

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE VE
FARMACEUTICKÉ ANALÝZE IV.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Tereza Malinová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

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

V Hradci Králové, 15. května 2018

.....

Tereza Malinová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, předání zkušeností, obětavost, cenné rady a věnovaný čas po celou dobu vypracování mé práce. Dále bych chtěla všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za pomoc a vstřícné jednání.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 KVETIAPIN A JEHO VLASTNOSTI	10
3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti	10
3.1.2 Farmakologické vlastnosti.....	12
3.1.3 Klinické údaje.....	14
3.2 ZOLPIDEM A JEHO VLASTNOSTI	15
3.2.1 Vzorec a chemické vlastnosti	15
3.2.2 Farmakologické vlastnosti.....	16
3.2.3 Klinické údaje.....	17
3.3 RISPERIDON A JEHO VLASTNOSTI.....	18
3.3.1 Vzorec a chemické vlastnosti	18
3.3.2 Farmakologické vlastnosti.....	20
3.3.3 Klinické údaje.....	20
3.4 LAMOTRIGIN A JEHO VLASTNOSTI	22
3.4.1 Vzorec a chemické vlastnosti	22
3.4.2 Farmakologické vlastnosti.....	23
3.4.3 Klinické údaje.....	24
3.5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	25
3.5.1 Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie	25
3.5.2 Instrumentace kapalinového chromatografu	27
3.5.3 Způsoby separace	28
3.5.4 Stacionární fáze	33
3.5.5 Systémy detekce	40
3.5.6 Hodnotící parametry analýzy	46
3.5.7 Úprava biologického vzorku před analýzou.....	50
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53

4.1	CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, POMŮCKY	53
4.1.1	Chemikálie.....	53
4.1.2	Chromatografická sestava	54
4.1.3	Přístroje.....	54
4.1.4	Pomůcky	54
4.2	POSTUPY PŘÍPRAVY ROZTOKŮ	56
4.2.1	Příprava vzorků	56
4.2.2	Příprava tlumivých roztoků	56
4.2.3	Příprava mobilní fáze	57
4.2.4	Příprava roztoků pro úpravu pH plazmy	58
4.2.5	Příprava plazmy, deproteinace a LLE	59
4.3	OPTIMALIZACE PODMÍNEK SEPARACE	60
4.3.1	Chromatografické podmínky	60
4.3.2	Vývoj chromatografických podmínek	60
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	61
5.1	RETENČNÍ CHOVÁNÍ PŘI PH 5,7	61
5.2	RETENČNÍ CHOVÁNÍ PŘI PH 10,0	63
5.3	VYBRANÉ ANALYTY	64
5.4	DETEKCE.....	65
5.5	RETENČNÍ CHOVÁNÍ VYBRANÝCH ANALYTŮ	66
5.6	ANALÝZA Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PŘI PH 2,8.....	70
5.7	PARAMETRY VALIDACE	74
5.7.1	Selektivita	74
5.7.2	Limit detekce a limit kvantifikace	75
5.7.3	Linearita.....	75
5.7.4	Přesnost.....	77
5.8	ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ	79
6.	ZÁVĚR.....	82
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	83
8.	POUŽITÁ LITERATURA	85

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Tereza Malinová

Školitel: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze IV.

V rámci diplomové práce bylo testováno retenční chování léčiv za použití extrémních pH mobilních fází na koloně Kinetex EVO C18 (150×3 mm). Byly testovány mobilní fáze s pH 2,8; 5,7 a 10,0 s různým zastoupením organické a vodné fáze. Mezi testované látky byla zařazena tato léčiva: kvetiapin a jeho metabolity 7-hydroxykvetiapin a norkvetiapin, zolpidem, aciklovir, klotrimazol, diklofenak, methformin a jejich nečistoty, risperidon a lamotrigin. Pro další testování byla vybrána léčiva kvetiapin, zolpidem, risperidon a lamotrigin při použití mobilní fáze s MeOH, ACN a fosforečnanovým pufrům pH 2,8 v poměru 5:15:80, v/v. Průtok byl nastaven na 1 ml/min s teplotou 26 °C na koloně. Byly hledány vlnové délky s nejlepší citlivostí v UV oblasti detekce. Nejlepší citlivosti bylo dosaženo při 210 nm a 240 nm. Z několika zkoušených látek byl vybrán jako vnitřní standard medazepam, který se eluoval za posledním analytem. Pro analýzu z biologického materiálu byla testována deproteinace a liquid-liquid extrakce. LLE byla pro svou vyšší výtěžnost účinnější. U metody byly testovány vybrané validační parametry (selektivita, limit kvantifikace, limit detekce, linearita a přesnost). Metoda byla aplikována na analýzu reálných vzorků.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Tereza Malinová

Tutor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Title of Thesis: Use of Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis IV.

In this diploma thesis the retention behaviour of drugs using extreme pH of mobile phases on column Kinetex EVO C18 (150×3,0 mm) was tested. Mobile phases with pH 2,8; 5,7 and 10,0 were tested with various organic and aqueous phases. The following drugs were included among the test substances: quetiapine and its metabolites 7-hydroxyquetiapine and norquetiapine, zolpidem, aciclovir, clotrimazole, diclofenac, metformin and their impurities, risperidone and lamotrigine. For further testing the quetiapine, zolpidem, risperidone and lamotrigine were chosen using the mobile phase with MeOH, ACN and phosphate buffer solution pH 2.8 in ratio 5:15:80. The flow was set to 1 ml/min with the temperature of column 26 °C. Wavelengths with the best sensitivity in UV detection area were looking for. The best sensitivity was achieved at 210 nm and 240 nm. We were also looking for a suitable internal standard. From several used compounds was chosen medazepam as internal standard, which was eluted behind the last peak. The deproteinization and liquid-liquid extraction were tested for the analysis of biological material. Liquid-liquid extraction was more efficient for its higher yield. Selected parameters of validation (selectivity, limit of quantification, limit of detection, linearity and precision) were used. The method was applied to the analysis of real samples.

1. ÚVOD

Kvetiapin je léčivo patřící mezi atypická antipsychotika. Je používán v léčbě schizofrenie a u manických a depresivních poruch. V játrech je metabolizován na několik metabolitů. Farmakodynamicky aktivní je norkvetiapin a 7-hydroxykvetiapin.

Zolpidem lze zařadit mezi nebenzodiazepinová hypnotika používaná ke krátkodobé léčbě nespavosti. Terapie by neměla přesáhnout čtyři týdny. U zolpidemu hrozí riziko vzniku tolerance a závislosti.

Risperidon patří do skupiny atypických antipsychotik. Je určen k léčbě schizofrenie. Nejčastějším nežádoucím účinkem je parkinsonismus či sedace.

Lamotrigin je léčivo patřící mezi antiepileptika. Používá se v léčbě epilepsie a při prevenci epizod poruch nálady u bipolární poruchy.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je důležitou metodou pro hodnocení účinnosti, bezpečnosti a kvality léčiv. Nabízí široké využití ve farmaceutické analýze, např. při identifikaci léčiv, stanovení obsahu, určení čistoty nebo při terapeutickém monitorování léčiv. Je používání ve výzkumu, vývoji, výrobě léčiv a pro separaci a identifikaci látek. Mezi výhody HPLC patří malé množství analyzovaného vzorku, rychlost provedení, citlivost stanovení, možnost automatizace či hodnocení separovaných složek kvantitativně a kvalitativně.

Oblíbenými stacionárními fázemi jsou fáze s kombinací anorganického silikagelu a organického organosilanu. Mezi ně patří kolona Kinetex EVO C18. Nabízí možnost měření při rozsahu pH 1 – 12 bez ztráty životnosti. Zachovává si vysokou citlivost, rozlišení, ostré píky a umožňuje zkrátit dobu analýzy.

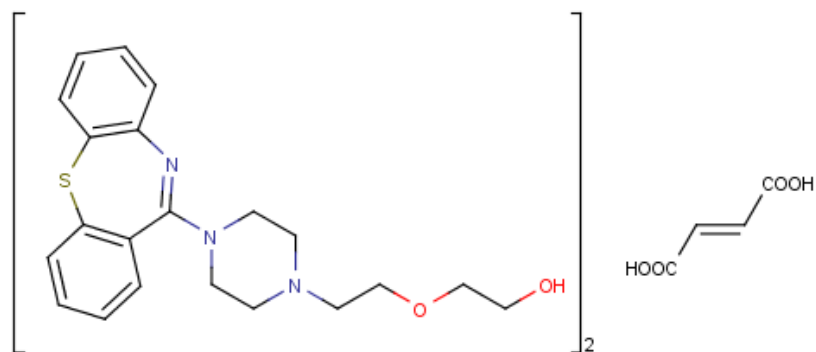
2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo sledování retenčního chování vybraných analytů a nalezení vhodných podmínek pro jejich separaci v extrémních podmínkách pH s využitím kolony Kinetex EVO C18 pomocí HPLC. Byl zkoumán vliv tlumivého roztoku s hodnotami pH 5,7; 10,0 a 2,8 v mobilních fázích s různým zastoupením organické fáze. Bylo nutné najít vhodný vnitřní standard pro kvantifikaci. U vybraných látek byly hledány nejvhodnější podmínky úpravy plazmy pomocí LLE, resp. deproteinace. Získané výsledky byly aplikovány na separaci reálného vzorku s obsahem lamotriginu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kvetiapin a jeho vlastnosti

3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Obrázek 1 Vzorec kvetiapin-fumarát ⁽⁵⁾

Molekulová hmotnost (Mr): 883,10 g/mol

Sumární vzorec: C₄₆H₅₄N₆O₈S₂

Systematický název: bis(2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol)-(2*E*)-but-2-endionát

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % kvetiapin-fumarátu a 12,5 % až 13,8 % kyseliny fumarové, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Představuje bílý nebo téměř bílý prášek, který je těžce rozpustný ve vodě, v bezvodém etanolu a metanolu. Je polymorfní. ⁽¹⁾

Zkoušky totožnosti:

Infračervená absorpční spektrofotometrie – spektra zkoušené látky v pevném stavu, anebo spektra zkoušené látky rozpuštěné v *metanolu R* a následně odpařené do sucha se porovnávají se spektrem *kvetiapin fumarátu CRL*.

Zkoušky na čistotu

- Kapalinová chromatografie
- Síranový popel
- Ztráta sušením

Stanovení obsahu

Kvetiapin-fumarát se rozpustí v kyselině octové bezvodé R a provede se titrace kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS a bod ekvivalence zjistíme potenciometrií. Naopak kyselinu fumarovou rozpustíme ve stejných objemových dílech methanolu R a vody R. Titrujeme hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

Nečistoty

- 2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethyl-acetát
- 11-(piperazin-1-yl)dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethyl-2-[4(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]acetát
- 11,11'-(piperazin-1,4-diyl)bis(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 11,11'-[ethylenbis(oxyethylenpiperazin-4,1-diyl)]bis(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin)
- {2-[(2-aminofenyl)sulfanyl]fenyl} {4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-yl} methanon
- dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11(10*H*)-on
- 4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)-1-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-oxid
- 2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethan-1-ol
- 2-[2-(2-{2-[4-dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl]piperazin-1-yl]ethoxy}ethoxy)ethoxy]ethan-1-ol

- N-{2-[(2-{4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-karbonyl} fenyl)sulfanyl] fenyl}acetamid
- 2-{2-[4-(9-chlordibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 2-{2-[4-(2-{2-[4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl]ethoxy{ethyl)piperazin-1yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-(4-{2-[2-(trifenylmethoxy)ethoxy]ethyl}piperazin-1-yl)dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 11-(4-ethylpiperazin-1-yl)dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- 4-(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)-1,1-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-ium
- 2-{2-[4-(5-oxo-5 λ^4 -dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl-piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-morfolinodibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin
- dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-amin
- 2-{2-[4-(fenanthridin-6-yl)piperazin-1-yl]ethoxy}ethan-1-ol
- 11-[4-(2-{2-[(dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl)oxy]-ethoxy}ethyl)piperazin-1yl]dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin ⁽¹⁾

3.1.2 Farmakologické vlastnosti

3.1.2.1 Farmakodynamické vlastnosti

Kvetiapin se řadí do skupiny atypických antipsychotik (neuroleptik). Jedná se o multireceptorového antagonistu (MARTA – multi acting receptor targeted agents). K nim se řadí deriváty dibenzothiazepinů 2. generace, jež se používají k léčbě schizofrenie. Kvetiapin antagonizuje dopaminové D₁ a D₂ receptory. ^(2, 3, 4, 6)

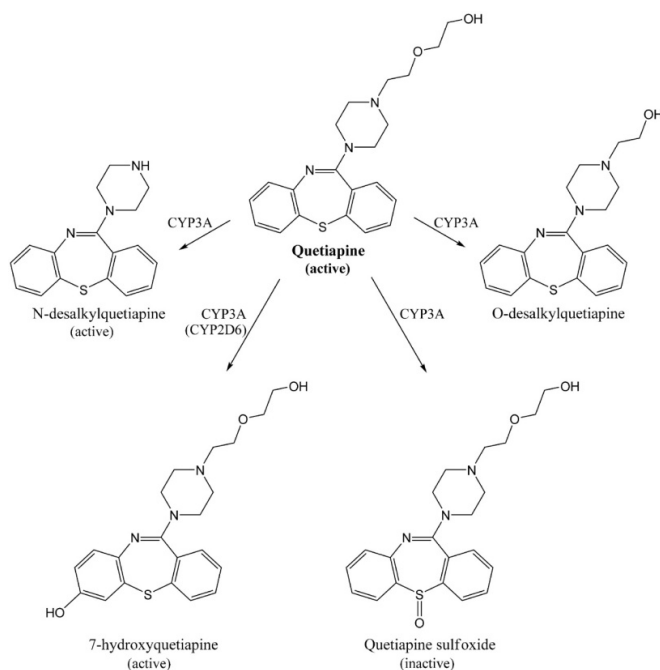
Mechanismus účinku

Kvetiapin a jeho aktivní metabolit v lidské plazmě norkvetiapin interagují se širokou řadou neurotransmitterových receptorů. Kvetiapin a norkvetiapin antagonizují jak serotoninové (5-HT₂), tak dopaminové D₁ a D₂ receptory. ⁽⁴⁾

3.1.2.2 Farmakokinetické účinky

Kvetiapin je možné podat perorálně ve formě tablet a tablet s prodlouženým uvolňováním.

Po perorálním podání se kvetiapin dobře vstřebává. Biologická dostupnost není výrazně ovlivněna po podání s jídlem. V játrech se kvetiapin intenzivně metabolizuje na norkvetiapin. Při výzkumech prováděných *in vitro* bylo zjištěno, že hlavním enzymem CYP 450 podílejícím se na metabolizaci kvetiapinu je CYP3A4.



