 5 – Schematické znázornění zařízení pro in-tube SPME^[7]



Obr. č. 6 – Schematické znázornění vlákna pro SPME^[6,7]

Vrstva polymeru může být na vlákne nanesena v různých tloušťkách od 7 až do 100 μm . Tím je následně určen nejen rozsah selektivity daného vlákna, ovšem rovněž i čas nutný na dosažení rovnovážného stavu při sorpci. Tlustější vrstva vede k prodloužení extrakčního času. Polymer se může na svém podkladu nacházet ve dvou uspořádáních, a sice jako vázaný nebo nevázaný. Z pohledu skupenství polymery použité u SPME bývají ve formě kvazi-kapalné (polydimethylsiloxanové - PDMS, polyakrylátové – PA a Carbowax – CW vlákno) nebo porézních pevných částic zakotvených v polydimethylsiloxanové nebo Carbowax vrstvě (polydivinylbenzenové, Carboxen a TPR vlákna). Základním pravidlem pro výběr vhodného vlákna je rozhodovat se podle polarit, molekulární velikosti a těkavosti analytu (viz. Tab. č. 3).

Typ vlákna	Tloušťka polymerní vrstvy (μm)	Analyty
Polydimethylsiloxan (PDMS)	7, 30, 100	Nepolární
Polyakrylát (PA)	85	Polární (zejména fenoly)
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)	65	Polární (zejména aminy)
Carbowax/divinylbenzen (CW/DVB)	65	Polární (zejména alkoholy)
Carboxen/polydimethylsiloxan (CAR/PDMS)	75	Těkavé / nízkomolární
Carbowax/templated resin (CW/TPR)	50	Pro aplikaci u HPLC
Divinylbenzen/Carboxen na polydimethylsiloxanovém podkladu (DVB/CAR/PDMS)	50/30	Širší rozmezí analytů

Tab. č. 3 – Seznam používaných vláken^[7,8]

Teorie SPME^[10]

Metoda mikroextrakce tuhou fází může být použita pro kapalné i plynné vzorky a v obou případech je založena na stejném principu. A tím je rozdělování částic analytu mezi matici vzorku a pevnou fází. Rozdělovací koeficient (K_{fs}) je vyjádřen jako poměr koncentrace ve fázi ke koncentraci v matici:^[10]

$$K_{fs} = c_f / c_s$$

(c_f – koncentrace analytu ve stacionární fázi, c_s – koncentrace analytu v matici)

Množství analytu navázaného na pevnou fázi (n_f) pak lze vyjádřit následujícím vztahem:^[10]

$$n_f = K_{fs} V_f c$$

(V_f – objem pevné fáze)

Této závislosti lze však využít jen v případě, kdy je objem vzorku prakticky nekonečný. Pro reálné případy se tak užívá upraveného vztahu:^[10]

$$n_f = K_{fs} V_f V_s c_s / (K_{fs} V_f + V_s)$$

U extrakce z kapalných vzorků se musí vycházet ze tří důležitých předpokladů. Zaprvé k přechodu částic ze vzorku na vlákno dochází výhradně difúzí. Na tento přechod není potřeba dodávat žádnou další energii a za třetí koncentrace analytu ve vzorku nemá vůbec žádný vliv na fyzikální stav pevné fáze. Mezi šířkou stacionární fáze a dobou, než dojde k ustanovení rovnováhy, platí zákonitost, že větší šířka vede k prodloužení tohoto časového úseku. Zároveň zde hraje roli míra rovnoměrného rozmístění částic analytu ve vzorku. Vzhledem k tomu, že prakticky nejde dosáhnout zcela homogenní směsi, vždy je třeba počítat s difúzí tenkou statickou vrstvou vodného roztoku kolem vlákna, což oproti teoretickým předpokladům prodlužuje dobu ustanovení rovnováhy.

U analytu s nízkou hodnotou K_{fs} vyvstává problém s příliš dlouhou dobou nutnou k ustanovení rovnováhy při extrakci. Tomu se lze ubránit vystavením vlákna vzorku na dobu kratší, než je potřebná k nastolení rovnovážného stavu. Mezi množstvím sorbovaného analytu a jeho celkovou koncentrací ve vzorku i v tomto případě platí lineární závislost. K tomuto způsobu však lze přistoupit jen v případě, že detekční limit látky pro následnou analýzu není příliš nízký.

Ačkoliv je SPME technikou, při níž dochází k ustavení rovnovážného stavu, za určitých podmínek ji lze použít rovněž pro kvantitativní extrakci. Taková možnost nastává, pokud má rozdělovací koeficient daného analytu vysokou hodnotu. Druhý způsob dosažení kompletní extrakce je možné provést společně s navázáním analýzy plynovou chromatografií. Proces sorpce analytu na vlákno a následné desorpce v injektoru plynového chromatografu je prováděn několikrát za sebou, přičemž je kolona chromatografu udržována při teplotě pod bodem varu daného analytu. Ten se tak udržuje v hlavě kolony a není tedy hned vymýván.

Pro charakterizaci tohoto procesu se využívá následujících rovnic: ^[10]

$$n'_f = K_{fs} V_f c_s^\circ / (K_{fs} V_f / V_s + 1)$$

(i – počet provedených extrakcí)

$$J = \log (1 / F) / \log (K_{fs} V_f / V_s + 1)$$

(j – počet provedených extrakcí, F – celkový zisk analytu)

Kromě vzorků v kapalném skupenství lze metody SPME rovněž použít u plynných látek a k extrakci z plynného skupenství dochází také u headspace SPME pro těkavé látky. V takovém případě se nejprve nechá ustanovit rovnováha mezi kapalnou a plynnou složkou, na což pak navazuje krok vystavení vlákna plynné části vialky. Dochází zde tak ke dvěma rovnovážným stavům, které jsou vyjádřeny samostatnými rozdělovacími koeficienty. To je následně zapotřebí přenést do úpravy rovnice pro toto provedení SPME: ^[10]

$$n_f = c_s^\circ V_f V_s K_{fs} K_1 / (K_{fs} K_1 V_f + K_1 V_g + V_s)$$

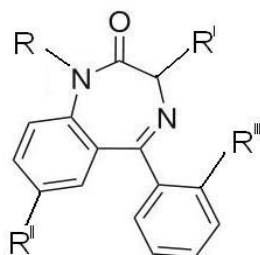
(K_1 – rozdělovací koeficient mezi kapalnou a plynnou fází, V_g – objem plynné fáze)

Vzhledem k faktu, že je hodnota difúzního koeficientu pro přechod analytu z plynného prostředí na vlákno větší než u prostředí kapalného, probíhá headspace technika rychleji a je tak v případech těkavých látek upřednostňována. Zároveň se tím lze účinně zbavit případných netěkavých rušivých látek, které by se na vlákno nanuly při jeho ponoření do kapalného vzorku.

2.5 Benzodiazepiny^[11]

Benzodiazepiny jsou početnou skupinou látek čítající více než 3000 členů, přičemž takřka 50 z nich našlo uplatnění v klinické praxi. Zde mají tyto látky užití v různých indikacích pro svůj anxiolytický, sedativní, hypnotický, myorelaxační, amnestický a antikonvulzivní účinek. Rozsah jednotlivých účinků je vyjádřen u každé látky rozdílně, například oxazepam patří do skupiny benzodiazepinů převážně anxiolyticky působících.

Z chemického hlediska lze tyto látky charakterizovat podle jednotného základního vzorce tvořeného sedmičlenným diazepinovým kruhem spojeným s benzenovým jádrem. (viz. Obr. č. 7). Celé toto uskupení se pak u jednotlivých zástupců liší v několika polohách navázanými rozdílnými substituenty.



Obr. č. 7 – Benzodiazepinové jádro

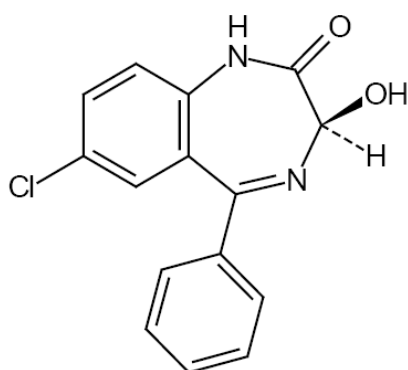
Mechanismus účinku benzodiazepinů je založen na jejich selektivním obsazování specifického vazebného místa na receptorovém komplexu GABA_A. Obsazením těchto míst dojde alostericky ke zvýšení afinity na jiné části receptorového komplexu umístěného vazebného místa pro γ -aminomáselnou kyselinu, která představuje hlavní inhibiční neurotransmitter v centrálním nervovém systému. Následně tak dochází ke zvýšení frekvence otevírání chloridového kanálu vedoucí ke zvýšenému vstupu chloridových iontů do buňky. To má za následek prohloubení postsynaptického inhibičního potenciálu.

Z farmakokinetického hlediska lze benzodiazepiny charakterizovat jako látky s výbornou biologickou dostupností po perorálním podání blízcí se ku 100 procentům. Jejich účinek nastupuje v průběhu hodiny, delší je pak u oxazepamu, lorazepamu a temazepamu. Vazba na plasmatické bílkoviny se pohybuje v rozmezí 60 – 95 %. Jejich vysoká lipofilita jim pak zajišťuje snadnou prostupnost hematoencefalickou bariérou a kumulaci v tukové tkáni.

Biotransformace benzodiazepinů probíhá mikrosomálním systémem cytochromu P450, následně pak dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou. Ledvinami jsou vyloučeny ve formě ve vodě rozpustných sloučenin.

Při podávání benzodiazepinů je možno se setkat s několika různými nežádoucími účinky. V běžném dávkovacím rozmezí se jedná zejména o zmatenost, poruchy koordinace, anterográdní amnézii a ospalost. Při předávkování jde hlavně o prodloužení a prohloubení spánku, přičemž ale nejsou závažně ovlivněny respirační a kardiovaskulární funkce. U respirace může docházet k útlumu až při kombinaci s jinými látkami s tlumivým účinkem na CNS, a to hlavně při konzumaci alkoholu. S dlouhodobějším užíváním benzodiazepinů dochází k projevům tolerance, tedy postupnému slábnutí požadovaného účinku při nezměněném dávkování. Dlouhodobější užívání s sebou pak nese riziko vzniku závislosti, která se při vysazení projeví zvýšenou úzkostí a nespavostí, přidružují se také tělesné projevy jako třes, tachykardie, psychomotorický neklid nebo bolesti hlavy. U dětí a starších pacientů může při léčbě těmito látkami dojít k paradoxní excitaci, stavům zmatenosti a zvýšené agresivity. V akutních případech předávkování je možno využít kompetitivního antagonisty na receptorech pro benzodiazepiny, flumazenilu. Jeho účinek nastupuje po parenterálním podání do několika málo minut.

2.5.1 Oxazepam^[12]



$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ - (3RS)-7-chlor-5-fenyl-3-hydroxy-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
 M_r 286,72 CAS 604-75-1

Vlastnosti – bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu

2.6 Rešerše

Stanovení vybraných benzodiazepinů užitím In-Tube SPME napojené na LC-ESI-MS^[14]

Studie se zabývala stanovením diazepam, nordiazepam, temazepam, oxazepam, 7-aminoflunitrazepam, N-desmethylflunitrazepam a clonazepam v pufovacím roztoku a vzorkách s obsahem moči a séra.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: reverzní, methanol:50mM octanu amonného ve vodě (60:40); průtok 0,3 ml/min; kolona Supelco C18 (5,0 cm x 2,1 mm i.d., 3 mm).

Stanovení benzodiazepinů z lidské plasmy užitím LLE a SPE s napojením na HPLC^[15]

Studie se zabývala užitím extrakčních metod kapalina-kapalina (LLE) a tuhou fází (SPE) při extrakci sedmi benzodiazepinů (flunitrazepam, clonazepam, oxazepam, lorazepam, chlordiazepoxid, nordiazepam a diazepam) ze vzorku lidské plasmy. Následná analýza extrahovaných látek byla prováděna pomocí HPLC při UV detekci.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze – pufr 5 mmol/l KH_2PO_4 pH = 6,0:methanol:diethylether (55:40:5); průtok 0,8 ml/min; kolona Supelcosil LC-18 DB (250 x 4,6 mm i.d., 5 μm); předkolona 5 μm Supelguard LC-18-DB (40 x 4 mm i.d., 5 μm); detekce UV při 245 nm.

Stanovení lorazepamu z dětské plasmy užitím LLE a HPLC^[16]

Studie se zabývala analýzou obsahu lorazepamu v dětské plasmě extrakcí kapalina-kapalina a následným provedením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. Tato metoda byla pak aplikována na farmakokinetickou studii prováděnou u dětí s těžkou malárií a křečovými stavy.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze – pufr 10mM KH_2PO_4 pH = 2,4:acetonitril (65:35); průtok 2,5 ml/min; kolona Synergi Max RP (150 x 4,6 mm i.d., 4 μm); ochranná kolona LiChrospher 100 RP-18e (10 x 4,6 mm, 5 μm); detekce UV při 220 nm.

Analýza sedmi benzodiazepinů obsažených jako příměsi v doplňcích stravy užitím HPLC^[17]

Studie se zabývala stanovením sedmi benzodiazepinů (oxazolam, nitrazepam, oxazepam, tofisopam, triazolam, clotiazepam a diazepam) jako metody k analýze doplňků stravy.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze – 5 mM heptansulfonát sodný rozpuštěný ve směsi voda:acetonitril (13:7), pH mobilní fáze upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 2,4; průtok 1,0 ml/min; kolona Wakosil 5C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm).

Analýza oxazepamu z moči užitím SPE a HPLC s derivatizací po průchodu kolonou a fluorescenční detekci^[18]

Studie se zabývala stanovením oxazepamu ve vzorku lidské moči, z níž byl extrahován pomocí extrakce tuhou fází (SPE) a následně analyzován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s derivatizací kyselinou octovou po průchodu kolonou a fluorescenční detekcí.

Chromatografické podmínky: mobilní fáze – methanol:voda (60:40); průtok 0,5 ml/min; kolona Ultrabase C₁₈ (35 x 4,6 mm, 5 µm); derivatizace kyselinou octovou o průtoku 1,1 ml/min za vzniku směsi kyselina:methanol:voda (22:6:4).

Stanovení benzodiazepinů z lidské moči užitím SPME spojené s SM-HPLC^[19]

Studie se zabývala analyzováním benzodiazepinů (nitrazepam, flunitrazepam, fludiazepam, diazepam, clotiazepam, medazepam) ze vzorků lidské moči za užití techniky SPME a SM-HPLC.

Extrakční podmínky: použitá vlákna – PA (85 µm vrstva polyakrylátu) a PDMS (100 µm vrstva polydimethylsiloxanu) od firmy Supelco, po vzájemném porovnání vybráno jako vhodnější vlákno PA; teplota během extrakce udržována na 60 °C, desorpční čas 30 min., matrice vzorku bez úpravy pH, desorpční roztok – 30 µl acetonitrilu

Chromatografické podmínky: mobilní fáze - acetonitril:voda (35:65); průtok 100 µl/min; teplota 35 °C; kolona Superiorex ODS (25 cm x 1,5 mm i.d.).

Stanovení delorazepamu z moči s využitím SPME a HPLC^[20]

Studie se zabývala stanovováním delorazepamu ze vzorku lidské moči užitím techniky SPME a HPLC. Během toho byla porovnávána dvě SPME vlákna, a to polydimethylsiloxan/divinylbenzenové a Carbowax/templated resin.

Extrakční podmínky: použitá vlákna – PDMS/DVB (60 µm vrstva polydimethylsiloxan/divinylbenzenu) a Carbowax/TPR-100 (50 µm vrstva carbowax/templated resin), během porovnávání vybráno jako vhodnější PDMS/DVB; sorpce prováděna po dobu 30 min. za stálého míchání, desorpce prováděna do acetonitrilu a směsi acetonitril:voda (40:60, 80:20, 90:10) v časových úsecích 3 a 5 min. (jen do acetonitrilu a směsi acetonitril:voda 90:10)

Chromatografické podmínky: mobilní fáze – acetonitril:voda (65:35); průtok 1 ml/min; kolona Supelcosil LC-18-DB (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm); předkolona 5 µm Supelguard LC-18-DB (20 x 4,6 mm i.d.).

Aplikace SPME k určení vázání diazepamu na lidský sérový albumin^[21]

Studie se zabývala užitím metody SPME k hodnocení vázání diazepamu na lidský sérový albumin dvěma metodami. V první bylo vlákno vystaveno vzorku proteinu s přesně daným obsahem diazepamu a ve druhé bylo napřed vlákno vystaveno roztoku o jasně dané koncentraci diazepamu a následně necháno desorbovat do roztoku s proteinem.

Extrakční podmínky: použité vlákno – PDMS (100 µm vrstva polydimethylsiloxanu) od firmy Supelco; extrakční čas byl stanoven na 45 min.

Stanovení benzofenonů pomocí SPME a GC-ECD při stanovení benzodiazepinů v moči^[22]

Studie se zabývala převedením vybraných benzodiazepinů ze vzorku moči na benzofenony provedením kyselé hydrolýzy. Benzofenony byly následně extrahovány pomocí SPME a analyzovány pomocí GC-ECD.

Extrakční podmínky: použité vlákno – 10 mm dlouhé, 100 µm v průměru, PDMS (100 µm vrstva polydimethylsiloxanu) od firmy Supelco; extrakce ponořením – vlákno na 30 min. ponořeno do vzorku za stálého míchání, desorpce provedena za 5 minut přímo do nástřikové části GC; headspace extrakce – vzorek předehřán na 100 °C a dále udržován na této teplotě,

vlákno vystaveno nad hladinu vzorku po dobu 30 min.; desorpce provedena stejně jako v předešlém případě.

Stanovení midazolamu z lidské plasmy za užití SPME a GC-MS^[23]

Studie se zabývala kvalitativní a kvantitativní analýzou midazolamu z lidské plasmy provedením deproteinizace, extrakce tuhou fází a analýzou na GC-MS s použitím pinazepamu jako vnitřního standardu.

Extrakční podmínky: použité vlákno – PA (85 µm vrstva polyakrylátu) od firmy Supelco, před užitím aktivováno vložením na 10 – 15 min. do injekčního portu GC o teplotě 250 °C, po každém kroku promýváno vložením na 2 min. do destilované vody za stálého míchání a následně vložením na 2 minuty do injekčního portu GC; sorpce prováděna vložením vlákna do roztoku předehřátého na 50 °C na 10 min. za stálého míchání; pH upraveno na neutrální.

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo hodnocení benzodiazepinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) za užití mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Vypracování této praktické části se skládalo z několika níže uvedených úkolů.

1. Stanovení optimálních chromatografických podmínek pro HPLC analýzu čtyř vybraných benzodiazepinů a vybrání nejvhodnějšího z nich pro následné úkoly.
2. Extrakce oxazepamu z vodného roztoku za využití metody SPME a analýza výtěžku pomocí HPLC.
3. Extrakce oxazepamu z roztoku plasmy za využití metody SPME a analýza výtěžku pomocí HPLC.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál

Chemikálie a biologický materiál:

oxazepam – Spofa, Praha, Česká republika

diazepam – Spofa, Praha, Česká republika

nitrazepam – Spofa, Praha, Česká republika

medazepam – Spofa, Praha, Česká republika

methanol – Penta, Praha, Česká republika

kyselina fosforečná - Penta, Praha, Česká republika

hydroxid draselný ČL 2005 – RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, ČR

destilovaná voda

králičí heparisovaná plasma – Eldoret s.r.o., Praha, Česká republika

Chromatografický materiál:

analytické kolony pro HPLC

skleněná Separon SGX C18, 150x3 mm I.D., 7 μ m – Tessek ltd., Praha, ČR

skleněná Separon SGX C18, 150x3 mm I.D., 5 μ m – Tessek ltd., Praha, ČR

kovová Separon SGX C18, 150x4 mm I.D., 7 μ m – Tessek ltd., Praha, ČR

vlákno pro SPME – PDMS 100 μ m, výrobce: Supelco, Bellefonte, USA, dodavatel: Sigma Aldreich, Praha, ČR

držák pro SPME vlákno - výrobce: Supelco, Bellefonte, USA, dodavatel: Sigma Aldreich, Praha, ČR

Přístroje:

čerpadlo Consta Metric 3500 – Thermo Separation Products, USA

čerpadlo Spectra System P1000 – Thermo Separation Products, USA

autosampler Spectra System AS 1000 - Thermo Separation Products, USA

UV detektor Spectra System UV 3000 HR - Thermo Separation Products, USA

analytické váhy HR-120 - A&D Company ltd., Japonsko

pH metr Acidimetr 333 – Druopta Praha, Česká republika

ultrazvuk K 10 – Krainek s.r.o., Nové Zámky, Slovensko

magnetická míchačka MM2A – Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

počítačový program ChromQuest 4.2.34, Thermo Electron 2003, USA

Pomůcky:

mikropipeta 10 – 100 μ l – Eppendorf Research, Německo

4.2 Příprava standardů a vzorků

Na analytických váhách jsem odvážil do odměrné baňky o objemu 10 ml přesně 0,01 g oxazepamu. Ten následně v této baňce rozpustil přidáním methanolu o objemu sahajícím po rysku. Po úplném rozpuštění oxazepamu jsem vzniklý roztok o koncentraci 1 mg/ml použil pro přípravu standardů a vzorků.

Standardy jsem připravoval naředěním připraveného roztoku na koncentrace 0,1 a 0,05 mg/ml. To jsem provedl za použití odměrných baněk o objemu 10 ml. Do nich jsem odpipetoval 1, respektive 0,5 ml z roztoku o koncentraci 1 mg/ml a doplnil methanolem po rysku. Vytvořenými standardy jsem naplnil na patřičný objem vialky určené do autosampleru HPLC.

Vzorky jsem připravoval odpipetováním 0,5 ml výše popsaného roztoku oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml do vialky. K tomuto objemu vzorku jsem následně odpipetoval 4,5 ml vody. Tímto postupem jsem připravoval vodné roztoky, které byly poté využity pro extrakci pomocí PDMS vlákna. V případě přípravy roztoků plasmy jsem postupoval obdobně. Jen s tím rozdílem, že jsem k 0,5 ml methanolického roztoku oxazepamu přidal 4,5 ml plné plasmy. Tu jsem před nabráním pipetou řádně promísil. Kromě roztoku s obsahem plné plasmy jsem připravoval ještě roztok s plasmou ředěnou. Ten jsem vytvořil přidáním 0,5 ml dobře promísené plasmy k 0,5 ml methanolického roztoku oxazepamu ve vialce a doplněním 4 ml destilované vody. Všechny tímto způsobem připravené vzorky byly následně použity k extrakci za využití PDMS vlákna.

4.3 Provedení extrakce PDMS vláknem

Vzorky připravené podle výše uvedeného postupu jsem podrobil extrakci za využití PDMS vlákna. Vialku s vzorkem jsem umístil do držáku na magnetickou míchačku a s využitím míchadla nechal roztok promíchávat. PDMS vlákno umístěné do držáku k tomu určeného jsem připevnil ke stojanu a následně ponořil do roztoku. Sorpci jsem prováděl v časových intervalech 10, 5, 3 a 2 minuty. Po uplynutí časového úseku jsem vlákno z roztoku vytáhl a následně ponořil do vialky s insertem obsahujícím 250 μ l methanolu. Desorpci jsem prováděl opět v několika různých časových úsecích, které měřily 10, 5 a 2 minuty. Po uplynutí časového úseku jsem vialku s insertem umístil do autosampleru a provedl HPLC analýzu.

Před začátkem provádění extrakce jsem vždy vlákno aktivoval ponořením do vialky s methanolem na dobu 30 minut. Mezi jednotlivými dílčími extrakcemi jsem vlákno nechal 10 minut očišťovat ponořením do vialky naplněné čistým methanolem k odstranění navázaných zbytkových podílů obsažených látek.

4.4 Podmínky HPLC analýzy

Vzorek získaný extrakcí PDMS vláknem dle postupu popsaného v předešlé kapitole jsem podrobil hodnocení pomocí HPLC za využití analytické kolony Separon SGX C18.

Dávkování vzorku jsem prováděl za využití autosampleru Spectra System AS 1000, do jehož prostoru jsem umístil na patřičnou pozici vialku s insertem obsahujícím 250 μ l methanolického roztoku extrahovaného oxazepamu. Objem nastříkované dávky jsem nastavil na 20 μ l.

K analýze jsem využil UV detektor Spectra System UV 3000 HR nastavený na vlnovou délku 254 nm.

Jako mobilní fázi jsem po načerpání informací ze zdrojů zabývajících se touto tematikou a vyzkoušení několika možných zvolil směs methanol:voda v poměru 80:20. Po provedení pokusů s cílem zjistit optimální pH směsi jsem zvolil úpravu na pH 7,5. Mobilní fázi jsem tak vždy musel podrobit úpravě pH za využití roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,01 mol/l. Ke 250 ml směsi mobilní fáze jsem odpipetoval 0,3 ml tohoto roztoku za současného měření aktuální hodnoty pH na pH-metru. Po úpravě pH jsem mobilní fázi odplynul vystavením ultrazvuku na dobu 10 minut. Průtokovou rychlost jsem nastavil na 0,8 ml/min.

Pro kvantitativní hodnocení jsem využil metodu vnějšího standardu. Ten jsem připravil ze stejného roztoku oxazepamu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml, jaký jsem používal k přípravě vodných a plasmových roztoků následně podrobených extrakci PDMS vláknem. Určitý podíl methanolického roztoku oxazepamu jsem naředil dle postupu uvedeného v kapitole 4.2 na koncentrace 0,1 a 0,05 mg/ml. Těmi jsem následně naplnil vialky, jež jsem umístil do autosampleru a nechal zanalyzovat za HPLC podmínek odpovídajících analýze vzorků.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr chromatografických podmínek pro HPLC analýzu vybraných benzodiazepinů

Prvotním úkolem před zahájením procesů vlastního měření bylo stanovení optimálních chromatografických podmínek pro čtyři vybrané benzodiazepiny (diazepam, medazepam, nitrozepam a oxazepam).

Zde jsem se nejprve seznámil s podmínkami uvedenými v literatuře zabývající se tématem analýzy benzodiazepinů (viz. Kap. 2.6). Jako prvotní jsem tak použil následující podmínky. Za mobilní fázi jsem použil směs acetonitril:voda o poměru 35:65 bez změny pH (naměřeno 5,31) a průtok nastavil na 0,6 ml/min. Detekce probíhala při 280 nm. Standardy jsem připravil dle postupu uvedeného výše v příslušné kapitole.

Retenční čas diazepamu byl 24,7 minuty, nitrazepamu 7,5 minuty, oxazepamu 6,5 minuty a k vymytí medazepamu do třiceti minut nedošlo. Výsledné píky však nebyly příliš ostré ani symetrické.