Obrázek 2 Metabolismus kvetiapinu ⁽⁷⁾

3.1.3 Klinické údaje

3.1.3.1 Indikace

Indikace kvetiapinu je léčba schizofrenie, ale je také používán v léčbě bipolární poruchy, zejména pak u manických a depresivních epizod. Mezi příznaky schizofrenie se řadí bludy (poruchy myšlení) a halucinace (poruchy vnímání), změny chování, zmatenost, pocity osamělosti. U manických a depresivních poruch se jedná o střídání radostné a smutné nálady. ⁽⁶⁾

3.1.3.2 Kontraindikace

Pacient by neměl užívat léčivou látku, pokud se u něj projeví přecitlivělost na účinnou látku. Rovněž podávání inhibitorů CYP 450 podtypu 3A4 (například inhibitory HIV-proteáz, klarithromycin, azolová antimykotika) je kontraindikováno. Látky, které tlumí CNS, se také řadí do kontraindikací kvetiapinu. Kvůli vysokému počtu nežádoucích účinků se nedoporučuje podávat dětem a dospívajícím do 18 let. ^(3,4,6)

3.1.3.3 Interakce

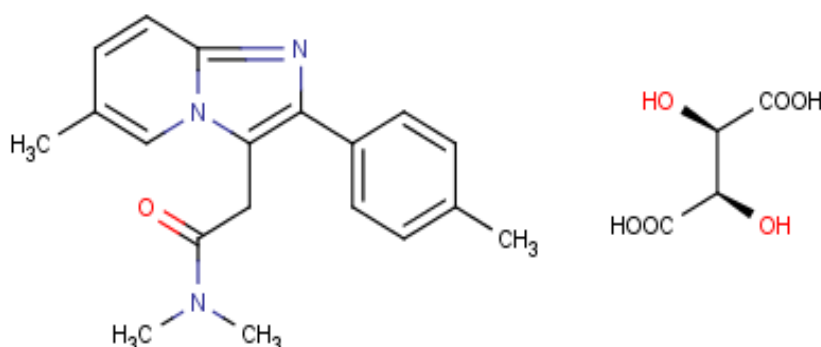
Snížení plazmatických hladin u kvetiapinu můžeme pozorovat při souběžném užívání silných induktorů jaterních enzymů, jako jsou například antiepiletika fenytoin a karbamazepin, může dojít ke snížení účinnosti léčby kvetiapinem. Současné podávání kvetiapinu a inhibitorů CYP3A4 je kontraindikováno. ^(3,6)

3.1.3.4 Nežádoucí účinky

Kvetiapin je léčivou látkou s velmi často se vyskytujícími nežádoucími účinky, mezi něž patří například útlum, ospalost, bolesti hlavy, závratě, sucho v ústech, zvýšení hladiny triglyceridů v séru a rovněž zvýšení hladiny celkového cholesterolu (přednostně LDL cholesterolu), zvýšení tělesné hmotnosti, snížení hladiny HDL cholesterolu a extrapyramidové poruchy. Také se může často vyskytovat hyperprolaktinémie, u mužů sexuální poruchy, u žen poruchy menstruace, zácpa, ortostatická hypotenze, zvýšená chuť k jídlu a tachykardie. ^(3,6)

3.2 Zolpidem a jeho vlastnosti

3.2.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Obrázek 3 Vzorec zolpidem tartrát ⁽⁸⁾

Molekulová hmotnost (Mr): 764,88 g/mol

Sumární vzorec: C₄₂H₄₈N₆O₈

Systematický název: bis{*N,N*-dimethyl-2-(4-methylfenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]acetamid} (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutandionát

Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny C₄₂H₄₈N₆O₈, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Představuje bílý nebo téměř krystalický prášek s hygroskopickými vlastnostmi. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně v methanolu a v dichlormethanu je prakticky nerozpustný.

Zkoušky totožnosti

Infračervená absorpční spektrofotometrie – spektra zkoušené látky po úpravě v porovnání se spektrem *zolpidem-tartarátu CRL*.

Tenkovrstvá chromatografie

Zkoušky na čistotu

- Vzhled roztoku
- Kapalinová chromatografie
- Síranový popel
- Semimikrostanovení vody

Stanovení obsahu

Zolpidem – titrace kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

Nečistoty

- N,N-dimethyl-2-[7-methyl-2-(4-methylfenyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]acetamid ⁽¹⁾

3.2.2 Farmakologické vlastnosti

3.2.2.1 Farmakodynamické vlastnosti

Zolpidem se řadí mezi hypnotika nebenzodiazepinového typu a jeho hlavní indikací je krátkodobá léčba insomnie u dospělých, které nespavost vyčerpává nebo se cítí rozrušení. Mezi velmi frekventované projevy můžeme zařadit obtížné usínání, brzké ranní probouzení nebo časté probouzení, kdy je kontinuita spánku výrazně narušena. Sůl zolpidemu, tartrát, vykazuje afinitu k podtypu receptoru omega-1. Tento podtyp odpovídá receptoru GABA-A obsahující alfa-1 subjednotku. Prostřednictvím tohoto receptoru vede modulace chloridových iontů k sedativním účinkům, které právě vykazuje zolpidem. Hypnotika jsou určena pro krátkodobou terapii, neboť hrozí riziko vzniku tolerance a závislosti. ^(2, 6, 9)

Mechanismus účinku

Zolpidem tartrát se řadí mezi imidazopyridinové deriváty. Váže se na benzodiazepinové místo receptoru GABA-A v mozku a vykazuje selektivní afinitu k podtypu benzodiazepinových receptorů (omega-1). Nástup účinku perorálně podaného zolpidemu je rychlý, ale má pouze krátké trvání (cca 2 hodiny). ^(10, 11)

3.2.2.2 Farmakokinetické účinky

Zolpidem lze podávat perorálně ve formě potahovaných tablet. Metabolizace zolpidemu probíhá některými enzymy cytochromu P450. Nejčastěji se jedná o CYP3A4. U zolpidemu nejsou přítomny farmakologicky aktivní metabolity. ^(6, 9)

3.2.3 Klinické údaje

3.2.3.1 Indikace

Zolpidem se řadí mezi široce předepisovaná léčiva. U dospělých je indikován ke krátkodobé terapii nespavosti. Terapie zolpidemem by neměla přesáhnout čtyři týdny. Nástup účinky u zolpidemu je rychlý, proto by se měl užívat bezprostředně před ulehnutím. ⁽⁹⁾

3.2.3.2 Kontraindikace

Mezi kontraindikovaná onemocnění lze zařadit těžkou poruchu funkce jater, myastenii gravis, syndrom spánkové apnoe a akutní a/nebo těžkou respirační nedostatečnost. ⁽⁹⁾

3.2.3.3 Interakce

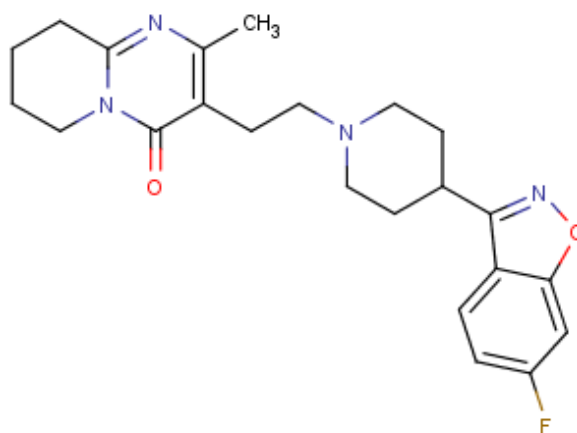
Se zvýšenou opatrností je nutné podávat další psychoaktivní přípravky. Není doporučeno užívat zolpidem s alkoholem, protože může být zvýšen sedativní účinek. Stejně tak je tomu u látek tlumících CNS. Kombinace se silným induktorem CYP3A4 (např. rifampicin), vede ke snížení plazmatických koncentrací zolpidemu. Na druhou stranu při současném užívání silného inhibitoru CYP3A4 (např. ketokonazol) lze očekávat zvýšení sedativních účinků. ⁽⁹⁾

3.2.3.4 Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky se objevují v závislosti na citlivosti jedince a v závislosti na době užití tablety. Mezi často se vyskytující nežádoucí účinky lze zařadit infekce horních a dolních dýchacích cest, bolesti zad, noční můry a halucinace. Mezi poruchy nervového systému jakožto nežádoucí účinky můžeme zahrnout bolesti hlavy, závratě, zesílení nespavosti. ⁽⁹⁾

3.3 Risperidon a jeho vlastnosti

3.3.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Obrázek 4 Vzorec risperidonu ⁽¹²⁾

Molekulová hmotnost (Mr): 410,49 g/mol

Sumární vzorec: C₂₃H₂₇FN₄O₂

Systematický název: 3-{2-[4-(6-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl}-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-on

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny risperidonu, počítáme na vysušenou látku

Vlastnosti

Risperidon je prakticky nerozpustný ve vodě, ovšem snadno rozpustný v dichlormethanu a mírně se rozpouští v etanolu 96%. Sloučenina představuje bílý nebo téměř bílý prášek a je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

Infračervená absorpční spektrofotometrie – spektra zkoušené látky se porovnají se spektrem *risperidonem CRL*.

Zkoušky na čistotu

- Příbuzné látky
- Vzhled roztoku
- Ztráta sušením

- Síranový popel

Stanovení obsahu

Risperidon – titrace *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace ekvivalenčního bodu.

Nečistoty

- 3-[2-(4-{{(2,4-difluorfenyl)}[(E)-hydroxyimino]methyl}}-piperidin-1-yl)ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-[2-(4-{{(2,4-difluorfenyl)}[(Z)-hydroxyimino]methyl}}-piperidin-1-yl)ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-[2-(4-{{(2,4-difluorfenyl)}[(Z)-hydroxyimino]methyl}}-piperidin-1-yl)ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-{{2-[4-(5-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl}}-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- (6*RS*)-3-{{2-[4-(6-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl}}-2,6-dimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido-[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- [2-(2-methyl-4-oxo-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-3-yl)ethyl]-4-(6-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-karboxylát
- 3-{{2-[4-(2,4-difluorbenzoyl)piperidin-1-yl]ethyl}}-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-[2-(4-{{4-fluor-2-[4-(6-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)-piperidin-1-yl]benzoyl}}piperidin-1-yl)ethyl]-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-{{2-[4-({4-fluor-2-[4-(6-fluor-1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]fenyl}}[(Z)-hydroxyimino]methyl)piperidin-1-yl]ethyl}}-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on
- 3-{{2-[4-(1,2-benzoxazol-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl}}-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on (defluorrisperidon)

- 3-(2-chlorethyl)-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-4*H*-pyrido[1,2-*a*]pyrimidin-4-on (piperidopyrimidinový meziprodukt)
- 6-fluor-3-(piperidin-4-yl)-1,2-benzoxazol⁽¹⁾

3.3.2 Farmakologické vlastnosti

3.3.2.1 Farmakodynamické vlastnosti

Risperidon se řadí mezi atypická antipsychotika používaná k léčbě schizofrenie. Konkrétně můžeme risperidon zařadit mezi serotoninové a dopaminové antagonisty (SDA – serotonin dopamine antagonists). Vykazuje afinitu k 5-HT₂ a D₂-receptorům. Blokuje také α₁-adrenergní receptory. Ovlivňuje i negativní příznaky schizofrenie.^(2, 6)

Mechanismus účinku

Risperidon má vysokou afinitu k serotoninergním 5-HT₂ a dopaminergním D₂-receptorům. Váže se také na α₁-adrenergní receptory, s menší afinitou pak k histaminovým H₁-receptorům a k adrenergním α₂-receptorům.^(2,6)

3.3.2.2 Farmakokinetické účinky

Risperidon je po perorální aplikaci plně absorbován. U risperidonu se vyskytuje značné množství aktivních metabolitů. Cytochromem CYP2D6 je risperidon metabolizován na 9-hydroxy-risperidon. Další cestou metabolizace je N-dealkylace. Risperidon je vylučován zejména močí, méně pak stolicí. Výskyt některých účinků jako například mírné extrapyramidové účinky, zvýšení prolaktinémie, přítomnost ortostatické hypotenze a sedace se může objevit u pacientů s vyšším dávkováním.^(2, 6)

3.3.3 Klinické údaje

3.3.3.1 Indikace

Indikace risperidonu je relativně široká. Může být indikován v léčbě schizofrenie, u středně těžkých až těžkých manických poruch při bipolární poruše, ale také je indikován v krátkodobé léčbě agrese u pacientů s Alzheimerovou chorobou.⁽¹³⁾

3.3.3.2 Kontraindikace

Risperidon je kontraindikován jen v tom případě, když je pacient hypersenzitivní na pomocné látky a účinnou látku. ⁽¹³⁾

3.3.3.3 Interakce

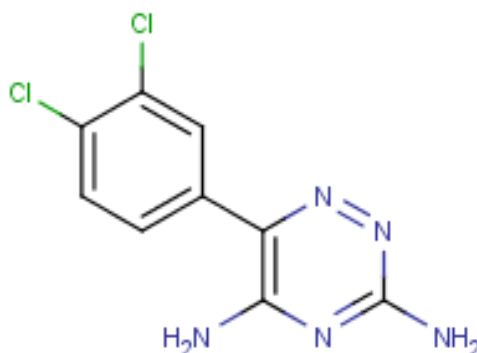
Při předepisování risperidonu jakožto atypického antipsychotika je nutné věnovat pozornost léčivým látkám, které prodlužují QT interval. Mezi taková léčiva se řadí antiarytmika (např. chinidin, propafenon, amiodaron), tricyklická a tetracyklická antidepresiva, jiná antipsychotika, přípravky způsobující poruchu elektrolytové rovnováhy, bradykardii a v neposlední řadě přípravky inhibující metabolismus risperidonu v játrech. Centrálně účinkující látky v kombinaci s risperidone je nutno užívat s opatrností. Hrozí zde riziko zvýšené sedace. Induktory jaterních enzymů CYP3A4 a P-glykoproteinu (např. rifampicin, fenobarbital, fenytoin) mohou snížit plazmatické koncentrace účinné frakce risperidonu. Naopak inhibitory jaterních enzymů CYP2D6 (např. paroxetin a fluoxetin) mohou svým působením zvýšit plazmatickou koncentraci risperidonu. ⁽¹³⁾

3.3.3.4 Nežádoucí účinky

Při dlouhodobém užívání se objevují nejčastěji nežádoucí účinky jako je parkinsonismus, bolesti hlavy, nespavost, sedace nebo snížená bdělost. Často se také objevuje hyperprolaktinémie, která může vést až ke gynekomastii a menstruačním potížím. Dále se často vyskytuje zvýšení tělesné hmotnosti, dyskineze, závratě, hypertenze, břišní diskomfort, vyrážka, svalové spasmy a inkontinence moči. ^(2, 13)

3.4 Lamotrigin a jeho vlastnosti

3.4.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Obrázek 5 Vzorec lamotriginu ⁽¹⁴⁾

Molekulová hmotnost (Mr): 256,09 g/mol

Sumární vzorec: C₉H₇Cl₂N₅

Systematický název: 6-(2,3-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-3,5-diamin

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % lamotriginu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Lamotrigin je bílý nebo téměř bíle zbarvený prášek, který je bez chuti a zápachu.

Ve vodě je velmi těžce rozpustný, v bezvodém ethanolu těžce rozpustný. ⁽¹⁾

Zkoušky totožnosti

- Infračervená absorpční spektrofotometrie

Zkoušky na čistotu

- Kapalinová chromatografie
- Ztráta sušením
- Síranový popel

Stanovení obsahu

Lamotrigin se rozpustí v *kyselině octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence.