Následně jsem zkusil upravit hodnotu pH mobilní fáze za použití roztoku kyseliny fosforečné na hodnotu 4,46.

U nitrazepamu se tím retenční čas zvýšil na 10,5 minuty, u oxazepamu na 6,6 minuty a k vymytí diazepamu a medazepamu do třiceti minut nedošlo. Výsledné píky i nadále zůstávaly neostré a nesymetrické.

Jako další úpravu podmínek jsem provedl další snížení pH pomocí roztoku kyseliny fosforečné na hodnotu 3,77.

Retenční čas nitrazepamu zůstával na hodnotě 10,5 minuty, oxazepamu se zvýšil na 7 minut a k vymytí diazepamu a medazepamu do třiceti minut nedošlo. U výsledných píků došlo k mírnému zlepšení ostrosti a symetričnosti.

Následně jsem provedl poslední úpravu mobilní fáze snížením pH. Opět jsem využil roztoku kyseliny fosforečné a snížil hodnotu pH na 2,7.

Tím došlo u nitrazepamu k následnému snížení retenčního času na hodnotu 10,2 minuty, oxazepamu na 6,5 minuty a k vymytí zbylých dvou benzodiazepinů v průběhu třiceti minut znovu nedošlo. Získané píky zůstávaly stále neostré a nesymetrické.

Jako poslední postup v úpravě pH jsem zvolil cestu drobné alkalizace mobilní fáze za užití roztoku hydroxidu draselného a hodnotu pH nastavil na 6,5.

U nitrazepamu i tak zůstával retenční čas na hodnotě obdobné té získané za nejkyslejších podmínek, a sice 10,2 minuty. U oxazepamu byl retenční čas 7 minut a diazepam s medazepamem znova žádný záznam během třiceti minut neposkytly.

Vzhledem ke stále neuspokojivé symetričnosti a ostrosti píků jsem se rozhodl pro další změny ve složení fáze. Podle literatury (viz. Kap. 2.6) jsem zaměnil do té doby zkoušenou fázi acetonitril:voda za složení methanol:voda v poměru 65:35 a detekci nastavil na vlnovou délku 254 nm.

To mělo pozitivní vliv na snížení hodnot retenčního času nitrazepam, který touto úpravou klesnul na hodnotu 8,3 minuty. U oxazepamu došlo naopak ke zvýšení hodnoty na 9,5 minuty. V případě diazepam s medazepamem zůstával setrvalý stav, neboť se ani jedna z těchto látek do 30-ti minut z kolony nevymyla. Změna měla pozitivní vliv rovněž na tvar píků, byť stále symetričnost a ostrost zůstávala hodně za očekáváním.

Další úprava mobilní fáze se týkala změny poměru obou obsažených složek. Nově jsem poměr nastavil na 80:20 (methanol:voda).

Tato úprava přinesla velký skok ve snížení retenčních časů, u nitrazepam na hodnotu 3,8 a oxazepam 4,2 minuty. Diazepam a medazepam po předešlých neúspěšných pokusech jsem již dále nezkoušel a omezil se na stanovování podmínek pro zbylou dvojici benzodiazepinů.

Vzhledem ke stále nepěkným parametrům vzhledu píků jsem se rozhodl pro změnu kolony. Namísto skleněné Separon SGX C18 o velikosti zrn 7 μm jsem použil obdobnou s velikostí zrn 5 μm . Vzhledem k výraznému zvýšení tlaku jsem musel upravit hodnotu průtoku na 0,4 ml/min.

To s sebou přineslo zvýšení retenčních časů, v případě nitrazepam na 5,4 a oxazepam 6,5 minuty. Tvary píků se oproti kýženému zlepšení spíše o něco zhoršily.

Následně jsem se rozhodl pro druhou změnu kolony a nově použil kovovou kolonu Separon SGX C18 o parametrech 150x4 mm a velikosti zrn 7 μm . Co se mobilní fáze týče, stále jsem užíval směs methanol:voda, ovšem v poměru složek 65:35.

Tato změna měla značně pozitivní vliv na symetričnost a ostrost píků. Vzhledem k možnostem této kolony jsem také mohl zvýšit průtok, a to na 0,8 ml/min. Hodnoty retenčních časů se změnilly následovně, u nitrazepam na 3,8 a oxazepam 4,5 minuty.

V dalším hledání optimálních chromatografických podmínek jsem tedy setrval u stejné kolony a pro zlepšení parametrů píků jsem se uchýlil ke změně poměru složek fáze na 80:20 (methanol:voda).

Tato změna zajistila výrazný pokles vymytí u obou benzodiazepinů, v případě nitrazepamů na 2,3 a oxazepamů 2,5 minuty. Zároveň se znovu zlepšila ostrost a symetričnost získaných píků.

Následně jsem provedl drobnou úpravu pH mobilní fáze užitím roztoku hydroxidu draselného na hodnotu 7.

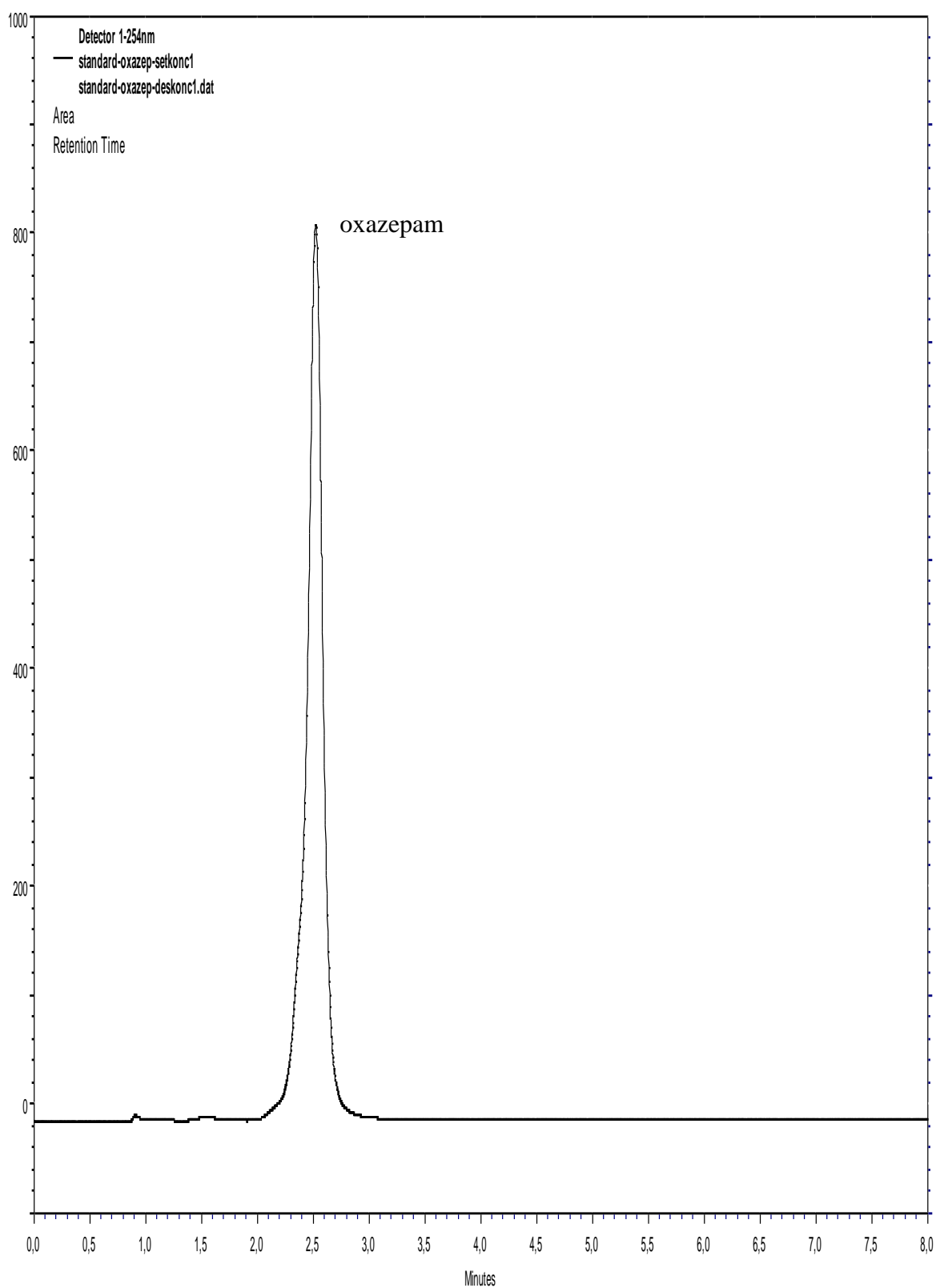
To nevedlo k žádným změnám v hodnotách retenčních časů, jen zlepšilo už tak docela reprezentativní vzhled píků.

Závěrečnou úpravu podmínek jsem provedl znovupoužitím roztoku hydroxidu draselného za zvýšením pH mobilní fáze na 7,5.

Tato změna nepřinesla změnu retenčních časů, které i nadále setrvaly u nitrazepamů na 2,3 a oxazepamů 2,5 minuty. Ostrost a symetričnost píků byla ovšem za těchto podmínek nejlepší ze všech zkoušených.

Nakonec jsem se rozhodl využít pro následné analyzování mobilní fázi o složení methanol:voda v poměru 80:20 a úpravou pH na hodnotu 7,5. Měření jsem prováděl při průtoku 0,8 ml/min a detektor nastavil na 254 nm.

Při porovnání retenčních časů, jež byly u obou látek skoro stejné, a parametrů píků jsem se rozhodl pro následné měření využít ze dvou posledně zkoušených benzodiazepinů oxazepam. Pro názornost je možno zhlédnout Obr. č. 8.



Obr.č. 8: HPLC chromatogram methanolickeho roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml stanovovaneho pri vybraných chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm

5.2 Extrakce oxazepamu z vodného roztoku užitím PDMS vlákna

5.2.1 Stanovení minimální detekovatelné koncentrace

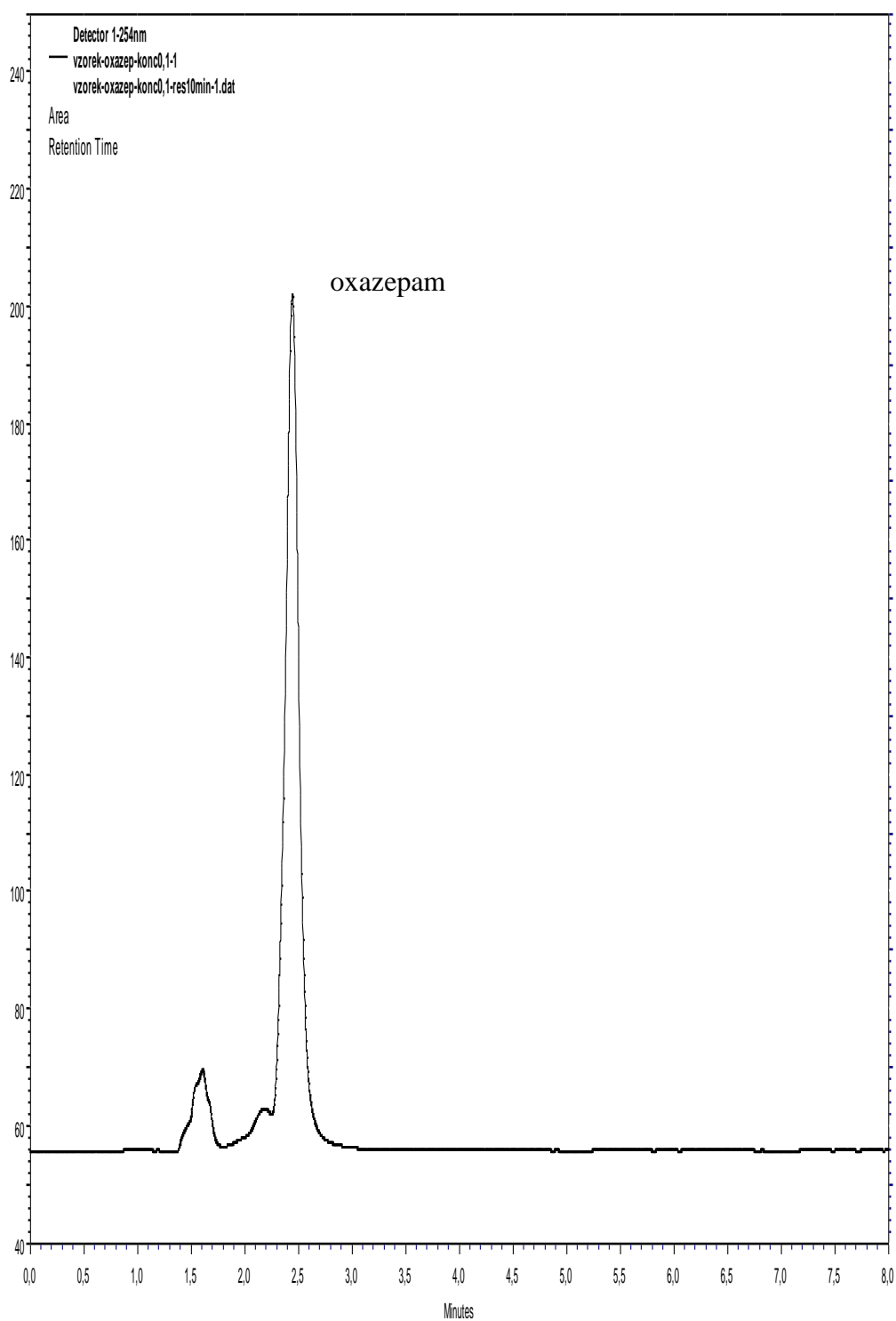
Za využití zjištěných optimálních chromatografických podmínek jsem stanovoval oxazepam extrahovaný do methanolu. K tomu jsem využil metody mikroextrakce na pevnou fázi s vybraným polydimethylsiloxanovým vláknem (PDMS). Při extrakci jsem postupoval přesně podle schématu popsaného v kapitole 4.3. Cílem bylo nejprve zjistit minimální koncentraci oxazepamu ve vodném roztoku, kdy ještě dochází k extrakci a látka je při následné HPLC analýze detekovatelná. Při stanovování této minimální koncentrace jsem vždy ponechal vlákno 10 minut adsorbovat látku z roztoku a následně na 10 minut vlákno ponořil do čistého methanolu pro provedení desorpce.

Nejprve jsem podrobil extrakci vodný roztok oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml. Zde došlo k extrakci v takovém rozsahu, že při HPLC analýze byl extrahovaný podíl bez problémů detekován.

Následně jsem tedy snížil podíl oxazepamu ve vodném roztoku na desetinu, koncentrace tedy klesla na 0,1 mg/ml. I při tomto snížení koncentrace extrakce umožnila bezproblémovou detekci při následné analýze na přístroji HPLC. Množství extrahovaného oxazepamu se však snížil, což se pochopitelně projevilo zmenšením plochy píku ve výsledném chromatogramu (viz. Obr.č. 9).

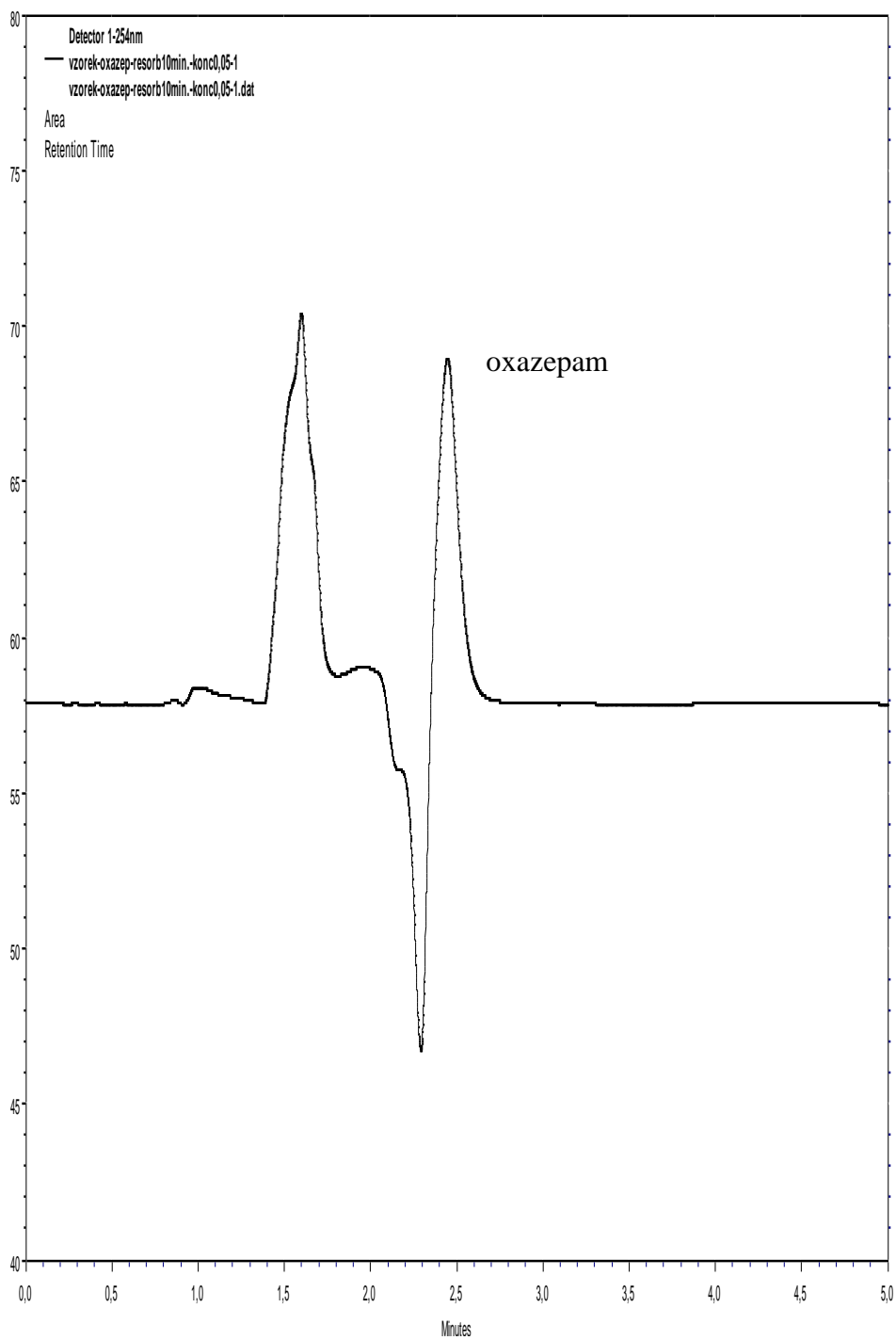
Koncentraci roztoku oxazepamu jsem tedy dále snižoval na hodnotu znovu desetkrát nižší, tedy 0,01 mg/ml. Při této koncentraci za neměnných podmínek extrakce a analýzy již látka neposkytla kvantitativně hodnotitelný pík.

Pro stanovení minimální detekovatelné koncentrace jsem se rozhodl ještě připravit roztok o obsahu 0,05 mg/ml oxazepamu. Ani tato koncentrace nevytvořila na HPLC chromatogramu kvantitativně hodnotitelný pík (viz. Obr.č. 10).



Obr.č. 9: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci i desorpci trvající 10 minut.

(Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

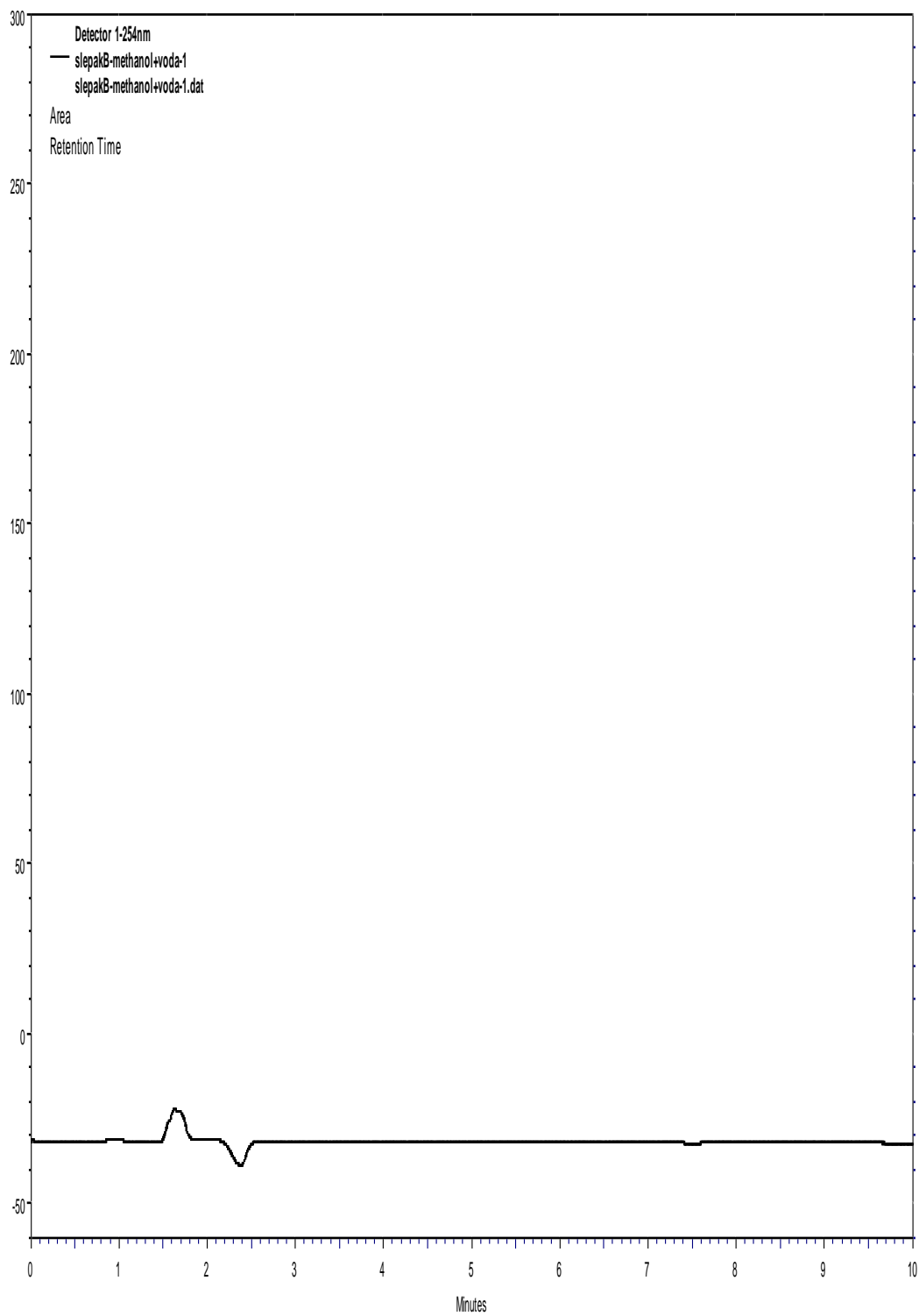


Obr.č. 10: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,05 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

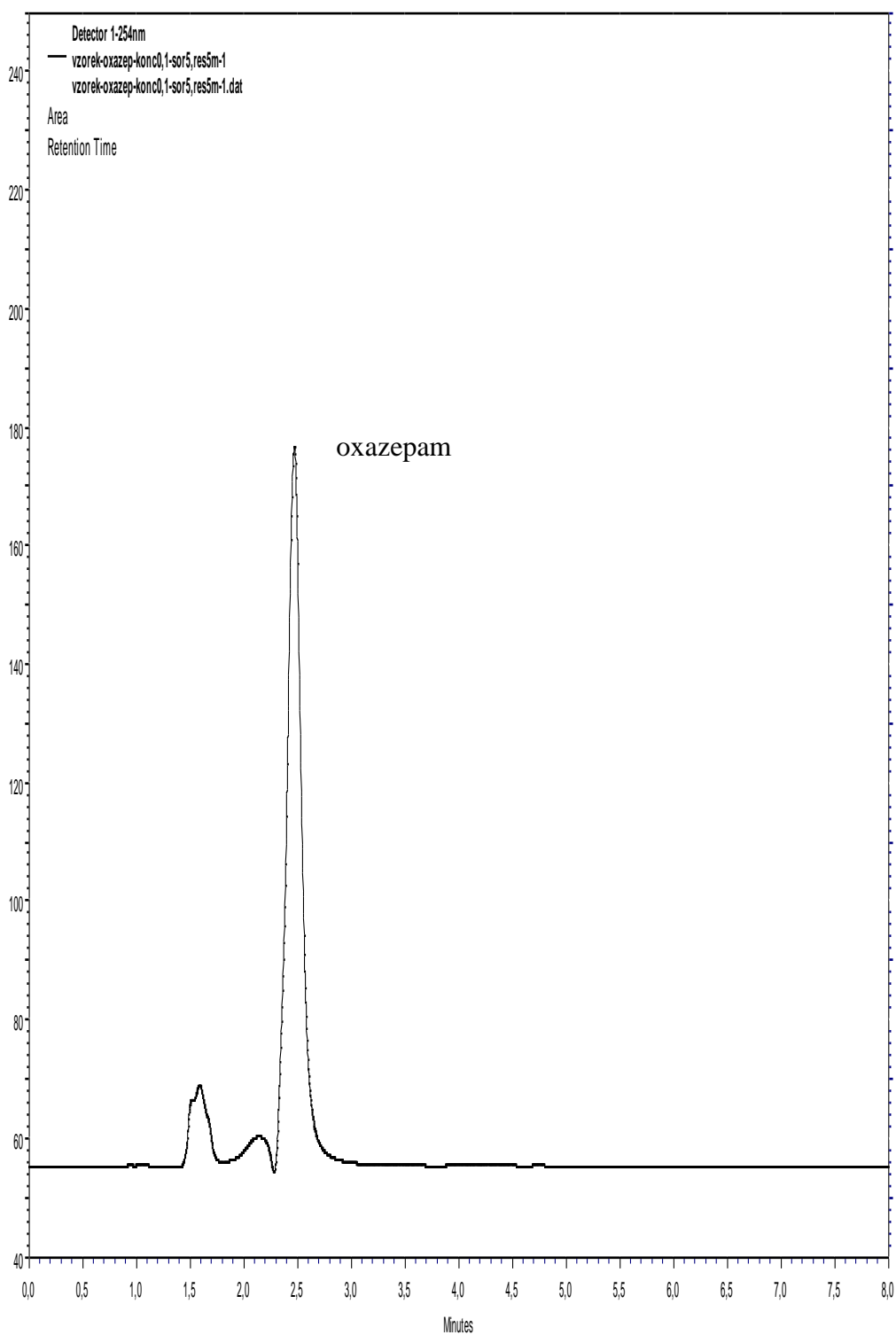
5.2.2 Porovnání výtěžků mikroextrakce při různých dobách trvání sorpce a desorpce

Po stanovení koncentrace oxazepamu v roztoku, jaká ještě vede k detekování této látky při HPLC analýze, jsem podrobil porovnávání analyzované výtěžky při různých dobách trvání procesu sorpce oxazepamu na vlákno a následné desorpce do methanolu. Z původních deseti minut sorpce a desorpce (viz. Obr.č. 9) jsem časový úsek sorpce snížil na polovinu a desorpci nechal na 10 minut (viz. Obr. č. 12). Poté jsem výtěžek analyzoval na HPLC a u vytvořeného chromatogramu zjistil plochu píku patřícímu oxazepamu. Tuto hodnotu jsem následně využil pro výpočet koncentrace extraktu a procentuálního výtěžku, který jsem vypočetl poměření k hodnotám chromatogramu standardu. Tímto způsobem jsem postupoval u všech provedených extrakcí různých časových schémat (viz. Kap. 4.3). Tato časová schémata vedle již zmíněného 10 minut / 10 minut (sorpce/desorpce) a 5/10 obsahovala 5/5, 3/5, 2/5 a 2/2.