Nečistoty

- 3-amino-6-(2,3-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-5(4*H*)-on
- (*E*)-[2-(diaminomethyliden)hydrazono](2,3-dichlorfenyl)acetonitril
- (2*Z*)-[2-(diaminomethyliden)hydrazono](2,3-dichlorfenyl)acetonitril
- 6-(2,3-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-3,5(2*H*,4*H*)-dion
- Kyselina 2,3-dichlorbenzoová
- *N*-[5-amino-6-(2,3-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-3-yl]-2,3-dichlorbenzamid
- 6-(2,4-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-3,5-diamin ⁽¹⁾

3.4.2 Farmakologické vlastnosti

3.4.2.1 Farmakodynamické vlastnosti

Lamotrigin patří mezi látky používané jako přídatná léčba epilepsie nebo monoterapie epilepsie. Epilepsie je definována jako opakující se záchvaty přechodné mozkové dysfunkce, kdy tento stav je podmíněn excesivními výboji mozkových neuronů jak parciálně, tak generalizovaně. Druhou indikací lamotriginu je prevence epizod poruch nálady u pacientů s bipolární poruchou. Klinickými projevy epilepsie jsou poruchy vědomí, psychické příznaky, somatosenzorické příznaky, vegetativní příznaky a abnormální motorická aktivita. Podstatou účinku lamotriginu je stabilizace membrán neuronů. Lamotrigin se svou strukturou liší od ostatních léčiv s antiepileptickým účinkem. ^(2, 6, 15)

Mechanismus účinku

Lamotrigin blokuje napětově řízené sodíkové kanály. Pravděpodobně výrazněji působí na presynaptické sodíkové kanály glutamátergních neuronů a tím snižuje uvolňování kyseliny glutamové jakožto excitačního neurotransmiteru. Lamotrigin blokuje rychle opakované výboje akčních potenciálů na neuronech. ^(16, 17, 18)

3.4.2.2 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání probíhá absorpce lamotriginu rychle a beze zbytku ve střevě. Metabolismus lamotriginu probíhá přes enzym UDP-glukuronyltransferázu. Nelze vyloučit, že metabolismus lamotriginu je v menší míře závislý na dávce. Glukuronidované metabolity se vylučují do moče. ⁽¹⁵⁾

3.4.3 Klinické údaje

3.4.3.1 Indikace

Lamotrigin se uplatňuje v monoterapii i v kombinované farmakoterapii epilepsie. Epilepsii je nutno léčit i desítky let. Nejčastěji je lékem volby při částečných záchvatech a záchvatech se sekundární generalizací. ^(2, 15)

3.4.3.2 Kontraindikace

U pacientů, kteří trpí přecitlivělostí na účinnou látku nebo jinou složku přípravku, je lamotrigin kontraindikován. ⁽¹⁵⁾

3.4.3.3 Interakce

U samotného lamotriginu není prokázána významná indukce či inhibice jaterních enzymů. Mezi lékové interakce lamotriginu lze zařadit valproát, který zde vystupuje jako inhibitor jaterních enzymů. Mezi léčivé látky, které významně indukují jaterní enzymy lamotriginu patří např. fenytoin, fenobarbital, karbamazepin, rifampicin. Tyto léčivé látky urychlují metabolismus lamotriginu a při kombinaci antiepileptik je třeba podávat vyšší dávky. ^(15, 16)

3.4.3.4 Nežádoucí účinky

Nejčastěji se vyskytujícími nežádoucími účinky při léčbě epilepsie jsou bolesti hlavy, závratě, nevolnosti, zvracení, ale může se také vyskytnout rozmazané vidění a kožní vyrážka. Často pacienti trpí průjmem, zvracením, agresivitou, únavou, podrážděností a ospalostí. Je třeba zmínit se idiosynkratické reakci. Jakmile jsou správně dodržována titrační schémata a dávky, vyhneme se tak závažným kožním reakcím, jako je např. Stevens-Johnsonův syndrom či toxická epidermální nekrolýza. ^(15, 16)

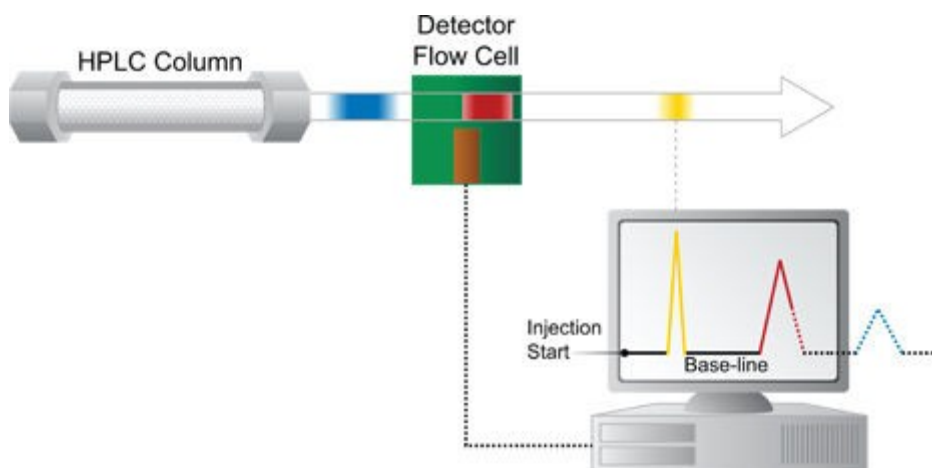
3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – *High performance liquid chromatography* (HPLC) představuje jednu z nejprogresivněji se vyvíjejících analytických metod. Je nejčastěji využívána ve všech oblastech farmaceutické analýzy, ať už ve výzkumu, vývoji či výrobě léčiv, je používána při stanovení čistoty, obsahu a při stanovení totožnosti. Dalšími oblastmi využití je analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu, monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách či stabilitní studie.

Mezi hlavní výhody HPLC patří kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, citlivost stanovení, selektivita, univerzálnost, automatizace a v poslední řadě také rychlost a malá spotřeba vzorku analytu. ^(17, 18, 19)

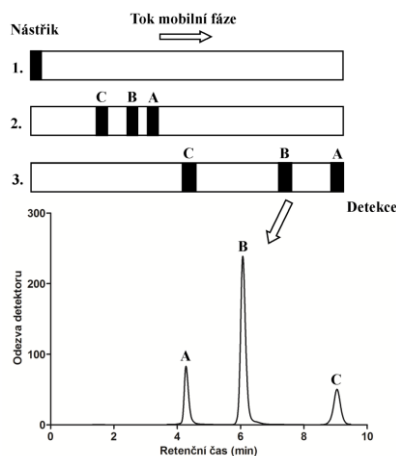
3.5.1 Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie

HPLC je fyzikálně-chemická metoda, která se využívá k rozdělení směsi látek. Chromatografická separace je založena na rozdílné afinitě analytů k pohyblivé (mobilní) a nepohyblivé (stacionární) fázi. Vzorek směsi substancí je vstřikován do proudu pohyblivé fáze a je jím unášen ke stacionární fázi pomocí vysokotlakého čerpadla. Stacionární fázi představuje kolona naplněná vhodným sorbentem. Složky směsi mohou volně interagovat s oběma fázemi. Analyty, které slabě interagují se stacionární fází, jsou vymyty (eluovány) z kolony v kratším čase. Jestliže jsou složky směsi na koloně zadržovány silnějšími interakcemi, nedochází k tak rychlému vymytí z kolony. K separaci dochází tehdy, když se interakce složek směsi se stacionární fází liší a to vede k eluci v různých časových intervalech. Po průchodu kolonou je analyt detekován a signál je převeden do podoby gausovských křivek - píků, které se objeví na chromatogramu. Plocha píku je závislá na koncentraci analytu.



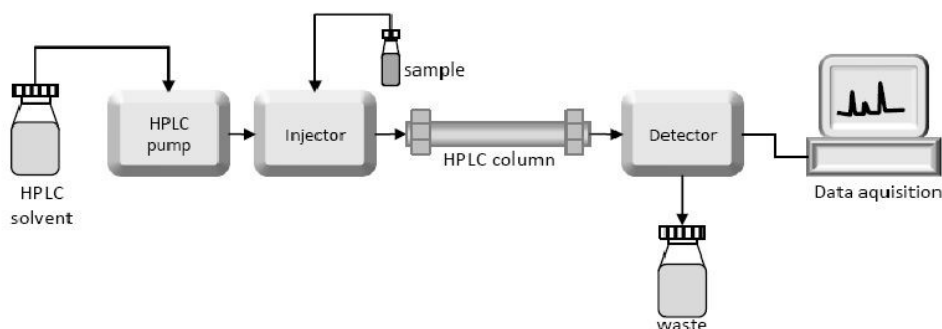
Obrázek 6 Záznam píků ⁽²²⁾

Separace a vymývání jednotlivých složek směsi je ovlivněna jak charakterem mobilní fáze, tak charakterem stacionární fáze. Jestliže se při eluci použije mobilní fáze o konstantním složení, jedná se o isokratickou eluci. Naopak při gradientové eluci se složení mobilní fáze programově mění. Isokratickou eluci lze použít při separaci látek, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Gradientovou eluci uplatníme při separaci složek s výrazně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. ^(17, 18, 19, 20, 21, 23)



Obrázek 7 Princip separace ⁽¹⁷⁾

3.5.2 Instrumentace kapalinového chromatografu



Obrázek 8 Základní schéma HPLC ⁽¹⁸⁾

Vysvětlivky: *HPLC solvent* – zásobník mobilní fáze, *HPLC pump* – vysokotlaké čerpadlo, *Injector* – dávkovač vzorku, *sample* – vzorek, *HPLC column* – chromatografická kolona, *Detector* – detekční zařízení, *waste* – odpad, *Data acquisition* – datová stanice (počítač)

Na obrázku č. 8 je schematicky znázorněna instrumentace systému HPLC. Přístrojové vybavení chromatografu se skládá ze zásobníku mobilní fáze (*HPLC solvent*) a čerpadla (*HPLC pump*), které pomocí vysokého tlaku distribuuje mobilní fázi přes kolonu do detektoru. Předtím, než mobilní fáze vstoupí do chromatografického systému, se provádí odplynění mobilní fáze pomocí odplyňovače (*Degasser*). V zásobnících mobilní fáze je umístěn speciální filtr z kovu nebo teflonu a slouží k zachycení tuhých částic před vstupem do systému. Nedílnou součástí systému je automatický dávkovač, resp. autosampler (*Injector*), který je spojen se zásobníkem vzorků (*samples*), ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky). Vialky se vzorky jsou uzavřeny septem z pryže nebo polypropylenovou zátkou. Funkcí autosampleru je nadávkovat a nastříkat vzorky o objemu 1 – 100 μl do proudu mobilní fáze, který je veden do chromatografické kolony (*HPLC column*). V chromatografické koloně dochází k separaci analyzované směsi na jednotlivé složky. Ty jsou poté unášeny mobilní fází do detektoru (*Detector*). Detektor zaznamenává rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s obsahem eluované složky. Tento rozdíl je převáděn na elektrický signál. Získaná data jsou pak přenášena do počítače (*Data acquisition*). Funkcí počítače je především sběr a zpracování signálů z detektoru, interpretace výsledných dat a nepochybně řízení chodu chromatografu. ^(19, 20, 21, 22, 23, 24)

3.5.3 Způsoby separace

Mezi základní separační módy HPLC patří systémy na normálních fázích (NP-HPLC), systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC), molekulová vylučovací chromatografie (SEC), iontově výměnná chromatografie (IEC). Dalšími způsoby jsou hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) a chirální chromatografie. Jednotlivé separační módy se rozlišují dle molekulárních interakcí. Lze rozpoznat tři základní typy molekulárních interakcí – polární, iontové a disperzní. Polární síly dominují u NP-HPLC (tvorba vodíkových vazeb, interakce dipól-dipól), disperzní síly u RP-HPLC a iontové síly se uplatňují v IEC. U čtvrtého základního módu separace se neuplatňují molekulární interakce, ale molekuly se separují podle velikosti. ^(18, 25)

3.5.3.1 Normální fáze

Pro separaci látek jsou používány stacionární fáze polární povahy a mobilní fáze s nižší polaritou. Stacionární fáze je nejčastěji tvořena čistým porézním oxidem křemičitým (SiO_2) nebo oxidem hlinitým (Al_2O_3). Povrch může být chemicky modifikován navázáním polárních funkčních skupin (např. diol, amino, kyano). Mobilní fáze představují nevodné směsi organických nepolárních rozpouštědel (např. hexan, heptan, dichlormethan). U NP-HPLC představují mechanismus retence polární interakce. Zadržení analytů na těchto površích je závislé na změnách složení mobilní fáze. Jestliže se bude polarita analytu zvyšovat, zadržování na koloně bude stoupat. K rychlejšímu vymývání analytů z kolony bude docházet se zvyšující se polaritou mobilní fáze. Tento separační typ se uplatňuje při analýze polárních analytů, látek se sklonem k hydrolyze, izomerů, lipidů, sacharidů a látek s lipofilní povahou. ^(18, 20, 25)

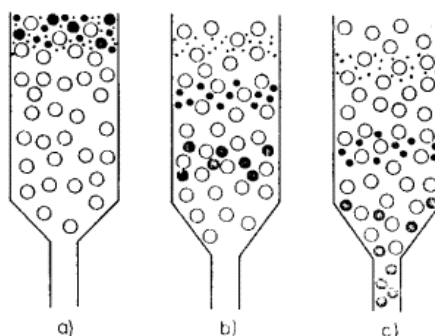
3.5.3.2 Reverzní fáze

Stacionární fáze pro uspořádání v tomto módu má nepolární charakter. Nejčastěji je tvořena dlouhými uhlíkatými řetězci obsahující zpravidla 18, případně 8 uhlíkových atomů, které jsou navázané na povrchu nosiče. Nosičem může být silikagel, hybridní sorbent nebo jiné oxidy kovů. Mobilní fáze je polární a jedná se obvykle o směs vodné složky (vody, zředěné vodné roztoky kyselin či bazí, pufrů) s polárními organickými rozpouštědly (např. alkoholy a acetonitril). Zástupci těchto rozpouštědel, tedy metanol a acetonitril, mají malou absorbanční při nízkých vlnových délkách, s výhodou používáme při UV detekci. Pro mobilní fázi je důležité, aby byly všechny

složky této fáze spolu mísitelné. U reverzních fází je mechanismus retence definován pomocí disperzních sil (hydrofobní nebo van der Waalsovy interakce). Analyty, které jsou méně polární, jsou déle zadržovány na stacionárních fázích. Změny ve složení obou fází mají vliv na selektivitu, umožňují tak separaci širokého spektra látek. Tento typ separace je možné použít jak pro směsi malých molekul, tak i pro složitější směsi, např. biologické vzorky, rostlinné extrakty. Separace na reverzních fázích stále představuje jednu z nejpoužívanějších separačních technik. (18, 19, 20, 25)

3.5.3.3 Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)

V tomto separačním módu je proces dělení molekul založen na rozdělování molekul podle jejich velikosti (resp. podle jejich hydrodynamického poloměru) v koloně. Kolona je naplněná polymerním gelem s póry, proto se také nazývá gelová permeační chromatografie (GPC – gel permeation chromatography, SEC – size exclusion chromatography). Nedochozí zde k žádným dalším interakcím analytu na rozdíl od ostatních typů separace. Hydrodynamický poloměr je hlavním faktorem toho, jak moc bude analyt zadržován stacionární fází. Čím je hydrodynamický poloměr vyšší, tím je retence kratší. Velké molekuly nevstupují do pórů gelu, protože jsou stericky omezeny. Naproti tomu malé molekuly lépe pronikají do pórů gelu a jejich retence bude delší. Malé molekuly jsou eluovány později, větší molekuly dříve.