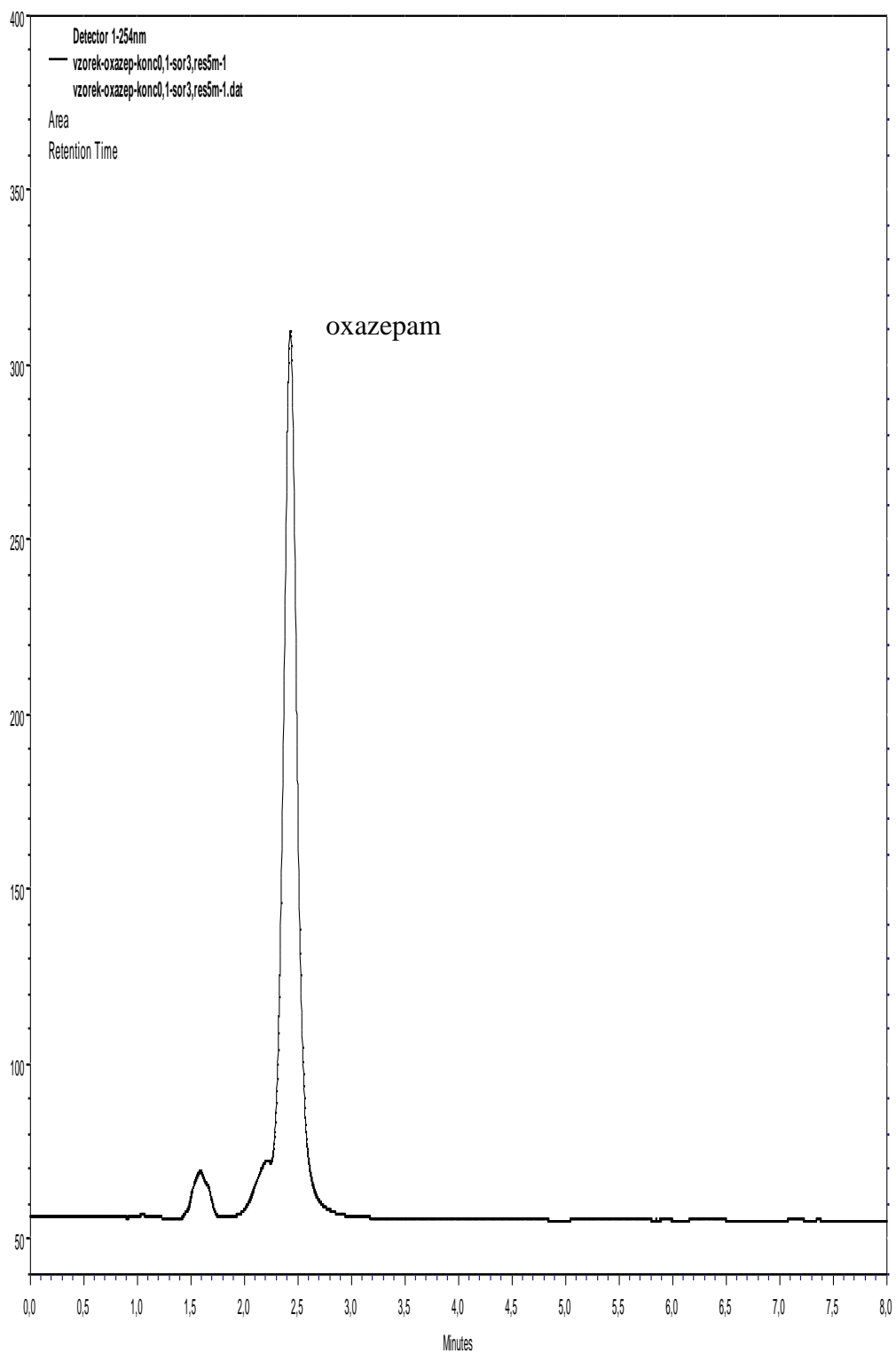
Pro zaručení správného výpočtu jsem podrobil extrakci roztok obsahující čistou destilovanou vodu a čistý methanol v poměru odpovídajícím analyzovaným roztokům s obsahem oxazepamu. Tímto jsem zjistil, zda se neextrahují vedle oxazepamu i jiné složky, se které by se eventuálně při výpočtech musely brát v úvahu (viz. Obr. č. 11).



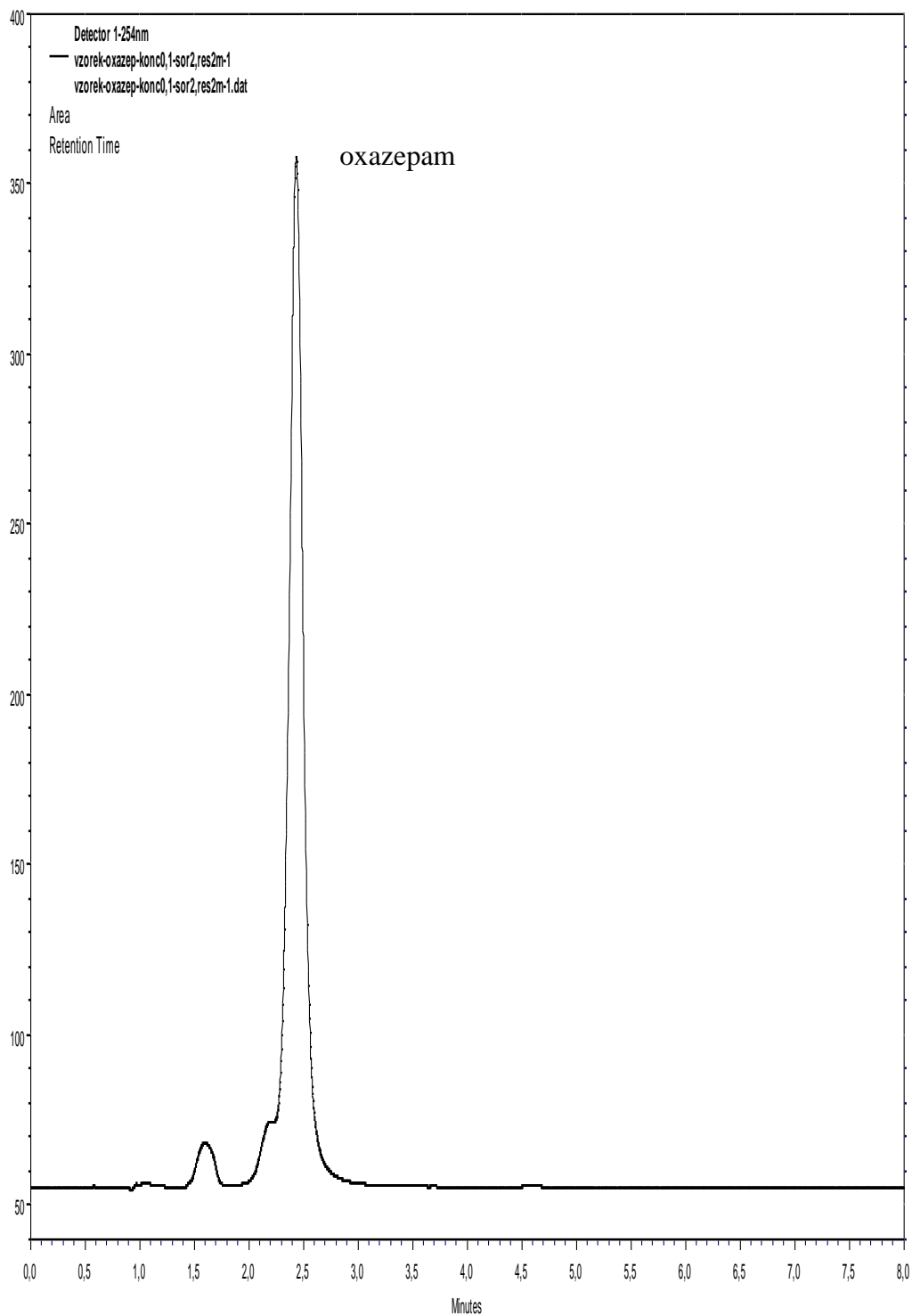
Obr. č. 11: HPLC chromatogram slepého pokusu s čistým roztokem bez obsahu oxazepamu (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 12: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci a desorpci trvající 5 minut. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 13: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci trvající 3 a desorpci 5 minut. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 14: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci a desorpci trvající 2 minuty. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

5.2.3 Výpočet množství oxazepamu v extraktu

Bod č. 1 – Stanovení obsahu oxazepamu v roztoku podrobeném extrakci

Ze základního methanolického roztoku oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml odebráno 0,5 ml » v roztoku pro extrakci obsaženo celkem 0,5 mg oxazepamu

Bod č. 2 – Stanovení obsahu oxazepamu v nástřiku standardu

Z roztoku standardu o koncentraci 0,1 mg/ml nastříkováno 20 µl » v nástřiku obsaženo 0,002 mg (2 µg) oxazepamu

Bod č. 3 – Porovnání ploch pod píky standardu a příslušného extraktu

Za modelový příklad vybrán extrakt časového schématu 10 minut / 10 minut (sorpce/desorpce).

0,002 mg (obsah oxazepamu)..... 8707546 (plocha píku)

x 1458746

$$x = 0,00200 / 8707546 * 1458746 = 0,00034$$

Ve 20 µl nástřiku extraktu bylo obsaženo 0,00034 mg (0,34 µg) oxazepamu.

Bod č. 4 – Výpočet množství oxazepamu v extraktu a stanovení jeho koncentrace

0,00034 mg (0,34 µg) oxazepamu obsaženo ve 20 µl nástřiku » v celkovém objemu extraktu 250 µl obsaženo 0,00425 mg (4,25 µg) oxazepamu » koncentrace extraktu byla 0,017 mg/ml.

5.2.4 Výsledné hodnoty koncentrace oxazepamu po provedení mikroextrakce

V následující tabulce (Tab č. 3) jsou uvedeny všechny hodnoty vztahující se k porovnávání výtěžků mikroextrakce při výše zmíněných rozdílných časových schématech. Hodnota koncentrace se vztahuje k množství extrahovaného oxazepamu do insertu s obsahem methanolu o objemu 250 μ l. Postup výpočtu samotné hodnoty procentuálního výtěžku je nastíněn v předešlé kapitole 5.2.3.

Časové schéma sorpce/desorpce (min)	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace (mg/ml)
10/10	1441239	1458746	0,01675
10/10	1476253		
5/10	2717862	2731295	0,03137
5/10	2744728		
5/5	1153100	1146692	0,01317
5/5	1140283		
3/5	2531588	2540910	0,02918
3/5	2550232		
2/5	1916362	1902097	0,02184
2/5	1887831		
2/2	3047324	2883751	0,03312
2/2	2720177		

Tab č. 3: Hodnoty veličin vztahujících se k porovnání mikroextrakce provedené v různých časových schématech

Z hodnot zaznamenaných do tabulky jasně vyplývá, že zkrácení trvání procesu sorpce a desorbce nemá přímou úměrou vliv na snížení nebo zvýšení množství extrahované látky. Toto množství mezi jednotlivými postupně se zkracujícími časovými úseky zcela nepravidelně kolísá. Zároveň je možné z tabulky vyčíst, jaké časové schéma se pro danou