Obrázek 9 Princip separace molekulové vylučovací separace (25)

Na retenci analytů má zásadní vliv druh použitého polymeru, rozměry a tvar, množství a relativní objem. Gely, které se používají v tomto typu separace, jsou rozděleny na organické gely (xerogely) a anorganické gely (aerogely). U všech gelů se udává parametr tzv. vylučovací mez, která omezuje použitelnost určitého gelu

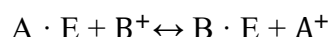
podle velikosti jeho pórů. Vylučovací mez představuje nejmenší relativní molekulovou hmotnost molekul, které již nemohou do pórů proniknout a nedochází k separaci.

Nejčastěji používanými gely tvořícími vlastní stacionární fázi jsou gely na bázi akrylamidů, methakrylátů, dextranové gely, agarosové gely, stacionární fáze na bázi silikagelu nebo kopolymery styrenu a divinylbenzenu.

Nevýhodou gelové chromatografie je nízká selektivita separace, čas analýzy je dlouhý, separace je méně účinná a objemová a hmotností kapacita je malá. Gelová chromatografie nalézá využití ve stanovení molekulové hmotnosti či distribuci velikosti molekul polymerů. ^(18, 20, 26)

3.5.3.4 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie (IEC – ion exchange chromatography) se nazývá také chromatografie na iontoměničích. Mechanismus retence je založen na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče - ionex (stacionární fáze) a ionty opačně nabitými, které se nacházejí v okolním roztoku (mobilní fáze). Počet a velikost náboje analytu a funkční skupiny nám vypovídá o tom, jak silná bude interakce. Stacionární fáze obsahující molekulu s kyselou funkční skupinou (např. karboxylová, sulfo) je nazývána katexem a vykazuje záporný náboj. Na ní se pak zadržují analyty s opačným nábojem – kationty analytů. V případě anionu je přítomna ve stacionární fázi aminoskupina, obsahuje kladný náboj a jsou zde zachytávány anionty analytu. Výměnu iontů ukazuje rovnice:



Rovnovážnou konstantu vyjadřující složení reakční směsi po dosažení rovnováhy ukazuje rovnice:

$$K = \frac{[A^+][BE]}{[AE][B^+]}$$

Čím vyšší je rovnovážná konstanta (předpokládáme, že je větší než 1), tím je větší schopnost kationtu B⁺ nahradit A⁺ na povrchu stacionární fáze.

V iontovýměnné chromatografii závisí retence a selektivita analytu na pH a iontové síle mobilní fáze.

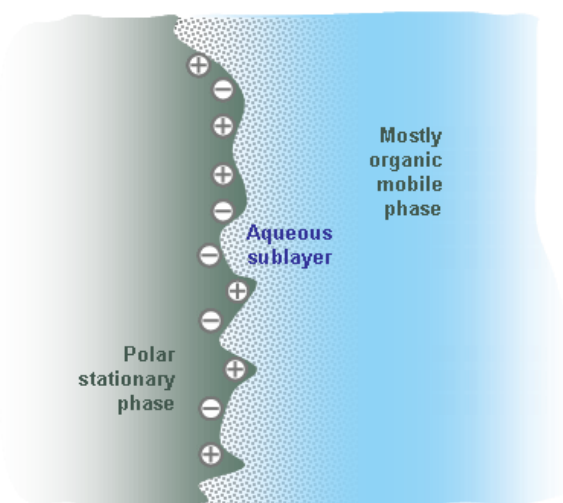
Lze popsat tři strukturně různé typy iontoměničů:

- Mikroparticulární s organickou maticí (= ionexové pryskyřice)
- Povrchově porézní s vrstvou měniče na pórovitém nosiči
- Chemicky vázané iontoměniče na silikagelu

Tento typ chromatografické separace se používá pro separaci aniontů a kationtů ve vodách, separaci peptidů, nukleových kyselin a v neposlední řadě k separaci karboxylových kyselin ve víně. (18, 20, 21, 23, 25)

3.5.3.5 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Jedná se o alternativu k chromatografii s normálními fázemi. HILIC – hydrofilní interakční chromatografie nebo také chromatografie s hydrofilními interakcemi je chromatografie, kde analyty interagují s hydrofilní stacionární fází. Stacionární fáze používané v HILIC chromatografii se dělí na neutrální, nabitě a zwitterionty. Neutrální stacionární fáze nevyužívají žádné elektrostatické interakce (diol, cyklodextrin, amid). Naproti tomu nabitě fáze využívají silné elektrické interakce (silikagel, aminopropyl silikagel) a zwitterionty jen slabé elektrostatické interakce (sulfobetain). Mezi nejpoužívanější stacionární fáze patří silikagelové fáze a také silikagel modifikovaná aminopropylovou funkční skupinou. Pro retenci a separaci látek s bazickým charakterem je vhodnější stacionární fáze, která je modifikovaná amidovou nebo sulfobetainovou skupinou. Naopak pro látky kyselého charakteru jsou lépe zadržovány na stacionární fázi modifikovanou propylaminoskupinou. Mobilní fáze v HILIC je složena z větší části organickou složkou (nejčastěji acetonitril) a z 5-40% vodným roztokem pufru. Eluce polárních analytů je pak umožněna zvyšování obsahu vodné složky a zvyšuje se tak polarita mobilní fáze. Za mechanismus retence a separace se považuje vytvoření tenké vodné vrstvy na stacionární fázi, do které se rozptylují analyty rozpuštěné v mobilní fázi. Mechanismus retence je komplexní a zahrnuje rozdělávání analytu mezi mikrovrstvou vody na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, dále hydrofobní a iontové interakce. Retence stoupá se zvyšující se polaritou stacionární fáze nebo analytu.



Obrázek 10 Difuzní vrstva vody na povrchu HILIC stacionární fáze ⁽²⁷⁾

HILIC chromatografie se často uplatňuje v analýze polárních látek nebo ionogenních látek už kvůli výhodám, které zahrnují např. dobrou retenci polárních látek, možnost přímého nástřiku extraktů získaných z RP extrakce na tuhou fázi, možnost použít vyšších průtoků mobilní fáze aj. Tento typ separace se snadno uplatňuje jak ve farmaceutických, tak i bioanalytických aplikacích. Díky této metodě lze vyřešit problémy vznikající při vývoji analytické metody, jako např. matricové efekty, nedostatečnou selektivitu metody či současnou analýzu polárních a nepolárních látek. (20, 25, 27)

3.5.3.6 Chirální chromatografie

Chirální chromatografie představuje významný typ separace ve farmaceutické analýze. Stereoizomery jsou molekuly se shodným sumárním a konstitučním vzorcem, ale liší se uspořádáním obvykle na jednom nebo více chirálních centrech. U některých léčiv je účinek zprostředkován pouze jednou stereoizomerní formou. Druhá forma může být neaktivní nebo může vykazovat nežádoucí účinky. Proto je nutné tyto stereoizomery separovat a kvalitativně i kvantitativně vyhodnotit všechny izomerní formy. Separace enantiomerů je složitá vzhledem ke stejným fyzikálně-chemickým vlastnostem. Pro realizaci chirální chromatografie je třeba mít k dispozici chirální selektor. Rozlišují se dva druhy chirální separace:

- Přímá separace – enantiomery jsou rozlišeny opticky aktivním činidlem a vzniknou tak diastereoizomery, které už můžeme separovat, neboť mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti

- Nepřímá separace – v chromatografickém systému vznikne chirální prostředí buď charakterem stacionární fáze, nebo mobilní fáze. V případě stacionární fáze je jej povrch modifikován opticky aktivní látkou (např. cyklodextrinem, polysacharidy, proteiny). U mobilní fáze se uplatňuje přidavek opticky aktivního činidla do této fáze. Separaci pak můžeme dosáhnout na achirální stacionární fázi.

Podle původu chirálních selektorů rozlišujeme jejich následující skupiny:

- Přírodní: cyklodextriny, polysacharidy, proteiny, makrocyklická antibiotika – přírodní selektory mají nižší selektivitu
- Semisyntetické: derivatizované cyklodextriny, modifikace makrocyklických antibiotik
- Syntetické: chirální polyethery, methakrylátové polymery

Oproti přírodním chirálním selektorům vykazují syntetické a semisyntetické chirální selektory vyšší selektivitu a mají proto větší využití.

Mechanismus chirální separace je založen na molekulárních interakcích mezi analyzovanou látkou a chirální stacionární fází. Mezi tyto typy molekulárních interakcí lze zařadit vodíkovou vazbu, interakci dipól-dipól, sterické efekty aj. Uplatnění nachází chirální chromatografie zejména tam, kde se optické izomery látek liší biologickým či farmakologickým účinkem. ^(20, 25)

3.5.4 Stacionární fáze

Základní součástí HPLC systému jsou kolony. Kolona je naplněna stacionární fází (= nepohyblivou složkou) a dochází zde ke kontaktu stacionární a mobilní fáze a tedy k separačnímu procesu. Plášť kolony je tvořen nejčastěji ocelovou trubicí s vysoce antikorozivními vlastnostmi. Materiálem pro tento plášť může být i plast. Délka ocelové trubice se pohybuje od 10 mm do 300 mm s vnitřním průměrem 2,1 až 5 mm. Stacionární fáze je tvořena pevnou látkou nebo vrstvou kapaliny, která je nanesená na pevné látce. Velikost částic těchto náplní se pohybuje od 1 do 10 μm . Kolony můžeme rozdělit z hlediska jejich polarity na polární, nepolární či obojetné (= amfoterní, zwitterionty). Dále se můžou kolony dělit do skupin podle jejich

chromatografického módu na NP-HPLC, RP-HPLC, SEC, IEC, HILIC či chirální. Existuje však účinnější rozdělení stacionárních fází podle chemického složení na:

- Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu
- Anorganické oxidy (silikagel, oxid hlinitý, zirkoničitý, titaničitý)
- Polymerní
- Hybridní
- Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku

Na stacionární fáze jsou kladeny požadavky ohledně chemické a teplotní stability a reakce s mobilní fází, ke které by nemělo docházet a ani by se v ní neměla rozpouštět. Použitím nevhodné mobilní fáze nebo vysokou teplotou může docházet k vymývání stacionární fáze. Tento jev je nežádoucí a může projevit jako snížení citlivosti detekce, změna vlastností stacionární fáze (např. selektivita).

Pro analýzu jsou důležité specifické vlastnosti částic stacionární fáze. Tyto vlastnosti jsou charakterizovány podle průměru velikosti d_p [μm] a distribuce velikosti částic (disperzita $d_p^{\text{max}}/d_p^{\text{min}}$), tvar částic (nepravidelné a pravidelné), měrný (specifický) povrch (*surface area*) [m^2/g], který se pohybuje obvykle mezi 50 – 500 m^2/g . Dále sem patří měrný objem pórů (*pore volume*) [cm^3/g], relativní objem pórů [obj. %] a průměrná hodnota velikosti pórů (*pore size*) [nm].^(18, 20, 21, 25)

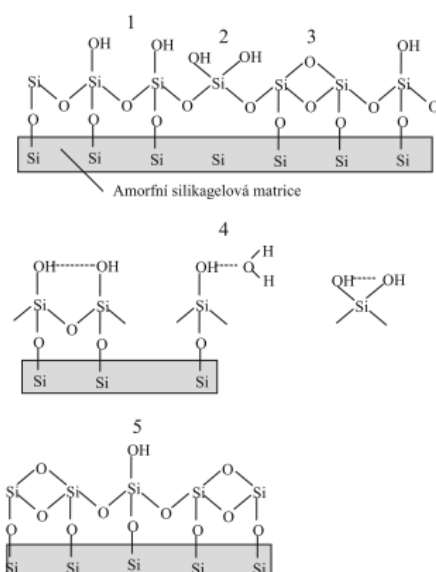
3.5.4.1 Silikagel

Pro výrobu stacionárních fází je nejvíce užívaným polárním anorganickým sorbentem silikagel. Vhodné vlastnosti jej činí téměř ideálním nosičem. Díky jeho velké mechanické odolnosti je používán při vysokých tlacích, které se uplatňují v HPLC. S výhodou jej lze použít v přítomnosti organických rozpouštědel, neboť se s nimi nesráží, ani nebobtná. Dalšími výhodnými parametry je např. velký specifický povrch, četné možnosti modifikace povrchu, široké spektrum volby parametrů kolony (velikost částic, průměr a plocha pórů a v neposlední řadě velké množství výrobců na trhu a jejich komerční využití).^(18, 20, 23, 25)

Silikagel s poměrně velkým specifickým povrchem (od 5 do 500 m^2/g) je připravován pro účely HPLC. Nejen velký specifický povrch, ale i velký objem pórů

(0,7 ml/g) a střední průměr pórů (8-15 nm) jsou pro HPLC charakteristické. Platí, že s rostoucím průměrem pórů klesá specifický povrch absorbentu a retence analytů.

Hydroxylové skupiny, resp. silanolové skupiny, na povrchu silikagelu tvoří aktivní centra. Silanolové skupiny jsou nerovnoměrně rozmístěny na povrchu silikagelu a vykazují odlišnou kyselost a zároveň charakterizují polaritu povrchu silikagelu. Silanolové skupiny na povrchu silikagelu lze dělit na vicinální, izolované, geminální nebo při vhodné poloze jsou sousední skupiny vázány vodíkovými vazbami.