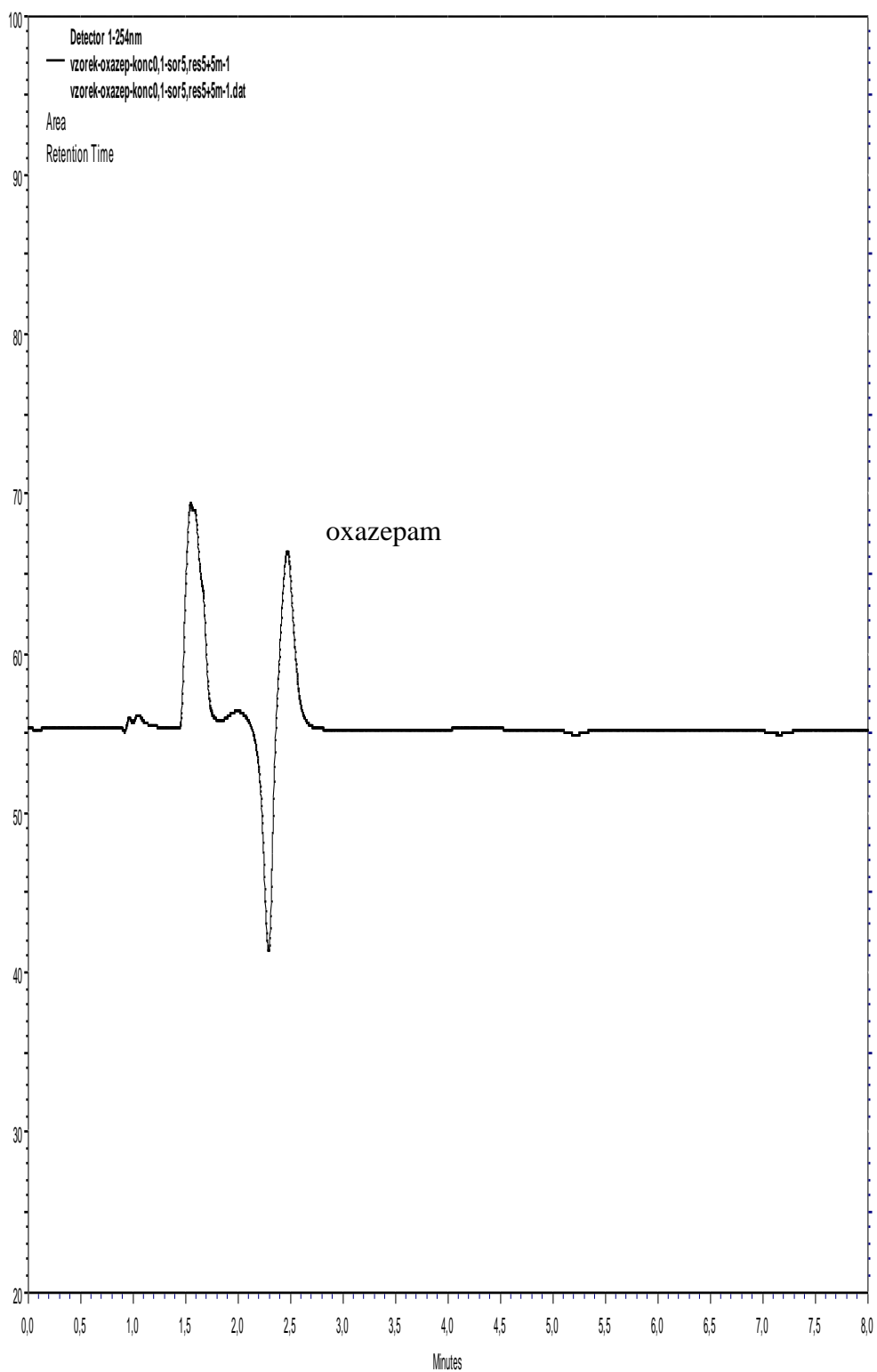
metodu mikroextrakce oxazepamu hodí nejvíce. Při porovnání délky trvání procesu k jeho procentuálnímu výtěžku vychází jako ideální volba nejkratší dobu trvající proces o sorpci i desorpci trvající 2 minuty.

Z tabulky lze zároveň vyčíst i velmi malé množství oxazepamu, jaké se extrahovalo z jeho vodného roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml, pohybující se nejvýše těsně nad 1,5 %. Na uvedených grafech (Obr. č 12 – 14) je ale patrné, že lze při této koncentraci roztoku oxazepam i při takto malých procentuálních výtěžcích bez potíží stanovit.

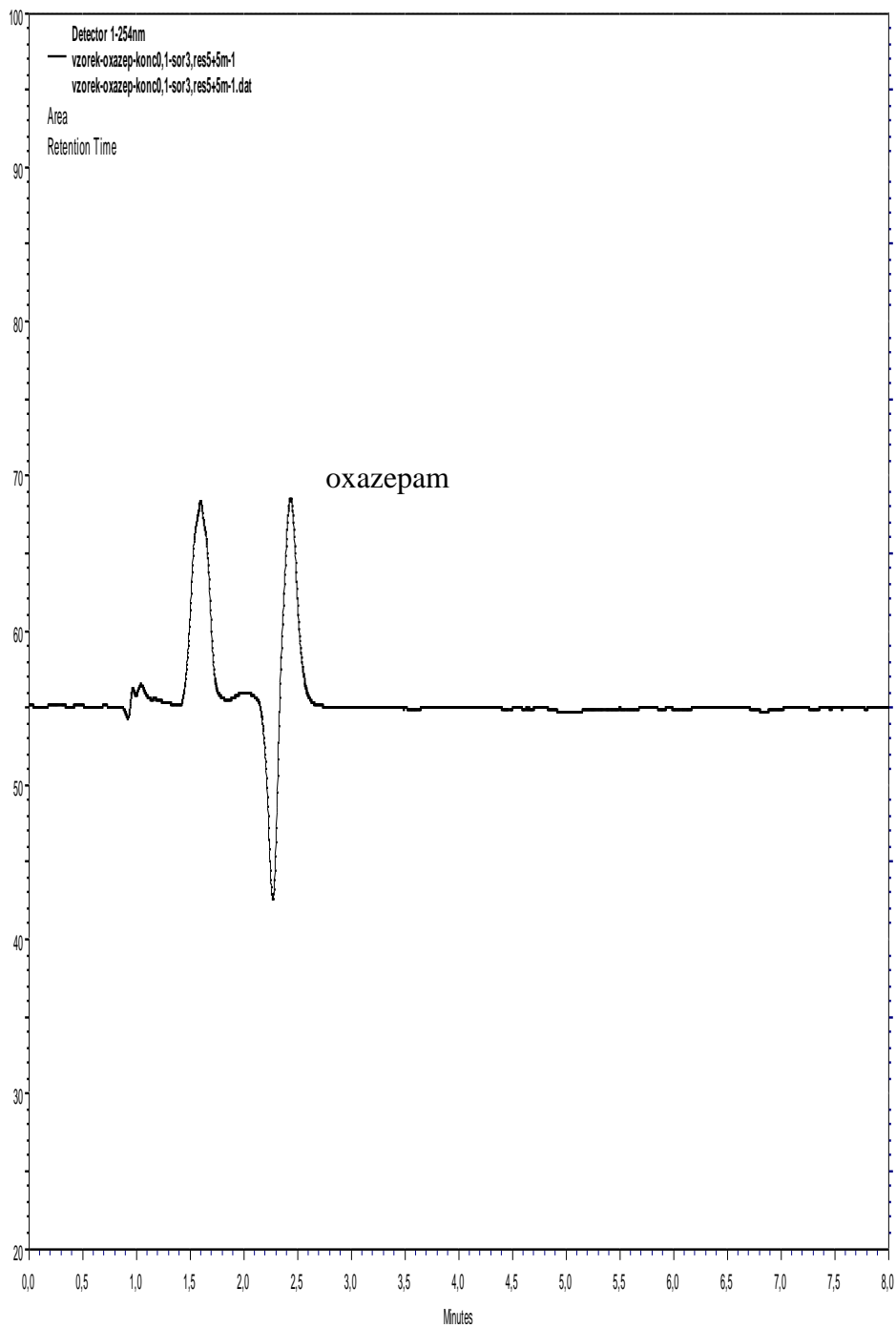
Po provedení desorpce oxazepamu do methanolu jsem podrobil vlákno na další stejný časový úsek ponoření do identického množství methanolu (pozn. po desetiminutové desorpci tedy následovala další desetiminutová desorpce). I ten jsem následně nechal analyzovat na HPLC, abych zjistil, jaké množství látky zůstalo po prvotní provedené desorpci navázáno na vlákno. Výsledkem této analýzy bylo zjištění, že vlákno po primární desorpci v podstatě obsahovalo zanedbatelný zlomek analyzované látky. (viz. Tab č. 4 a Obr. č. 15 – 16). K takřka úplnému očištění vlákna a uvolnění oxazepamu tak došlo již při primárně provedené desorpci.

Časové schéma sorpce/desorpce (min)	Plocha	Koncentrace (mg/ml)
10/10+10	37842	0,00043
5/5+5	86791	0,00100
3/5+5	112880	0,00130
2/5+5	127776	0,00147

Tab č. 4: Hodnoty výtěžků po provedení sekundární desorpce



Obr. č. 15: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml po provedení sekundární desorpce o délce 5 minut provedené po pětiminutové sorpci a pětiminutové prvotní desorpce. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 16: HPLC chromatogram vodného roztoku oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml po provedení sekundární desorpce o délce 5 minut provedené po tříminutové sorpci a pětiminutové prvotní desorpci. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

5.2.5 Porovnání extrakcí při pH nezměněném a upraveném

Jedním z faktorů, které mohou mít vliv na výtěžnost, je vedle úpravy času a koncentrace i úprava pH roztoku podrobeného mikroextrakci. Po změření pH roztoku, který jsem použil pro předchozí postupy, jsem zjistil jeho hodnotu 6,7. Tato hodnota je o něco kyselější než hodnota pH použité mobilní fáze. Rozhodl jsem se proto obě hodnoty sjednotit a upravil tak pH vodného roztoku oxazepamu na 7,5 za použití roztoku hydroxidu draselného.

Pro následné porovnání výtěžnosti takto upraveného roztoku s roztokem beze změny pH jsem použil jediné schéma, a sice to s délkou sorpce i desorpce 10 minut. Po provedení HPLC analýzy a kvantifikaci píků jsem došel k závěru, že tato změna měla na výtěžnost jen velmi nepatrný a prakticky zanedbatelný vliv. Zjištěný pík měl parametry odpovídající píku z Obr. č. 9 a hodnoty naměřené porovnáním plochy pod píkem daly zvýšení koncentrace extrahovaného oxazepamu v řádu desetitisícin. (viz. Tab. č. 5)

pH vody	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace (mg/ml)
nezměněné	1441239	1458746	0,01675
nezměněné	1476253		
7,5	1479647	1473315	0,01692
7,5	1466982		

Tab č. 5: Srovnání hodnot výtěžků při pH nezměněném a upraveném na hodnotu 7,5 (časové schéma sorpce / desorpce v obou případech shodné – 10 / 10 minut)

5.3 Extrakce oxazepamu z plasmy užitím PDMS vlákna

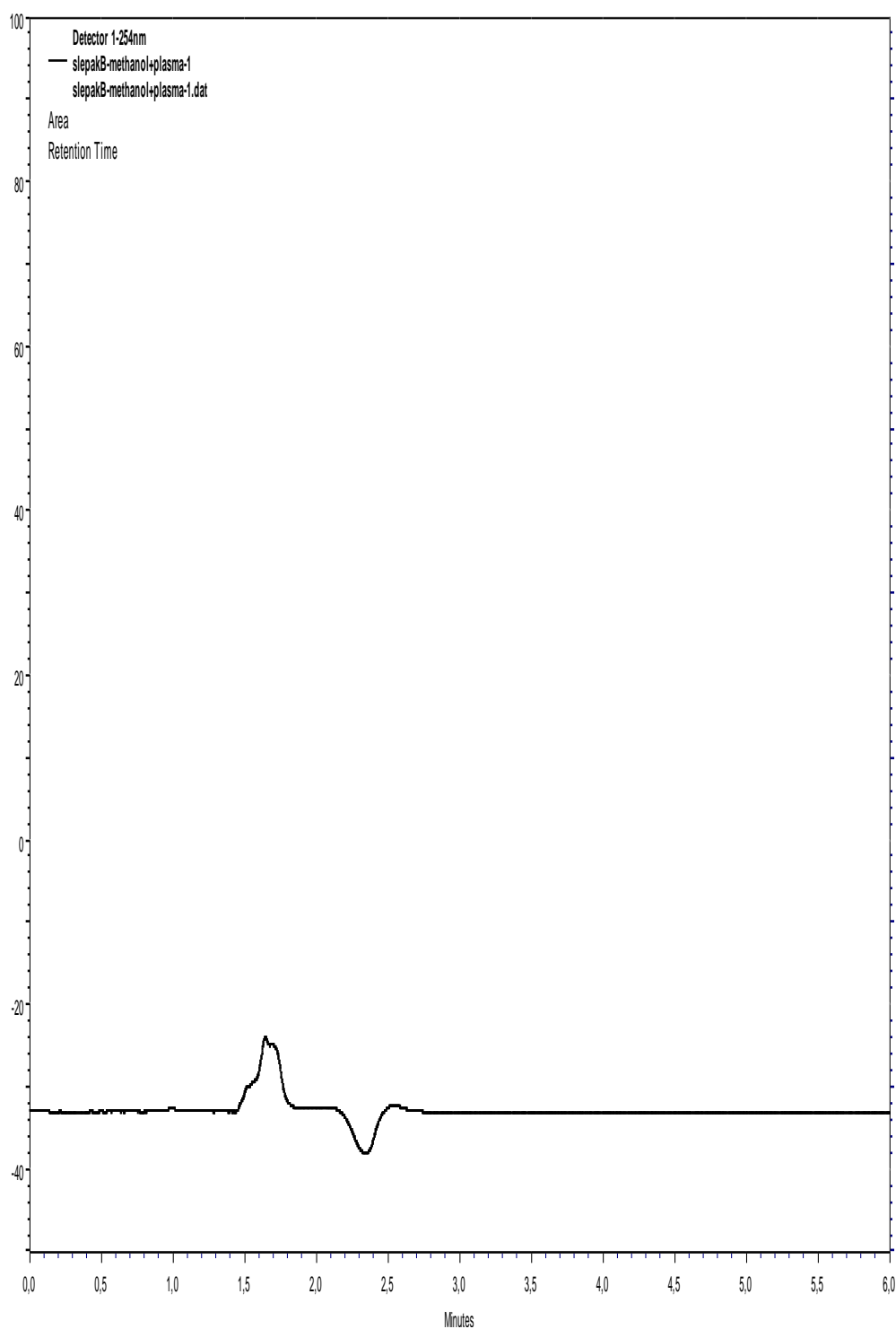
5.3.1 Zjištění výtěžnosti extrakce oxazepamu ze zředěné plasmy

Po úspěšném provedení extrakce oxazepamu z vodného roztoku jsem zkusil analyzovat extrakt získaný z roztoku stejné látky v plasmě. Pro přiblížení podmínek vodnému prostředí jsem nejprve připravil roztok zředěné plasmy o její koncentraci 10 % (viz. Kap. 4.2). Na základě výsledků předchozích měření u vodných roztoků jsem podrobil analýze extrakty získané pouze ze dvou časových schémat. A to z časového schématu nejkratšího a zároveň nejvýtěžnějšího, tedy trvání sorpce i desorpce po dvou minutách, a nejdelšího s délkou obou sorpčních procesů po deseti minutách. K tomu jsem využil roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml, která se ukázala v analýzách vodných roztoků jako limitní pro možnost extrahovatelnosti. Hodnotu pH jsem na základě výsledků z předchozích měření, která neprokázala její změnu za opodstatněnou, neupravoval.