Obrázek 11 Typy silanolových skupin na povrchu silikagelu ⁽²⁸⁾

Vysvětlivky: 1 – vicinální silanolové skupiny; 2 – geminální silanolové skupiny; 3 – siloxanové skupiny; 4 – asociované silanolové skupiny; 5 – izolovaná silanolová skupina ⁽²⁸⁾

Silanolové skupiny ovlivňují chromatografické chování silikagelu a díky nim má tento povrch slabě kyselý charakter a vykazuje vlastnosti iontoměniče. K výměně iontů dochází v mobilních fázích s obsahem pufru. Tento děj závisí na pH mobilní fáze. Silikagel na svém povrchu více zadržuje bazické látky oproti látkám kyselým a neutrálním. U bazických látek se může vyskytnout nežádoucí chvostování píků. Přidáním slabé organické báze (např. aminového typu – triethylamin) do mobilní fáze zabráníme tomuto problému. Ovšem je nutné sledovat, aby pH mobilní fáze nepřesáhlo hodnotu 8, protože pak může docházet k rozpouštění silikagelu a ke snížení separační účinnosti. ^(18, 20, 23, 25)

Výroba silikagelu se může řídit podle dvou postupů. První z nich představuje sil-gel, kdy příprava probíhá gelací roztoků křemičitanů. Takto připravený silikagel se vyznačuje vyšší pórovitostí s nepravidelným tvarem pórů. Při přípravě sol-gel dochází ke shlukování částic solu oxidu křemičitého při pyrolýze organokřemičitých látek. Připravené částice mají menší pórovitost s pravidelnějším uspořádáním. Zpravidla vykazují vyšší mechanickou stabilitu a pomaleji se rozpouštějí v alkalickém prostředí. Rozlišujeme tři typy silikagelu podle jejich technologie výroby. Silikagel typu A představuje částice připravené postupem sol-gel. Silikagel typu B obsahuje velmi malé množství kovů a připravuje se srážením oxidu křemičitého ve vzduchu. Vykazuje menší stabilitu oproti silikagelu typu A, avšak cílem výroby je příprava co nejčistšího silikagelu. Získáme tak homogenní materiál se zlepšením tvaru chromatografických píků, rozlišením a separační účinnosti. Třetí generací je silikagel typu C neboli hydrosilovaný silikagel. Z jeho povrchu se odstraní až 95 % silanolových skupin (probíhá záměna za nepolární skupiny Si-H). Silikagel typu C vykazuje menší polaritu povrchu, vyšší teplotní stabilitu, stabilitu v širokém rozsahu pH, vysokou mechanickou odolností, ale má extrémně nízkou aktivitu silanolových skupin. ^(20, 29)

3.5.4.2 Stacionární fáze na bázi kovových oxidů

Vzhledem k nedostatečné chemické odolnosti silikagelu při pH vyšším než 7 se začaly používat kovové oxidy. Stacionární fáze na bázi kovových oxidů řadíme mezi polární anorganické sorbenty. V HPLC se uplatňují tři typy kovových oxidů: oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a méně oxid titaničitý. Uvedené oxidy kovů vykazují vysokou stabilitu při vysokých teplotách i v silně alkalickém prostředí, z čehož plyne delší životnost analytických kolon a lepší flexibilita při vývoji nových metod. Zmíněné oxidy mají amfoterní charakter a v závislosti na pH mobilní fáze mohou vystupovat jako měniče aniontů nebo kationtů. ^(20, 28)

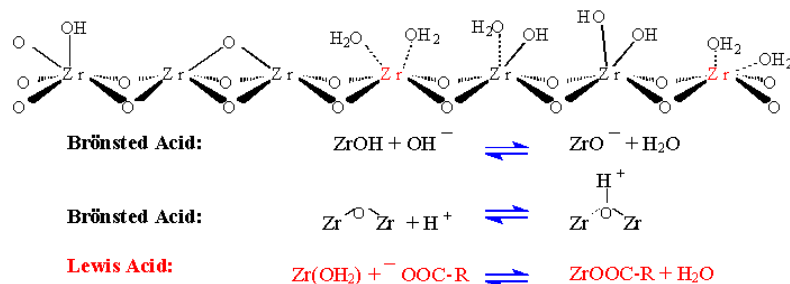
Oxid hlinitý

Oxid hlinitý představuje krystalický polární anorganický sorbent. Jeho hydroxylové skupiny se aktivují zahříváním na 200 °C. Oxid hlinitý ztrácí při zahřívání nad 900 °C aktivitu. U komerčně dodávaného sorbentu pro HPLC se oxid hlinitý aktivuje při teplotě mezi 500 až 800 °C a převažuje pak struktura γ -oxidu hlinitého (spinelová struktura). Na povrchu oxidu hlinitého se kromě hydroxylových skupin objevují také centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi. Tato centra pak

mohou interagovat s elektronově bohatými molekulami (Lewisovy báze). Oxid hlinitý výhodněji použijeme k separaci látek s rozdílným rozložením elektronů (např. polykondenzované aromáty s π -elektronovým systémem), k separaci nasycených a nenasycených alifatických uhlovodíků nebo polyaromatických uhlovodíků. Oproti silikagelu je oxid hlinitý používán méně, protože na jeho povrchu dochází ke katalytickému štěpení a následnému rozkladu chromatografických látek. Oxid hlinitý jako stacionární fáze v HPLC se v současnosti používá zřídka.^(20, 23)

Oxid zirkoničitý

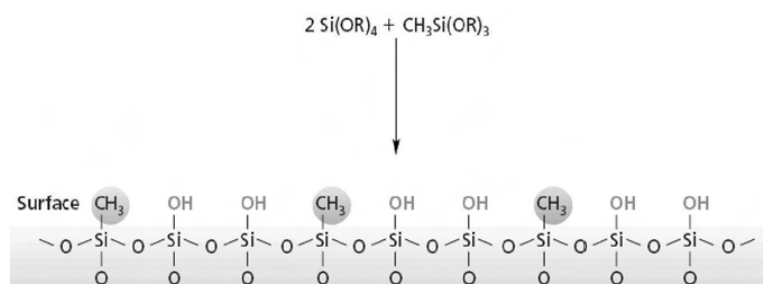
Stacionární fázi s oxidem zirkoničitým lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic. Připravená kolona se může rovnat se silikagelovou kolonou v její účinnosti. Výhodou oxidu zirkoničitého je tepelná (až do 200 °C) a chemická stabilita v celém rozsahu pH a při vysokých tlacích. Kolony s oxidem zirkoničitým mohou být použity za extrémních podmínek a mají prodlouženou životnost. Oxid zirkoničitý vykazuje amfoterní charakter. V závislosti na pH prostředí se pak chová jako aniont či kationt. Na svém povrchu má hydroxylové skupiny podobně jako silikagel. Navíc jsou zde přítomna adsorpční centra s charakterem Lewisových kyselin. Do mobilní fáze je nutné přidávat pufr za účelem kompenzace silných interakcí těchto center s hydroxylovými, karboxylovými či fosfátovými skupinami v molekule analyzované látky. Vlastnosti analytu, pH, typ pufru, celková iontová síla a koncentrace organického modifikátoru rozhodují o typu interakcí. Typ interakcí pak rozhoduje o tom, v jakém chromatografickém módu lze oxid zirkoničitý použít. V systému s normálními fázemi lze použít nemodifikovaný oxid zirkoničitý, ale častěji tento oxid používá v reverzním uspořádání nebo v HILIC. Pro modifikaci povrchu oxidu zirkoničitého se používá tenká vrstva polystyrenu, polybutadienu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku, který může být dále modifikován ligandem C₁₈.^(20, 23)



Obrázek 12 Znárodnění povrchu oxidu zirkoničitého a mechanismů chemických reakcí. ⁽³⁰⁾

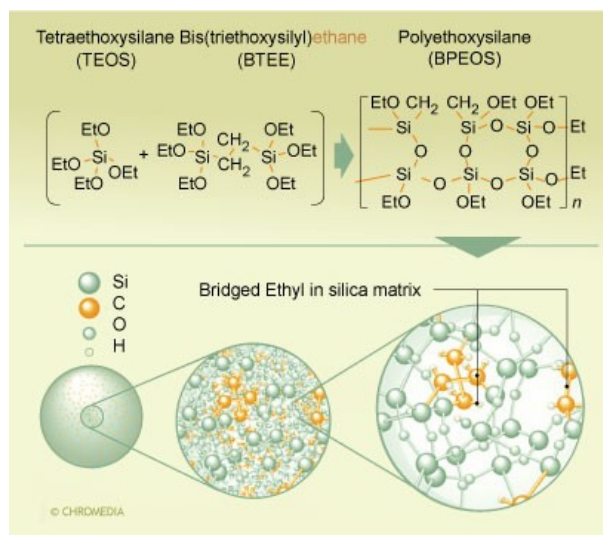
3.5.4.3 Hybridní stacionární fáze

Základ sorbentu hybridní stacionární fáze tvoří kombinace anorganického silikagelu s organickým organosilanem, který zde představuje polymer s chemickou a teplotní stabilitou. Při vývoji těchto stacionárních fází bylo snahou využít všechny výhodné vlastnosti porézního oxidu křemičitého (vysoká účinnost, mechanická odolnost), ale především eliminovat jeho nedostatky (rozpustnost při vysokém pH). Dále je omezeno chvostování bazických látek na hybridních sorbentech, protože je na povrchu částic přítomna pouze třetina silanolových skupin ve srovnání s tradičními silikagelovými fázemi. Píky analyzovaných látek jsou pak symetričtější. Hybridní fáze jsou vysoce stabilní a lze je použít v rozmezí pH od 1 – 12. Jako první se dostala na trh hybridní stacionární fáze X-Terra od firmy Waters. Reakcí tetraethoxysilanu a methyltriethoxysilanu byla připravena hybridní stacionární fáze.



Obrázek 13 Struktura částic hybridního sorbentu 1. Generace X-Terra ⁽¹⁸⁾

Následovala příprava dalších generací hybridních sorbentů, např. X-Bridge, BEH (Bridge ethyl hybrid). Reakcí tetraethoxysilanu s bis(triethoxysilyl)ethanem vzniknou uvedené fáze. Podařilo se tak získat stacionární fáze s vyšší chemickou odolností, účinností a mechanickou stabilitou oproti sorbentu X-Terra. ^(18, 20, 25, 28)



Obrázek 14 Znáznornění syntézy hybridních částic 2. Generace BEH⁽³¹⁾

3.5.4.4 Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze jsou charakteristické svou chemickou stabilitou v celém rozsahu pH a při vysokých teplotách. Při použití některých organických rozpouštědel hrozí riziko vzniku objemové změny polymeru a nižší účinnost separace. Může dojít ke srážení či bobtnání těchto fází při vysokém obsahu organického rozpouštědla v mobilní fázi. Polymerní stacionární fáze mají své použití omezeno maximálním pracovním tlakem na koloně, který činí 20 MPa. V současné době jsou polymerní fáze tvořeny sítí mikrosfér vytvářející porézní strukturu. Pro výrobu těchto fází se využívá zesíťovaný polystyren, substituované methakryláty či polyvinylalkoholy s možností modifikace povrchu.^(20, 25)

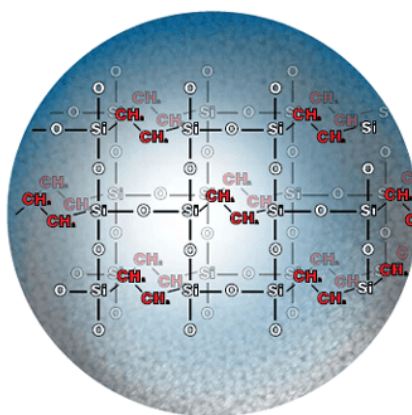
V praxi se nejčastěji používá polymerní stacionární fáze s kopolymerem polystyrenu a divinylbenzenu (PS-DVB). Retence je oproti chemicky vázané C18 vyšší díky specifickým interakcím analytu s π -elektrony stacionární fáze. Tato fáze je stabilní v celém rozsahu pH, pokud není PS-DVB vázán na silikagel. Zmíněná fáze nalézá využití v analýze proteinů, glykoproteinů a peptidů.^(18, 20)

Stacionární fáze s anorganickým substrátem (např. oxid hlinitý či zirkoničitý, silikagel) mohou být pokryty polymerem. Navázání nebo adsorpce polymeru se děje pomocí katalýzy γ -zářením nebo zvýšenou teplotou. Výhodou takto vzniklého materiálu je mechanická odolnost (zajišťuje anorganický základ), chemická stabilita a vyšší

selektivita díky odolnému polymeru. Anorganický nosič lze pokrýt polysiloxany či polyethery.^(18, 20)

3.5.4.5 Kolona Kinetex EVO C18

Kolonu pod firemním názvem Kinetex EVO C18 jsem použila při své práci. Tato kolona používá spojení Core-Shell technologie s hybridní Twin technologií. Kolona je vyráběna kombinací anorganického silikagelu a organického organosilanu. Dochází tak k nahrazení dostupných silanolových skupin trimethylsilyllovými skupinami. Je zesítněna ethanem. Při výrobním procesu je na povrch silikagelu nanesen slabě pozitivní náboj, proto umožňuje snížení interakcí s bazemi (tedy s kladně nabitými analyty) a dochází ke zlepšení tvaru píků. Zesítnění ethanem zajišťuje stabilitu v pH 1 – 12, nedochází tak k rozpuštění povrchu v silně alkalickém prostředí, jako je tomu u samostatného silikagelu. Zachovává si mechanickou pevnost částic Core-Shell technologie. Dále lze zvýšit citlivost, rozlišení a umožňuje snížit dobu analýzy. Její výhodou také je, že je stabilní ve 100% vodných fázích.^(37, 38)



Obrázek 15 Znárodnění EVO částic⁽³⁹⁾

3.5.5 Systémy detekce

V HPLC systému představují detektory důležitý článek. Nacházejí se za chromatografickou kolonou a jejich úkolem je zaznamenávat rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje analyt. Tento rozdíl je převeden na elektrický signál a je tedy úměrný koncentraci analytů v mobilní fázi.

Detektory lze rozdělit na hmotnostní a koncentrační. Koncentrační detektory se v současné době používají nejvíce. Dělí se na selektivní a univerzální. Selektivní detektory jsou přizpůsobeny tak, aby zaznamenávali vlastnosti analytu. Univerzální detektory zaznamenávají navíc i vlastnosti mobilní fáze. Mezi požadavky ideálního detektoru patří:

- Schopnost detekovat všechny přítomné analyty (univerzálnost)
- V co nejširším koncentračním rozmezí dosáhnout okamžité a lineární odezvy (široký lineární dynamický rozsah)
- Předvídatelná odezva, vysoká citlivost bez závislosti na průtoku, teplotě a složení mobilní fáze (gradientová eluce)
- Co nejmenší příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón
- Spolehlivost a snadnost použití
- Kvalitní informace pro detekované píky

Všechny tyto uvedené vlastnosti žádný detektor nemá. Některé HPLC detektory se k těmto vlastnostem přibližují. Využití těchto detektorů v praxi není stejnoměrné a odvíjí se od citlivosti, principu detektoru a od výše uvedených vlastností. ^(18, 20, 23, 32)

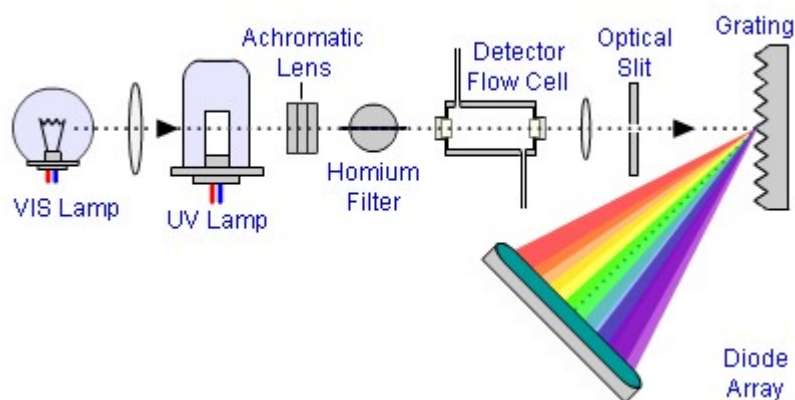
3.5.5.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrická detekce je založena na schopnosti látek absorbovat záření v UV a viditelné oblasti. Jedná se především o oblast vlnových délek od 190 do 800 nm. Pro většinu látek obsahujících v molekule chromofor poskytují tyto detektory citlivou a robustní odezvu. Pro vyhodnocení je při kvantitativní analýze využíván Lambert-Beerův zákon.