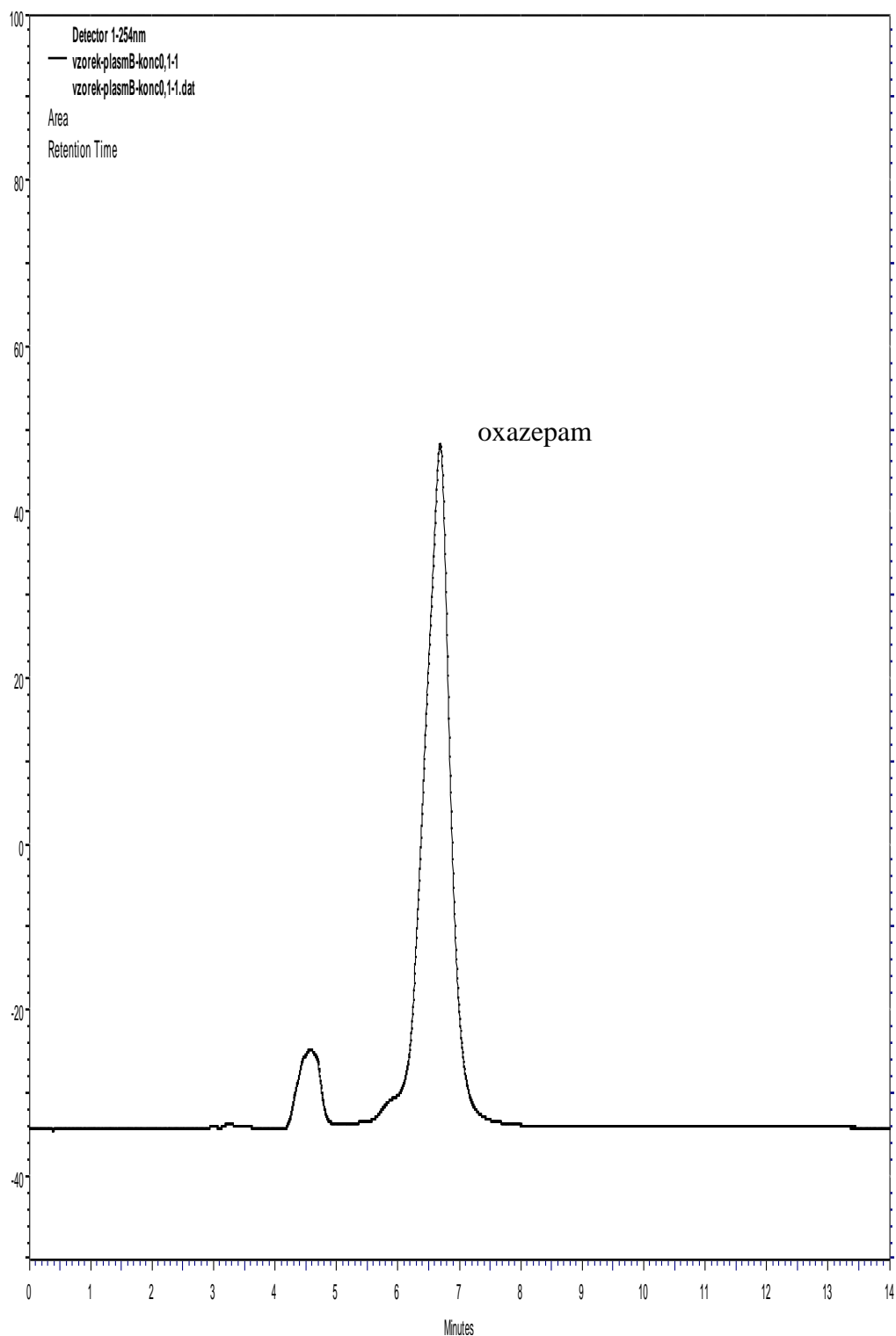
Výsledkem analýzy byly píky, které se od těch získaných analýzou extraktů z vodného roztoku drobně lišily svým tvarem, přesněji větší šířkou základny. Zároveň zde došlo k posunutí retenčních časů z původních 2,5 minuty na 6,5. Jak ale vyplývá z porovnání retenčního času methanolického píku u analýzy vzorky a u slepého pokusu, který byl proveden před výměnou čerpadla u přístroje HPLC, je na vině právě změna této součástky. Zatímco u slepého pokusu se methanolický pík nachází v retenčním čase zhruba 1,6 minuty, jak to odpovídá i všem měřením provedeným u vodných roztoků extrahovaných do methanolu, v případě roztoku s obsahem ředěné plasmy analyzovaném na novém čerpadle byl jeho čas 4,5 minuty.

Po změření hodnot ploch píků a výpočtu výtěžnosti podle postupu popsaného v kapitole 5.2.3 jsem došel k překvapivým závěrům. U časového schématu sorpce / desorpce 10 / 10 minut byla výtěžnost ze zředěné plasmy o něco vyšší. Při časovém schématu 2 / 2 minuty naopak výtěžnost v porovnání s vodným roztokem o něco klesla. (viz. Tab. č. 6). Z toho vyplývá, že pro extrakci oxazepamu z plasmy je oproti vodnému roztoku zapotřebí delších časových úseků sorpce a desorpce. Zároveň se však nepotvrdilo, že by u zředěné plasmy docházelo k navázání oxazepamu na některou z jejích složek, která by pak mohla znemožňovat provedení extrakce PDMS vláknem. Jak je možno vyčíst z HPLC

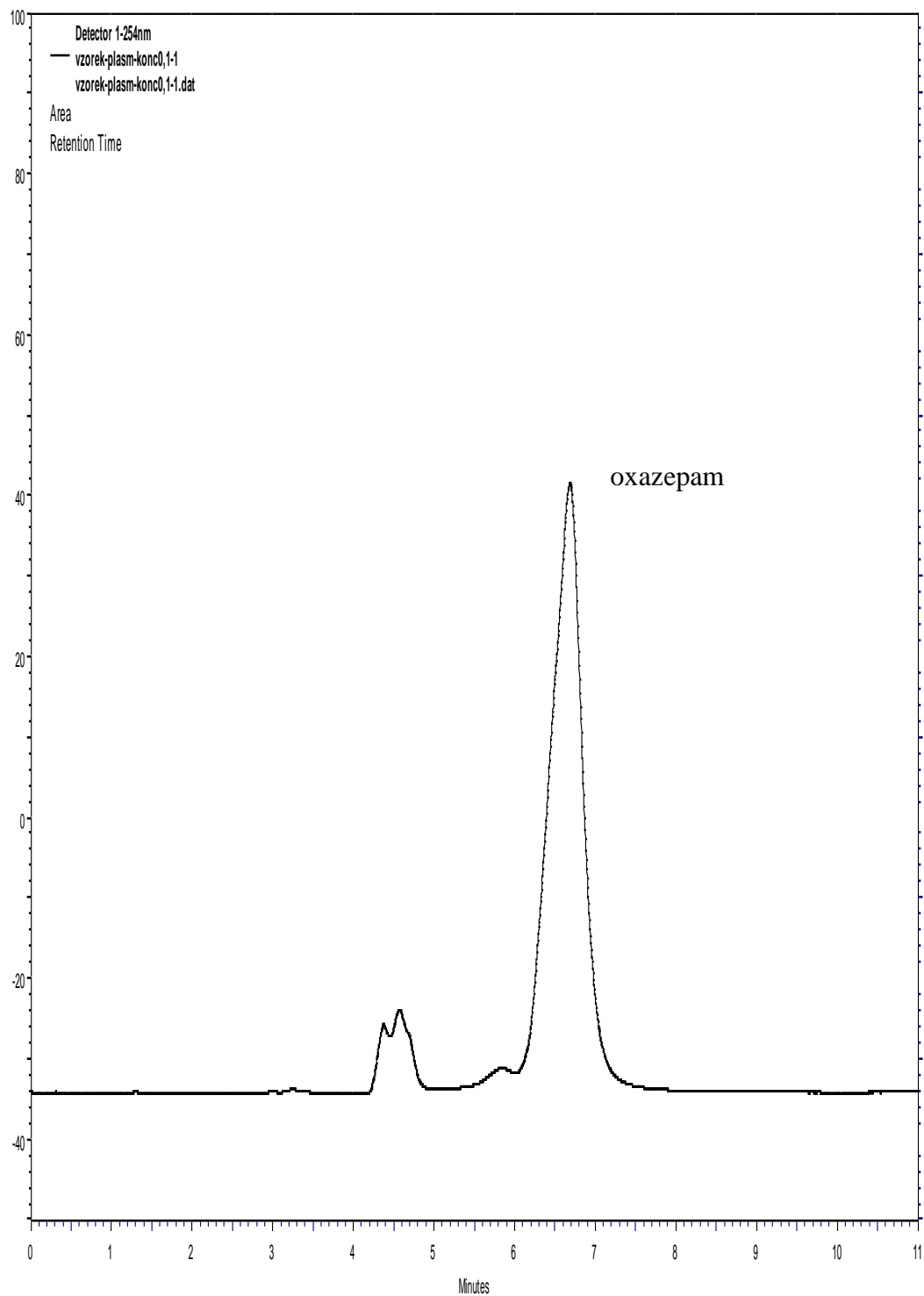
chromatogramu slepého pokusu (viz. Obr. č. 17), přes vlákno se do methanolu neextrahovala žádná ze složek plasmy, a ten byl tedy obdobný tomu získanému u čistého vodného roztoku.



Obr. č. 17: HPLC chromatogram slepého pokusu s čistým roztokem o obsahu 10 % plasmy bez obsahu oxazepamu. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 18: HPLC chromatogram roztoku plasmy s obsahem oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci a desorpci trvající 10 minut. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)



Obr. č. 19: HPLC chromatogram roztoku plasmy s obsahem oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci a desorpci trvající 2 minuty. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

Typ roztoku	Čas sorpce/desorpce	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace (mg/ml)
vodný	10/10	1441239	1458746	0,01675
	10/10	1476253		
plasmatický	10/10	2418216	2429164	0,02790
	10/10	2440112		
vodný	2/2	3047324	2883751	0,03312
	2/2	2720177		
plasmatický	2/2	2188185	2188539	0,02513
	2/2	2188893		