Jako zdroj záření pro UV oblast (200-400 nm) slouží deuteriová lampa. Pro viditelnou oblast se využívá wolframová lampa. Pomocí monochromátoru pak získáme monochromatické záření vhodné vlnové délky. Spektrofotometrické detektory dělíme podle jejich konstrukčního uspořádání na čtyři typy:

1. Detektory s měnitelnou vlnovou délkou, které mají předem dané vlnové délky, ale jedná se o nejčastěji využívaný typ detektoru.
2. Detektory s fixní vlnovou délkou. Umožňují detekci při vlnové délce 253,7 nm. V současné době se z HPLC analýzy vytrácejí.

3. Detektory s programovatelnou vlnovou délkou. Vlnovou délku lze nastavovat v rozmezí od 190 do 700 nm. Vlnovou délku lze měnit během analýzy a získáme tak maximální citlivost a můžeme detekovat jednotlivé píky při různých vlnových délkách.
4. Detektory s diodovým polem (*DAD – diode array detectors, PDA – photodiode array*). Jedná se o detektor, který má nejsložitější konstrukci. Detektory v průběhu analýzy snímají celé spektrum v nastaveném rozmezí a bez přerušení chromatografické separace. Pomocí tohoto detektoru lze vybrat vhodnou vlnovou délku pro detekci každého analytu zvlášť a získat jejich UV spektrum. Ze zdroje záření (např. deuteriová výbojka) po průchodu štěrbinou, čočkou clonou a měrnou průtokovou celou detektoru je záření spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou. Na každou fotodiodu dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, který je ovšem zeslaben absorpcí v cele detektoru.



Obrázek 16 Schéma detektoru s diodovým polem ⁽³³⁾

Vysvětlivky: VIS Lamp – wolframová výbojka. UV Lamp – deuteriová výbojka. Achromatic Lens – čočka. Homium filter – clona. Detector Flow Cell – průtoková detekční cela. Optical Slit – optická štěrbin. Grating – mřížka. Diode Array – diodové pole ⁽³³⁾

Každá fotodioda je spojena s předem nabitým kondenzátorem. Při dopadu záření na diodu vzniká fotoelektrický proud, který vybíjí kondenzátor. V další fázi se kondenzátory nabíjí proudem, jehož velikost je měřena a ukládána do paměti řídicí jednotky. Sekvence vybíjení a nabíjení se opakuje s velkou rychlostí. Údaje o absorbanci se zaznamenávají v každém okamžiku při každé vlnové

délce. Rozlišení spektra je pak dáno počtem diod na poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diod.

Použitím PDA detektoru je umožněno pracovat při jakékoliv zvolené vlnové délce. Dovolují vypočítat čistotu píku (peak purity – zda se v píku eluuje jedna látka nebo směs nerozdělených analytů) a dovolují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter.

Největší výhody použití spektrofotometrických detektorů přináší robustnost, snadná obsluhovatelnost a nízká citlivost odezvy na změny ve složení a v teplotě mobilní fáze. Možnost využití při gradientových analýzách, široký dynamický lineární rozsah (až 5 řádů) a vysoká citlivost pro analyty s chromofory představují další výhody využití spektrofotometrických detektorů. ^(19, 20, 23, 32)

3.5.5.2 Fluorescenční detektory

Princip fluorescenčních, jež jsou označovány také jako fluorimetrické, detektorů je založen na fluorescenci analytu a následném měření sekundárního (emisního) záření. Látka vydá toto záření po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Excitovaná molekula může absorbovanou energii předat jiným molekulám nebo ji vyzářit jako fluorescenci nebo energii přeměnit na vibrační energii. Detektory jsou použitelné pouze pro látky vykazující fluorescenci.

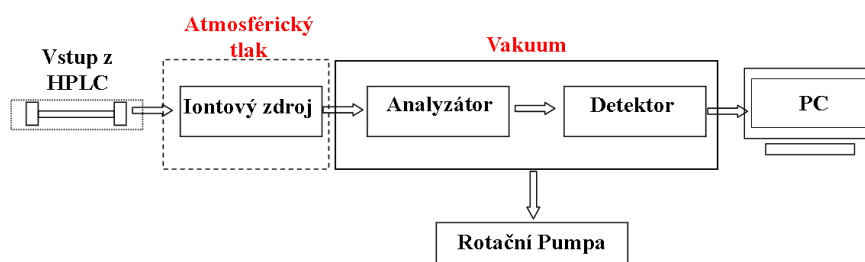
Vysoká citlivost, robustnost a selektivita jsou prezentovány jako největší výhody fluorescenčních (fluorimetrických) detektorů. Naopak nevýhodou je detekování malého množství analytů, jež vykazují fluorescenci. ^(18, 19, 20, 23, 32)

3.5.5.3 Hmotnostně spektrometrická detekce

Tento typ detekce je založen na principu ionizace vzorku a jeho následné separaci podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Poté probíhá detekce iontů a zesílení signálu v detektoru. Záznamem je zde hmotnostní spektrum (četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost/počet nábojů). Hmotnostní spektrometr zahrnuje tyto hlavní komponenty:

- Iontový zdroj – zde jsou látky převedeny na ionty
- Hmotnostní analyzátor – ionty jsou rozděleny podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a urychleny, pracuje za vysokého vakua

- Detektor – zesiluje signál a detekuje ionty, pracuje za vysokého vakua



Obrázek 17 Schéma hmotnostní spektrometrie ⁽³⁴⁾

Výběr ionizační techniky ovlivňují vlastnosti, jako je těkavost látky, molekulová hmotnost, tepelná stabilita či polarita látky. Ionizační techniky dělíme do dvou kategorií – měkké a tvrdé. Mezi měkké ionizační techniky patří ionizace za atmosférického tlaku (API – atmospheric pressure ionization), která zahrnuje ionizaci elektrosprejem (ESI – electrospray ionization), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI – atmospheric pressure chemical ionization) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI – atmospheric pressure photoionization). Při ionizaci poslouží jako zdroj kladné napětí, čímž vznikají protonované molekuly $[M+H]^+$. Při ionizaci v záporném módu vznikají deprotonované molekuly $[M-H]^-$. Mezi nejšetrnější techniky patří zejména ionizace elektrosprejem. Naměřená spektra pomocí měkkých ionizačních technik nelze porovnávat s knihovnou, protože pro HPLC/MS takové knihovny neexistují.

Zástupcem tvrdých ionizačních technik je elektronová ionizace (EI), pro kterou knihovny spekter existují. V současné době se jedná o běžný způsob ionizace. Dochází zde k ovlivnění elektromagnetických polí a následně je uvolněn valenční elektron. Vznikne molekulární iont $M^{+\bullet}$ a rozpadne se molekula. Pro aplikaci elektronové ionizace je zapotřebí mít těkavý vzorek a tato vlastnost je pak využívání ve spojení s plynovou chromatografií (GC).

Hmotnostní analyzátoři mají za úkol separovat ionty podle poměru hmotnost/náboj (m/z) a tyto ionty urychlit.

Hmotnostní spektrometr provádí potvrzení identity vzorku na základě strukturně specifických fragmentů a molekulové hmotnosti. Tato technika je využitelná pro spojení LC-MS, kdy lze analyzovat vysoce komplexní vzorky (např. environmentální matrice, biologické tkáně či tekutiny).

Ve farmaceutické analýze se využívá tato detekce v analýze léčiv a metabolitů v biologickém materiálu, při určování struktury nečistot a degradačních produktů. Je využitelná také pro stanovení obsahu léčiv neobsahujících ve své molekule chromofor. (20, 34, 35, 36)

3.5.5.4 Další typy detektorů

V HPLC analýze se používají i další typy detektorů. Jedním z nich je například refraktometrický detektor. Pracuje na principu měření rozdílu indexu lomu čisté mobilní fáze v referenční cele a mobilní fáze s analytem v měrné cele detektoru. Rozdíl v indexu lomu mezi referenční a mobilní fází je zaznamenán jako elektrický signál a na výstupu detektoru je převáděn na napětí. Mezi nevýhody tedy patří nemožnost použití při gradientové eluci a nízká citlivost detekce.

Elektrochemický detektor představuje další typ detektorů. Používáme jej pro detekci látek schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda-mobilní fáze. Látky musí obsahovat v molekule aktivní skupiny, které jsou schopné oxidace nebo redukce. Elektrody v cele detektoru měří elektrické veličiny (elektrodotový potenciál, proud). Tento elektrický signál je přímo úměrný látkovému množství detekované složky. Detektory využívají různé typy pracovních elektrod (např. stříbrná, uhlíková, platinová). Elektrochemický detektor vykazuje vysokou citlivost a selektivitu.

Dalším univerzálním detektorem je vodivostní detektor. Jeho úkolem je měření elektrické vodivosti analyzované látky v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Při tomto typu detekce by měla být mobilní fáze zcela nevodivá, musí mít dostatečně velkou permitivitu a navíc v ní musí být rozpustné všechny dělené látky. Vodivostní detektory lze uplatnit v iontové chromatografii.

Detektor založený naměření rozptylu světla se v současnosti používá v některých aplikacích. Velmi oblíbeným je detektor využívající odpaření (ELSD – Evaporative light-scattering detektor). Proudem dusíku je odpařena mobilní fáze vystupující z kolony. Poté je měřen rozptyl světla na částicích netěkavých analytů. Lze jej s výhodou použít v analýze lipidů, proteinů, peptidů, steroidů, polymerů, uhlovodíků a dalších látek.

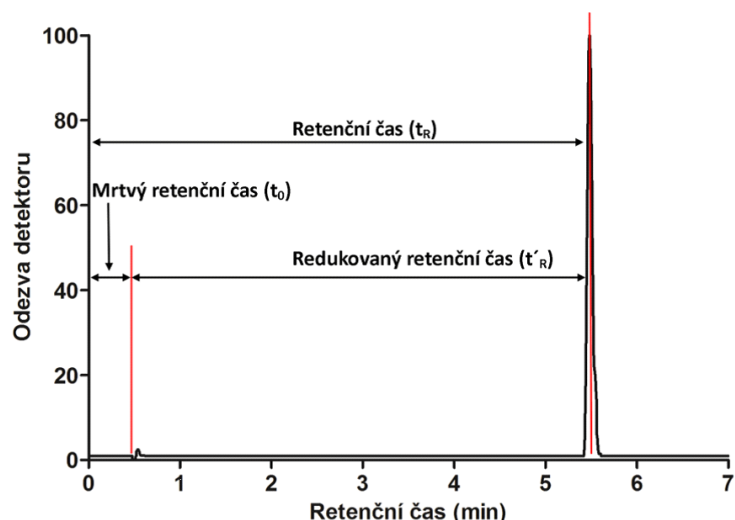
Aerosolový detektor nabitých částic (CAD – Corona-discharge detector) funguje na podobném principu, kdy je mobilní fáze na výstupu z kolony zmlžena a odpařena. Analyty v plynné fázi se smíchají s dusíkem. Tento detektor detekuje kladně nabitě částice. Detektor tohoto typu je univerzální a dokáže citlivě detekovat analyty méně těkavé než mobilní fáze. ^(20, 23, 32)

3.5.6 Hodnotící parametry analýzy

Mezi základní chromatografické charakteristiky patří následující hodnotící parametry.

Retenční charakteristiky

Retenční čas t_R nebo retenční (eluční) objem V_R představují základní charakteristickou veličinu pro každou separovanou látku. Retenční čas udává dobu, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima vrcholu píku. Retenční objem pak představuje objem mobilní fáze, která proteče kolonou za tuto dobu. Retenční čas patří mezi kvalitativní (identifikační) charakteristiky látky a lze jej snadno změřit. Nevýhodou může být malá univerzálnost a závislost na průtoku mobilní fáze chromatografickým systémem. Plochu pod píkem (A) nebo výšku píku (h) pak řadíme mezi kvantitativní charakteristiky. Analyt, který není zadržován na koloně (inertní látka) a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, je charakterizován mrtvým (void) retenčním časem (t_0). Odečtením mrtvého retenčního času od retenčního času analytu lze získat redukovaný retenční čas (t'_R). ^(17, 18, 20, 23)



Obrázek 18 Retenční časy ⁽¹⁷⁾

Retenční faktor (k) představuje bezrozměrnou veličinu popisující retenční chování analytu. Tato charakteristika nezávisí na průtoku mobilní fáze ani na rozměrech kolony, je tedy zcela objektivní a vyjadřuje ji rovnice:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Kde vyjadřuje t_R – retenční čas, t_0 – mrtvý retenční čas, V_R – retenční objem a V_0 – mrtvý retenční objem. ^(17, 20)

Účinnost chromatografické kolony

Dosažení nejlepšího rozdělení v co nejkratším čase je základním cílem chromatografických metod. Pro hodnocení separačního procesu na koloně je používán parametr účinnosti. Jedná se o míru rozšiřování elučních zón dělených na koloně a je to bezrozměrná veličina N označována také jako počet teoretických pater. Platí, že čím vyšší je počet teoretických pater N , tím méně je zóna analytu rozšířena po průchodu kolonou. Kolona je tedy účinnější.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R – retenční čas, w_h – šířka píku v polovině jeho výšky. Počet teoretických pater není konstantní veličinou pro určitou kolonu. Závisí na retenčním faktoru, délce kolony,

rychlosti průtoku mobilní fáze, teplotě, viskozitě mobilní fáze a také na velikosti částic náplně kolony.

Účinnosti kolon lze také porovnávat. Při porovnávání s rozdílnou délkou kolony využíváme parametr výškový ekvivalent teoretického patra H – délka kolony připadající na jedno patro v μm .

$$H = \frac{L}{N}$$

Kde L – délka kolony (m), N – počet teoretických pater (účinnost).^(17, 20)

Rozlišení

Rozlišení R se vyjadřuje jako míra separace dvou sousedních elučních křivek. V porovnání se selektivitou se jedná o objektivnější parametr hodnocení, protože zahrnuje i účinnost vyjádřenou pomocí šířky píků. Rozlišení zlepšíme úpravou selektivity nebo zvýšením účinnosti. Jedná se o bezrozměrnou veličinu. Čím vyšší je R , tím lepší máme separaci. V praxi cílíme především na potřebné rozlišení pro vyhodnocení výsledků.^(17, 18, 23)

Selektivita

Parametr popisující schopnost rozlišit dva rozdílné analyty je nazýván selektivitou α . Vyjadřuje se jako poměr retenčních faktorů dvou různých analytů (k_1 , k_2). Ovlivňuje ji především charakter analytu a vlastnosti sorbentu. Výpočet selektivity podle rovnice:^(17, 18)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Asymetrie

Asymetrie píků zastupuje další z veličin kvality píků. Existují dvě metody vyjádření této veličiny. Faktor chvostování T_f zastupuje jednu z nich. Rovnice vyjadřuje šířku píku v 5% výšky ($w_{0,05}$) k dvojnásobku šířky píku vzestupné části (f):

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

Dalším vyjádřením je faktor asymetrie A uvádí se jako poměr šířky sestupné části píku (t) k vzestupné části píku (f) a to nejčastěji v 5 % (nebo 10 %) výšky píku. ⁽²⁰⁾

$$A = \frac{t}{f}$$

Metoda vnějšího standardu

K vyhodnocení naměřených veličin slouží právě tato nejjednodušší metoda. Pomocí metody vnějšího standardu (external standard method) lze získat chromatogramy analytu a chromatogramy vnějších standardů. Nejčastěji se pro tento účel používají standardy stanovované látky (CRL – chemická referenční látka). U složených přípravků používáme jako vnější standard jednu ze složek směsi. Koncentraci analytu vypočítáme z poměrů ploch nebo výšek píků jednotlivých látek a plochy píků vnějšího standardu. Rovnice pro výpočet koncentrace analytu:

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

Kde A_i – plocha stanovovaného analytu o neznámé koncentraci c_x , A_s – plocha standardu o známé koncentraci c_s . ^(19, 23, 40)

Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu (internal standard method) využívá k analýze roztok vnitřního standardu (IS – internal standard), který přidáme ke vzorku. Vnitřní standard je chemická látka dobře oddělená od všech složek analytu. Měla by také být eluována v blízkosti stanovovaného analytu a chemicky inertní. Koncentrace analyzované látky se vypočítá z poměru ploch (i výšek) píků jednotlivých složek a plochy (i výšky) píku a koncentrace vnitřního standardu. Tento výpočet uvádí následující rovnice:

$$c_{VZ} = \frac{\left(\frac{A_{VZ}}{A_{IS}}\right)}{\left(\frac{A_{ST}}{A_{IS}}\right)} c_{ST}$$

c_{VZ} – neznámá koncentrace vzorku, c_{ST} – koncentrace roztoku standardu, A_{VZ} - plocha píku vzorku, A_{IS} – plocha píku vnitřního standardu, A_{ST} – plocha píku standardu. ^(19, 23, 40)

Metoda normalizace

Při této metodě je nutné identifikovat všechny píky v chromatogramu. Zároveň je nutné, aby všechny analyty vykazovaly přibližně stejnou odezvu u detektoru. Výstupem této metody je procentuální podíl z ploch všech píků na chromatogramu. Do celkové plochy všech píků nezapočítáváme plochy píků rozpouštědel a jiných činidel. S oblibou se metoda normalizace používá pro hodnocení stability či čistoty. Rovnice pro metodu normalizace: ^(40, 41)

Metoda kalibrační křivky

Kalibrační postup určuje lineární závislost mezi plochou píku a odpovídající koncentrací a poté se vypočítá kalibrační funkce. Analýza probíhá u série připravených vzorků v definovaném koncentračním rozmezí. Z kalibrační přímky pak můžeme odečíst koncentraci analytu. ^(40, 41)

3.5.7 Úprava biologického vzorku před analýzou

Mnoho reálných vzorků není kompatibilní s chromatografickými technikami, proto je nutné je před analýzou upravit. Úpravou biologického vzorku předcházíme problémům spojeným s poškozením instrumentace HPLC. Cílem úprav je izolace a zkoncentrování analytů a odstranění co největšího množství balastních látek. Příprava vzorků před analýzou představuje časově nejnáročnější krok. Úprava vzorků je zahrnuta do HPLC metody a je specifická pro konkrétní biologický materiál. Citlivost stanovení je pak ovlivněna úpravou vzorků a zejména použitými rozpouštědly. V současné době se mezi hlavní způsoby úpravy vzorku k chromatografické analýze řadí deproteinace, extrakce na pevné fázi (SPE – Solid-phase extraction) a extrakce kapalina-kapalina. ⁽⁴²⁾

Deproteinace

Deproteinace představuje jednu z nejjednodušších metod odstranění proteinů. Proteiny jsou z biologického materiálu vysráženy přidávkem precipitačního činidla. Nejčastěji jsou používána organická rozpouštědla (methanol, acetonitril, ethanol), silné kyseliny (10% kyselina trichloroctová, 6% i 30% kyselina chloristá), nasycené roztoky solí (síran zinečnatý v hydroxidu sodném) nebo kombinace (acetonitril s 1% kyselinou mravenčí). Nejprve se ke vzorku plazmy přidá definovaný objem činidla, krátce se protřepe a vysrážené proteiny jsou odděleny centrifugací. Supernatant ze svrchní části

může být buď analyzován, nebo dále upravován. Výhodou precipitace proteinů je jednoduchost a rychlost provedení. Na druhou stranu nedochází k odstranění dalších endogenních látek a může dojít k naředění vzorku. ^(41, 42)

Extrakce na pevné fázi (SPE – Solid-phase extraction)

V současné době se extrakce na pevné fázi používá s velkou oblibou. Princip je založen na interakci analytu s pevnou fází. Pevnou fází představuje sorbent naplněný v extrakční kolonce nebo je upraven do extrakčního disku. Nepotřebné balastní látky jsou vymyty z kolonky ven. K retenci dochází na základě polárních, nepolárních, afinitních i iontových interakcí. Extrakce na pevné fázi začíná kondicionací – promytím kolonky organickým rozpouštědlem (např. methanolem) a dochází k aktivaci sorbentu. Organické rozpouštědlo je poté vymyto vodou, protože by mohlo způsobit precipitaci proteinů a došlo by k ucpání kolonky. Následuje nanesení vzorku biologického materiálu, vymytí balastů vodou či pufrem a nanesení rozpouštědla. Rozpouštědlo přerušuje vazby mezi povrchem sorbentu a analytem. Extrakt s analytem je analyzován nebo dále upravován. Extrakce na pevné fázi přináší výhodu ve vysoké výtěžnosti, nízké spotřebě organických rozpouštědel a možnosti automatizace. ^(41, 42)

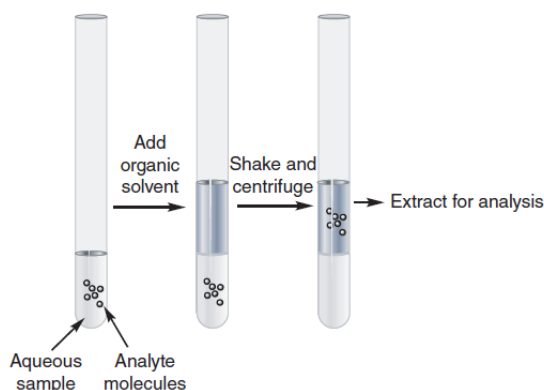
Extrakce kapalina – kapalina (LLE – Liquid-liquid extraction)

Tato metoda úpravy vzorku představuje nejvíce využívané postupy úpravy vzorků. Použili jsme ji při úpravě našich vzorků v experimentální části. Principem je převedení analytu z vodné fáze (hydrofilní) do organické fáze nemísitelné s vodou (lipofilní) na základě rozdělovacího koeficientu voda/oktanol. Rovnice pro rozdělovací koeficient K_D :

$$K_D = \frac{A_{org}}{A_{voda}}$$

Kde A_{org} – koncentrace léčiva v organické fázi, A_{voda} – koncentrace léčiva ve fázi vodné. Obecně platí, že čím vyšší je K_D , tím vyšší je účinnost extrakce. Výtěžnost lze také zlepšit změnou organického rozpouštědla nebo použitím směsí organických rozpouštědel. Výtěžnost extrakce pro neutrální analyty je nezávislá na pH a nemusíme tak upravovat pH vzorku. Opakem je tomu u kyselých a bazických analytů. Chceme-li dosáhnout účinnou extrakci léčiv s kyselým charakterem, musíme snížit pH vzorku

o dvě jednotky pod hodnotu pKa. U léčiv bazického charakteru upravujeme pH do oblasti alkalické.



Obrázek 19 Zjednodušené schéma LLE ⁽⁴³⁾

Provedení metody probíhá v následujících krocích. Nejprve se ke vzorku obsahující léčivo v biologickém materiálu (např. plazma) přidá organické rozpouštědlo, ve kterém bude analyt co nejvíce rozpustný. Organické rozpouštědlo by mělo mít obdobnou polaritu jako analyt, musí mít odpovídající čistotu a těkavost a nesmí reagovat s analyzovanou látkou. Jako organická rozpouštědla se často používá chloroform, ethylacetát, dichlormethan. Následně je směs protřepána, kdy dochází k extrakci analytu do příslušné vrstvy. Výsledek extrakce je značně ovlivněn délkou třepání a jeho intenzitou. Pomocí centrifugace pak dochází k oddělení vrstev. Doba a počet otáček centrifugace ovlivňují konečný výsledek. Organická vrstva se odebere a odpaří se odfoukáním proudem dusíku. Vzorek po odpaření je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, kterým nejčastěji bývá jedna ze složek mobilní fáze nebo samotná mobilní fáze. Poté je vzorek analyzován.

Extrakce kapalina – kapalina s sebou přináší mnohé výhody, např. dobrou výtěžnost a reprodukovatelnost, jednoduchost v provedení. Nevyžaduje speciální instrumentaci. Umožňuje zkoncentrování analytu a je vhodná pro extrakci malých i velkých množství. Nevýhodou se zdá být horší automatizace a vysoká spotřeba toxických organických rozpouštědel. ^(41, 42, 43)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, přístroje, pomůcky

4.1.1 Chemikálie

- Kvetiapin, dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11(10*H*)-on, 2-(2-{2-[4-dibenzo[*b,f*][1,4]thiazepin-11-yl]1-piperazinylethoxy}ethoxy)ethanol, Sigma Aldrich, Německo
- Metabolity kvetiapinu: norkvetiapin (NOR), 7-hydroxykvetiapin (7-OH), Sigma Aldrich, Německo
- Zolpidem, zolpidem nečistota A, Farmak, Česká republika
- Risperidon, Torrent Pharmaceutical Limited, Indie
- Lamotrigin, Torrent Pharmaceutical Limited, Indie
- Medazepam, Pliva Lachema, Česká republika
- Aciklovir, guanin hydrochlorid, Pliva Lachema, Česká republika
- Klotrimazol, LGC, Německo; imidazol, Sigma Aldrich, Německo; 2-chlorofenyldifenylmethanol, LGC, Německo
- Diklofenak, diklofenak nečistota A, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Štrasburk, Francie
- Methformin, kyanoguanidin, Sigma Aldrich, Německo
- Bromhexin, Tamda Olomouc, Česká republika
- Pikosulfát, Biomedica, Praha, Hradec Králové
- Fluoxetin, SVUS Hradec Králové, Česká republika
- Methanol, for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo
- Acetonitril, for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo
- Dichlormethan, Penta, Česká republika
- Chloroform, Penta, Česká republika
- Ethylacetát, for GC residue analysis, Scharlau Chemie, Španělsko
- Kyselina trihydrogenfosforečná, Sigma Aldrich, Německo
- Hydroxid sodný, Penta, Česká republika
- Amoniak 17,5% a amoniak 26%, Penta, Česká republika
- Kyselina mravenčí, Penta, Česká republika
- Králičí plazma

- Reálné vzorky krevního séra a plné krve s léčivou, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové
- Levetiracetam, Serum control level I, Chromsystems, Německo
- Voda čištěná

4.1.2 Chromatografická sestava

- Kontrolní jednotka: CTO-20A Shimadzu
- Čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu
- Degaser: DGU-20A3 Shimadzu
- Termostat kolony: CTD-20AS Shimadzu
- PC program: Shimadzu LC Solution
- UV-VIS detektor: SPD-20A Shimadzu
- Autosampler: SIL-20AC HT VP Shimadzu
- Řídící jednotka: CBM-20A Shimadzu
- Chromatografická kolona: Kinetex 5 μ m EVO C18 Phenomenex

4.1.3 Přístroje

- Digitální váhy:
Sartorius AG A200S, Německo
Sartorius CPA225D-0CE, Německo
- pH-metr: Schott CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- Magnetické míchadlo: IKA Color Squid, Německo
- Třepačka: WX Vortex, Velp Scientifica, Itálie
- Odfoukání dusíkem: Thermovap, Ecom, Česká republika
- Centrifuga: IEC CL31R Multispeed Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Německo
- UV-spektrofotometr: UV-2401PC, Shimadzu, Japonsko

4.1.4 Pomůcky

- Laboratorní lžičky, navažovací lodičky, kopistky, kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, automatické mikropipety a špičky, skleněné tyčinky, stříčky, vialky, inzerty, zkumavky Eppendorf, zkumavky se zábrusem,

kapátko, skleněná tyčinka, odsávací baňka, filtrační nálevka s mikrofiltrem,
zásobníky mobilní fáze, kyvety

4.2 Postupy přípravy roztoků

4.2.1 Příprava vzorků

- *Standardní roztoky*

Bylo naváženo 1,05 mg kvetiapinu, 1,10 mg zolpidemu, 1,09 mg risperidonu. Navážky byly následně rozpuštěny v 10 ml methanolu a objem zkumavek byl důkladně promíchán. Koncentrace roztoků byla 0,1 mg/ml.

Standardní roztok lamotriginu

Bylo naváženo 1,08 mg lamotriginu. Navážka byla rozpuštěna v 10 ml čištěné vody a objem zkumavky byl důkladně promíchán. Koncentrace roztoku byla 0,1 mg/ml.

- *Roztok vnitřního standardu medazepam (IS)*

Bylo naváženo 1,06 mg medazepamu. Navážka byla rozpuštěna v 10 ml methanolu a objem zkumavky byl důkladně promíchán. Koncentrace roztoku byla 0,1 mg/ml.

Stejným způsobem byly připraveny ostatní roztoky léčiv a roztoky nečistot.

- *Směsný roztok*

Směsný roztok byl připraven smícháním 1,0 ml standardního roztoku každého analytu (kvetiapinu, zolpidemu, risperidonu a lamotriginu) v 10 ml odměrné baňce. Směs byla doplněna 50% methanolem a řádně promíchána. Koncentrace každého analytu v roztoku byla 0,01 mg/ml.

- *Roztok pro sérovou kontrolní hladinu levetiracetamu*

Do lahvičky s lyofilizátem krevního séra s kontrolní hladinou levetiracetamu byla přidána čištěná voda o objemu 2,0 ml a obsah byl rozpuštěn. Připravený roztok byl uchováván v mrazáku a před upotřebením byl rozmražen.

4.2.2 Příprava tlumivých roztoků

- *Tlumivý roztok o pH 2,8*

Tlumivý pufr o pH 2,8 byl připraven dle Českého lékopisu 2009. Bylo smícháno 0,67 ml *kyseliny fosforečné R* s 5,5 ml roztoku *hydroxidu sodného R 4%* a zředilo se *vodou R* na 100,0 ml. Hodnota pH byla upravena na hodnotu 2,8 4% NaOH.

- *Tlumivý roztok o pH 5,7*

Pufr byl připraven podle rozpisu na tlumivý roztok fosforečnanový o pH 5,0 v Českém lékopise 2009. Bylo odváženo 2,72 g *dihydrofosforečnanu draselného R* a rozpuštěno v 800 ml *vody R*. Výsledné pH bylo upraveno *hydroxidem draselným 1 mol/l RS* a tento roztok byl zředěn *vodou R* na 1000,0 ml. Hodnota pH pufru byla poté upraveno na hodnotu 5,7.