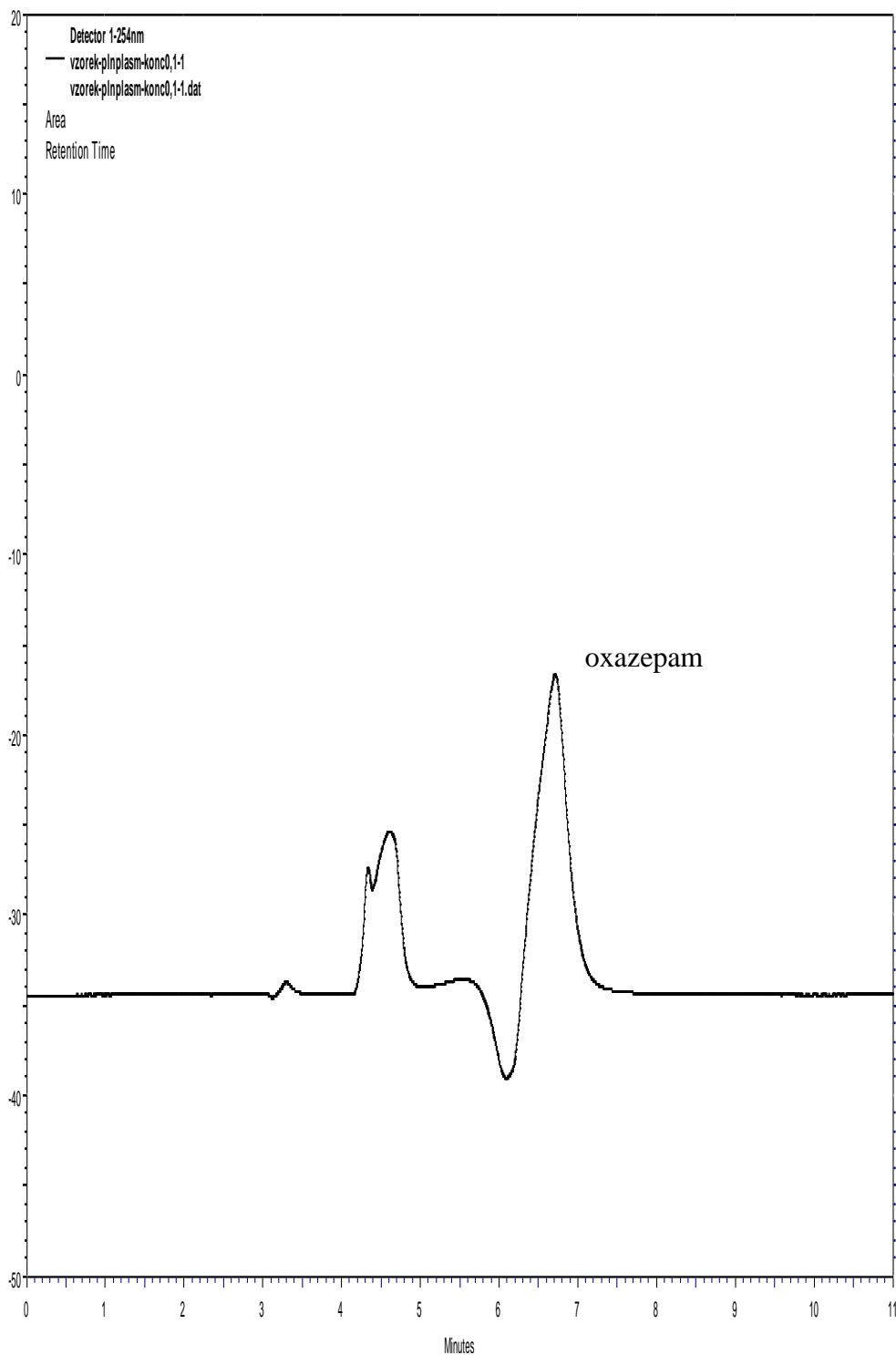
Tab č. 6: Srovnání hodnot výtěžků z vodného roztoku a z roztoku zředěné plasmy při stejných časových schématech

5.3.2 Zjištění výtěžnosti extrakce oxazepamu z plné plasmy

Po úspěšném provedení extrakce oxazepamu ze zředěné plasmy jsem podrobil procesům mikroextrakce pomocí PDMS vlákna roztok oxazepamu o stejné koncentraci jako v předešlém případě (0,1 mg/ml) s tím rozdílem, že obsahoval neředěnou plnou plasmu. Stejně jako v případě zředěné plasmy jsem prováděl extrakci při dvou časových schématech, a sice při trvání sorpce / desorpce 10 / 10 a 2 / 2 minuty. Po HPLC analýze jsem došel ke zjištění, že zde došlo k extrakci zcela minimálního a prakticky zanedbatelného podílu oxazepamu, jehož množství nesneslo srovnání ani s výše uvedenou sekundární desorpcí (viz. Kap. 5.2.4). Vzhledem k tomu, že při analýze extraktu z čisté plasmy nebyly detekovány žádné vedlejší látky, které by byly PDMS vláknem extrahovány, dalo by se předpokládat, že u čisté plasmy je oxazepam vázaný a pro extrakci nepřístupný.

Čas sorpce/desorpce	Plocha	Průměr ploch	Koncentrace (mg/ml)
10/10	454890	447682	0,00514
10/10	440473		
2/2	43268	41815	0,00048
2/2	40362		

Tab č. 7: Hodnoty výtěžků po provedení extrakce oxazepamu z plné plasmy



Obr. č. 20: HPLC chromatogram plné plasmy s obsahem oxazepamu o koncentraci 0,1 mg/ml extrahovaného do čistého methanolu při sorpci a desorpci trvající 10 minut. (Chromatografické podmínky - mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 254 nm)

6. ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabýval analýzou methanolického extraktu oxazepamu získaného speciální metodou mikroextrakce pevnou fází s využitím polydimethylsiloxanového (PDMS) vlákna umožňující extrahovat látky z roztoků o malých objemech. K následné analýze extraktů jsem využil metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Prvotním úkolem tedy bylo stanovit optimální chromatografické podmínky pro analýzu oxazepamu. Za ideální mobilní fází jsem vybral směs methanolu a vody v poměru 80:20 s úpravou hodnoty pH na 7,5. Průtokovou rychlost jsem nastavil na 0,8 ml/min a detekoval při vlnové délce 254 nm. K měření jsem využil kovovou kolonu Separon SGX C18, 150x4 mm I.D., 7 μ m.

Následně jsem zjišťoval koncentraci oxazepamu ve vodném roztoku, jakou je možno extrahovat a následně zanalyzovat. Jako optimální vyšla koncentrace 0,1 mg/ml, kterou jsem následně využil pro všechna další měření. Během nich jsem porovnával různé doby trvání sorpce a desorpce, z nichž se jako ideální pro vodný roztok oxazepamu jeví schéma 2 / 2 minuty. Po primární jsem prováděl i sekundární desorpci o stejném časovém úseku, během jakého byla provedena ta prvotní. Tímto měřením jsem zjistil, že se víceméně celý podíl oxazepamu z vlákna uvolnil již při primární desorpci. Kromě toho jsem se zabýval i možností úpravy pH na 7,5, které však žádnou změnu ve výtěžnosti metody nepřineslo.

Poznatky získané z analýzy extraktu z vodného roztoku jsem využil při následném extrahování oxazepamu z plasmy. Tu jsem tak žádné změně pH nepodroboval a neprováděl již sekundární desorpci, jako časová schémata jsem využil to nejefektivnější (2 / 2 minuty) a nejdelší (10 / 10 minut), ostatními jsem se již nezabýval. U roztoku zředěné plasmy jsem naměřil u delšího časového schématu dokonce větší koncentraci než za stejných podmínek u vodného roztoku, zatímco u kratšího časového schématu byla koncentrace z roztoku plasmy nepatrně nižší.

Stejně tak jsem podrobil mikroextrakci roztok oxazepamu v plné plasmě. Jeho extrakt však při HPLC analýze nevytvořil dostatečný pík a podle výpočtu jsem zjistil, že se v tomto případě extrahovalo jen opravdu zanedbatelné množství oxazepamu. Z analýzy slepého vzorku bez obsahu oxazepamu jsem zjistil, že PDMS vlákno neextrahuje z plasmy žádné vedlejší látky.

7. LITERATURA

- 1.) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie; SNTL; Praha 1985
- 2.) Klimeš J. a kolektiv: Kontrola léčiv I.; Karolinum; Praha 2006
- 3.) Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody; SNTL; Praha 1980
- 4.) Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalytika léků; Avicenum; Praha 1990
- 5.) Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L.: Practical HPLC method development; John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken 1997
- 6.) Pawliszyn J., Pedersen-Bjergaard S.: Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends; J. Chromatogr. Sci. **44**, 2006; str. 290 – 307
- 7.) Pragst F.: Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology; Anal. Bioanal. Chem. **388**, 2007; str. 1393 – 1414
- 8.) Augusto F., Pires Valente A. L.: Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis; Trends Anal. Chem. **21**, 2002; str. 428 – 438
- 9.) Pawliszyn J., Lord H.: Evolution of solid-phase microextraction technology; J. Chromatogr. A **885**, 2000; str. 153 – 193
- 10.) Prosen H., Zupančič-Kralj L.: Solid-phase microextraction; Trends Anal. Chem. **18**, 1999; str. 272 – 282
- 11.) Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie; Galén; Praha; 2007
- 12.) Český lékopis 2005; Grada Publishing; Praha 2005
- 13.) www.biotage.com/graphics/9222.jpg; březen 2009
- 14.) Yuan H., Mester Z., Lord H., Pawliszyn J.: Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Selected Benzodiazepines; J. Anal. Toxicol. **24**, 2000; str. 718 – 725
- 15.) Borges K. B., Freire E. F., Martins I., Bastos de Siqueira M. E. P.: Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma; Talanta **78**, 2009; str. 233 – 241
- 16.) Muchohi S. N., Obiero K., Kokwaro G. O., Ogutu B. R., Githiga I. M., Edwards G., Newton Ch. R. J. C.: Determination of lorazepam in plasma from children by high-performance liquid chromatography with UV detection; J. Chromatogr. B **824**, 2005; str. 333 – 340

- 17.) Mikami E., Goto T., Ohno T., Oka H., Kanamori H.: Simultaneous Analysis of Seven Benzodiazepines in Dietary Supplements as Adulterants Using High Performance Liquid Chromatography and its Application to an Identification System for Diazepam; *J. Health Sci.* **51**, 2005; str. 278 – 283
- 18.) Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: Analysis of oxazepam in urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection by post-column derivatization; *J. Chromatogr.* **616**, 1993; str. 344 – 348
- 19.) Jinno K., Taniguchi M., Hayashida M.: Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1998; str. 1081-1091
- 20.) Aresta A., Monaci L., Zambonin C. G.: Determination of delorazepam in urine by solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 2002; str. 965-972
- 21.) Yuan H., Pawliszyn J.: Application of Solid-Phase Microextraction in the Determination of Diazepam Binding to Human Serum Albumin; *Anal. Chem.* **73**, 2001; str. 4410 – 4416
- 22.) Guan F., Seno H., Ishii A., Watanabe K., Kumazawa T., Hattori H., Suzuki O.: Solid-Phase Microextraction and GC-ECD of Benzophenones for Detection of Benzodiazepines in Urine; *J. Anal. Toxicol.* **23**, 1999; str. 54 – 61
- 23.) Frison G., Tedeschi L., Maietti S., Ferrara S. D.: Determination of midazolam in human plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2001; str. 2497 – 2501

8. SEZNAM ZKRATEK

HPLC – High performance liquid chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SM-HPLC – Semi-microcolumn-high performance liquid chromatography

LC-ESI-MS – Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry

PC – Paper chromatography – Papírová chromatografie

TLC – Thin layer chromatography – Chromatografie na tenké vrstvě

GC – Gas chromatography – Plynová chromatografie

GC-MS – Gas chromatography-mass spectrometry – Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

GC-ECD – Gas chromatography-electron capture detection – Plynová chromatografie s detekcí elektronovým záchytem

SPME – Solid Phase Microextraction – Mikroextrakce tuhou fází

SPE – Solid phase extraction – Extrakce tuhou fází

RP-SPE – Reversed phase-solid phase extraction – Extrakce tuhou fází s reverzní fází

LLE – Liquid-liquid extraction – Extrakce kapalina-kapalina

PDMS - Polydimethylsiloxan

EDTA – Ethylendiamintetraoctová kyselina

GABA – γ -aminomáselná kyselina

PTFE – Polytetrafluorethylen

ABSTRAKT

ANALYTICKÉ HODNOCENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ II.

Úvodní studie do problematiky SPME

Diplomová práce

Martin Raška

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Heyrovského 1203, Hradec Králové

Tato diplomová práce se zabývá problematikou analytického hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií. Konkrétně je zaměřena na hodnocení benzodiazepinů obsažených v biologickém materiálu za užití mikroextrakce tuhou fází (SPME) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). HPLC zaujímá mezi dnes používanými chromatografickými metodami velmi důležitou pozici. Jejimi hlavními přednostmi jsou citlivost, selektivita a rychlost provedení separace a vytvoření reprodukovatelného záznamu. Mikroextrakci tuhou fází lze popsat jako jednoduchou a účinnou techniku přípravy vzorku, která v sobě integruje sorpci, desorpci a zkoncentrování analytu. Tato technika nevyžaduje užití rozpouštědel a složitých aparatur a její podstatou je vystavení kapalného či plynného vzorku malému množství extrakční fáze. Během prováděných pokusů byly jako optimální stanoveny následující chromatografické podmínky. Za mobilní fázi byla použita směs methanol:voda (80:20) o hodnotě $\text{pH} = 7,5$ za průtoku $0,8 \text{ ml/min}$ a detekce pak byla provedena při 254 nm . Pro provedení mikroextrakce bylo použito polydimethylsiloxanové vlákno (PDMS) a koncentrace oxazepamu v analyzovaném vzorku byla $0,1 \text{ mg/ml}$. V případě vodného roztoku vyšlo jako ideální časové schéma sorpce i desorpce trvající shodně 2 minuty, úprava pH nebyla prováděna. Koncentrace extrahovaného oxazepamu byla sledována ve vodných i plasmatických roztocích.

ABSTRACT

ANALYTICAL DETERMINATION OF ACTIVE COMPOUNDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY II.

The Preliminary Study of SPME

Master's Thesis

Martin Raška

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203,
Hradec Králové

This thesis deals with the issue of analytical determination of active compounds by liquid chromatography. It's specifically focused on determination of benzodiazepines in biological material by using solid-phase microextraction (SPME) and high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC is one of the most important chromatographic methods today. Its main advantages are sensitivity, selectivity and speed of separation and creation of reproducible record. SPME can be described as a simple and effective sample preparation technique integrating sorption, desorption and concentration of an analyte. This technique is solvent-free and requires no use of a complicated apparatus. Its basic principle is the exposure of liquid or fluid sample to a small amount of extraction phase. The following chromatographic conditions were proved to be optimal. Methanol:water (80:20) was used as a mobile phase with pH value adjusted to 7.5, flow rate was 0.8 ml/min and detection wavelength was 254 nm. Polydimethylsiloxane fiber (PDMS) was used for the microextraction and concentration of oxazepam in the sample was 0.1 mg/ml. In case of the water sample, 2/2 min sorption/desorption time schedule and no pH adjusting provided the best results. The concentration of extracted oxazepam was measured in water and plasma samples.