- *Tlumivý roztok o pH 10,0*

Tlumivý pufr o pH 10,0 byl připraven podle Českého lékopisu 2009. Bylo odváženo 5,4 g *chloridu amonného R* a toto množství se rozpustilo ve 100 ml *vody R*. Poté bylo přidáno 35,0 ml 17,5% *amoniaku RS* a vzniklý roztok byl naředěn *vodou R* na 500,0 ml.

4.2.3 Příprava mobilní fáze

Pro přípravu organické složky byla použita rozpouštědla ACN a MeOH. Vodná fáze se skládala z tlumivých roztoků uvedených výše. Mobilní fáze byly před analýzou vždy přefiltrovány mikrofiltrem 0,45 μm za účelem odstranění pevných nečistot. Pro analýzu byly připraveny mobilní fáze s procentuálním zastoupením organické a vodní složky uvedenými v tabulce č. 1. Tyto poměry byly namíchány s tlumivým roztokem o pH 2,8; pH 5,7 a pH 10,0.

Tabulka 1 Složení mobilních fází s MeOH a tlumivými roztoky

MeOH	Vodná fáze
70 %	30 %
50 %	50 %
30 %	70 %
60 %	40 %
40 %	60 %
20 %	80 %

Při dalším testování byly zkoušeny takové mobilní fáze, které obsahovaly namísto MeOH ACN. Vodná složka byla tvořena tlumivým roztokem s hodnotou pH 2,8. Procentuální zastoupení organické a vodné fáze takto připravených mobilních fází uvádí tabulka č. 2.

Tabulka 2 Složení mobilních fází s ACN jako organickou složkou

ACN	Tlumivý roztok pH 2,8
25 %	75 %
20 %	80 %
30 %	70 %
15 %	85 %

Pro další testování byla organická fáze složena ze dvou organických rozpouštědel. Jejich procentuální zastoupení uvádí tabulka č. 3. Mobilní fáze s poměrem 5:15:80 (v/v) byla vybrána pro analýzu z biologického materiálu.

Tabulka 3 Složení mobilních fází s MeOH a ACN

MeOH	ACN	Tlumivý roztok pH 2,8
10 %	10 %	80 %
5 %	15 %	80 %
2,5 %	7,5 %	90 %
2,5 %	12,5 %	80 %

4.2.4 Příprava roztoků pro úpravu pH plazmy

- *Roztok 5% amoniaku*

Vypočítané množství 17,5% roztoku amoniaku ($M_{\text{NH}_3} = 17,03 \text{ g/mol}$, $\rho = 0,933 \text{ g/cm}^3$) bylo odměřeno a smícháno s vypočítaným množstvím čisté vody. Vznikl roztok 5% amoniaku.

- *2% kyselina mravenčí v MeOH*

Bylo smícháno 0,5 ml kyseliny mravenčí ($M_{\text{HCOOH}} = 46,03 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,22 \text{ g/cm}^3$) s 24,5 ml MeOH. Vznikl 2% roztok kyseliny mravenčí v MeOH.

- *0,1% kyselina mravenčí*

Bylo smícháno 0,1 ml kyseliny mravenčí ($M_{\text{HCOOH}} = 46,03 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,22 \text{ g/cm}^3$) s 99,9 ml čištěné vody. Vznikl 0,1% roztok kyseliny mravenčí.

4.2.5 Příprava plazmy, deproteinace a LLE

Králičí plazma v plastové zkumavce se nechala volně v teplé vodě rozmrazit a následně byla použita.

Deproteinace

K 50 μl králičí plazmy bylo přidáno 10 μl směsného roztoku (resp. 20 μl) o koncentraci 0,01 mg/ml, 5 μl IS a 10 μl 17,5% amoniaku (resp. 10 μl 5% amoniaku; 10 μl 2% roztoku kyseliny mravenčí v MeOH). Bylo přidáno 250 μl ACN (resp. 100 μl ACN; 250 μl 2% roztok kyseliny mravenčí v MeOH, protřepáno 1 min a následně centrifugováno 10 minut při 10 000 otáčkách/min. Poté bylo odebráno 250 μl supernatantu do nové eppendorfky. Směs byla analyzována přímo, resp. s přidavkem 250 μl 0,1% roztoku kyseliny mravenčí.

Extrakce kapalina – kapalina (LLE – liquid-liquid extraction)

Ke 200 μl králičí plazmy bylo přidáno 20 μl (resp. 10 μl) směsného roztoku o koncentraci 0,01 mg/ml, 30 μl (resp. 5 μl ; 10 μl) IS a 40 μl 17,5% amoniaku (resp. 20 μl 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí; 20 μl 17,5% amoniaku; 20 μl 26% amoniaku). Směs byla protřepána. Pro extrakci bylo použito 500 μl ethylacetátu (resp. chloroformu; dichlormethanu). Směs byla třepána 2 minuty, centrifugována 5 minut při 10 000 otáčkách/min. Bylo odebráno 450 μl ethylacetátové vrstvy do nové eppendorfky a následně bylo odpařeno proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 100 μl MeOH. Celé množství bylo odpipetováno do inzertu a podrobena HPLC analýze.

4.3 Optimalizace podmínek separace

4.3.1 Chromatografické podmínky

Pro HPLC analýzu byly nastaveny následující chromatografické podmínky:

- Kolona: Kinetex EVO C18
- Teplota: 26 °C
- Průtok: 1 ml/min
- Optimální mobilní fáze: 5 (MeOH):15 (ACN):80 (pufr pH 2,8), v/v
- Detekce: 210 nm a 240 nm (testováno i 215 nm; 225 nm; 230 nm a 250 nm)
- Vybrané analyty: kvetiapin, zolpidem, risperidon, lamotrigin
- Injekovaný objem: 10 µl
- Počet nástřiků: 2 nástřiky z každé vialky

4.3.2 Vývoj chromatografických podmínek

Ze souboru léčivých látek (aciklovir, klotrimazol, diklofenak, methformin, bromhexin, risperidon, lamotrigin, pikosulfát, fluoxetin, kvetiapin, zolpidem) byly vybrány právě čtyři standardy (kvetiapin, zolpidem, risperidon, lamotrigin). Byly testovány mobilní fáze uvedené v tabulce 1, 2 a 3. Jednotlivé analyty byly nastříkovány samostatně a poté byl nastříknut směsný roztok. Pro kvantitativní analýzu vzorků bylo nutné zvolit vnitřní standard. Byl vybrán medazepam z testovaných roztoků diazepam, nitrazepam, oxazepam a flunitrazepam. Analýza probíhala v módu isokratické eluce. Pro analýzu z biologického materiálu byla testována deproteinace i extrakce kapalina-kapalina s postupem uvedeným v kap. 4.2.5.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Retenční chování při pH 5,7

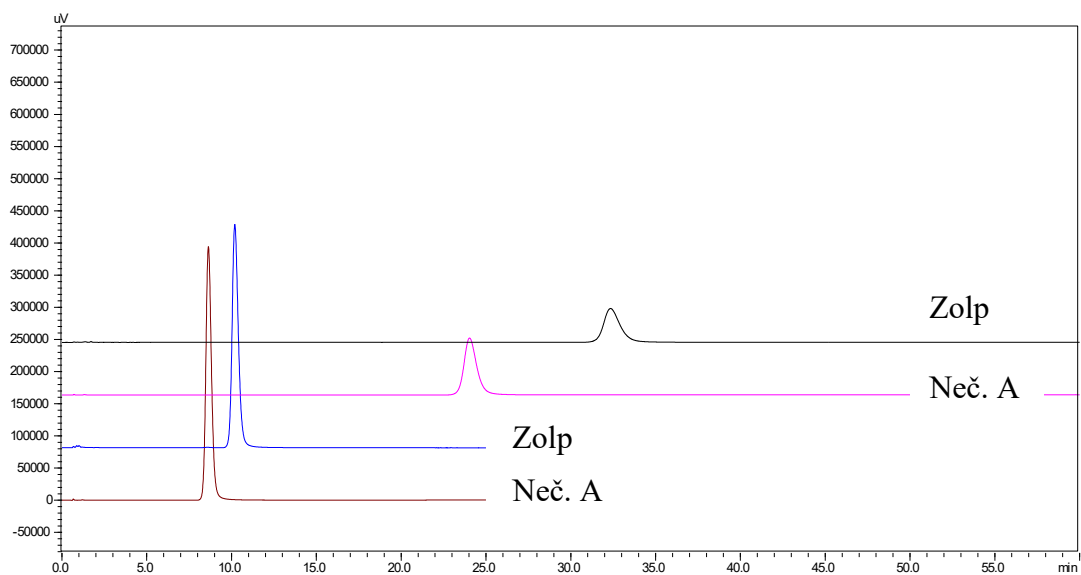
Nejprve byla testována léčiva kvetiapin, zolpidem, aciklovir, diklofenak a methformin včetně jejich nečistot a metabolitů kvetiapinu. Detekce byla zvolena při 250 nm. Výchozí MF byla v poměru 70 (MeOH):30 (pufr), v/v. Vlivem nízkého obsahu pufru byly zaznamenány velmi krátké retenční časy (t_R) u všech zmíněných analytů, proto byl poměr změněn na 50:50, v/v. U všech analytů se t_R výrazně nezměnil. Výjimku tvořil diklofenak, jehož t_R se pohyboval kolem 16. minuty. Dále byl testován poměr 30:70 (v/v), při kterém aciklovir, diklofenak a methformin poskytovaly krátké retenční časy. Tato léčiva byla ze studie vyřazena a nahrazena risperidonem a lamotriginem.

Poté byl vyzkoušen poměr 60 (MeOH):40 (pufr), (v/v) s t_R všech analytů pod 3 minuty. Ve snaze prodloužit eluci byl poměr převrácen na 40:60 (v/v). Analyty poskytovaly opět krátké t_R kromě zolpidemu. Množství pufru bylo navýšeno na poměr 20:80 (v/v), ale analýza nepřinesla zlepšení. Byl vybrán příklad retenčního chování zolpidemu a jeho nečistoty A na obr. 20. Retenční časy a tailing faktory (T_F) vybraného příkladu jsou uvedeny v tab. 4.

Připravené MF s pH 5,7 nebyly považovány za vhodné, proto se přistoupilo na hodnocení pomocí jiné MF.

Tabulka 4 Retenční čas a tailing faktor pro zolpidem a nečistotu A při pH 5,7

MF 30:70 (v/v)	t_R	T_F
Zolpidem	32,34	1,28
Zolpidem neč. A	24,03	1,25
MF 40:60 (v/v)		
Zolpidem	10,19	1,25
Zolpidem neč.A	8,63	1,21



Obrázek 20 Retenční chování zolpidemu a jeho nečistoty A v MF 30:70 a 40:60 (v/v), detekce 250 nm

Vysvětlivky: Zolp – zolpidem, Neč. A – nečistota A

Komentář: Na chromatogramu je znázorněno retenční chování zolpidemu a jeho nečistoty A v MF (MeOH:pufř) 30:70 a 40:60, v/v (shora). Došlo k posunu t_R zolpidemu i nečistoty A vlivem změny obsahu pufřu.

5.2 Retenční chování při pH 10,0

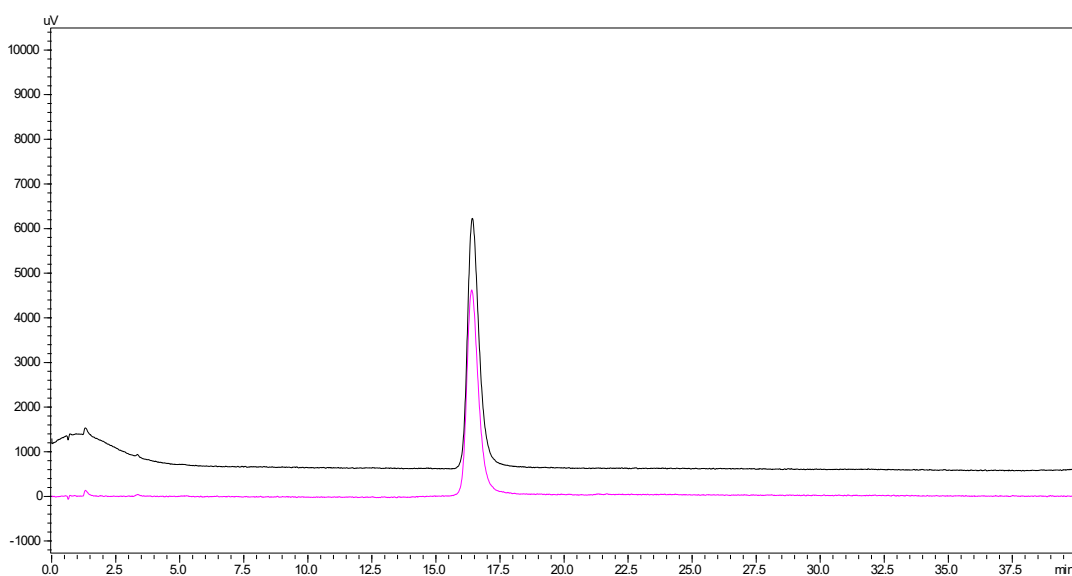
Nejdříve byly testovány kvetiapin, zolpidem, klotrimazol, aciklovir, diklofenak a methformin včetně jejich nečistot. Detekce byla zvolena při 250 nm. Výchozí MF byla v poměru 70 (MeOH):30 (pufr pH 10,0), v/v. Zolpidem, aciklovir, diklofenak a methformin byly separovány s velmi krátkými t_R . Poměr byl změněn na 50:50 (v/v) s cílem prodloužit eluci. Posun t_R byl zaznamenán u zolpidemu a diklofenaku. Klotrimazol byl vyřazen z dalších analýz kvůli velmi krátkému t_R . Poté bylo zvýšeno množství pufru v MF 30:70 (v/v). Prodloužil se retenční čas u kvetiapinu a jeho nečistot. Naopak velmi krátké retenční časy vykazoval aciklovir, diklofenak a methformin. Tyto analyty byly nahrazeny risperidonem a lamotriginem.

Byla testována MF s 60:40 (v/v). Byly zaznamenány dobré výsledky u kvetiapinu, zolpidemu a risperidonu. Do analýzy byly přidány metabolity kvetiapinu a to 7OH a NOR. U MF 40:60 (v/v) byl zaznamenán posun zolpidemu k 12. minutě a risperidonu k 22. minutě. Množství pufru bylo navýšeno na 20:80 (v/v). Vhodný t_R měl lamotrigin. Ostatní analyty měly velmi dlouhý t_R .

5.3 Vybrané analyty

Hodnocení všech analytů včetně jejich nečistot probíhalo při pH 5,7; 10,0 (viz výše) a 2,8. Analýza nečistot a metabolitů kvetiapinu nepřinesla vhodné výsledky. V dalším testování nečistot a metabolitů se nepokračovalo. Pro další hodnocení byla vybrána právě tato léčiva: kvetiapin, zolpidem, risperidon a lamotrigin.

Bylo nutné určit vnitřní standard. Ze souboru léčiv, který obsahoval diazepam, nitrazepam, oxazepam, flunitrazepam a medazepam, byl jako nejvhodnější IS zvolen medazepam vzhledem k jeho retenčnímu času a odezvě detektoru (obr. 21).

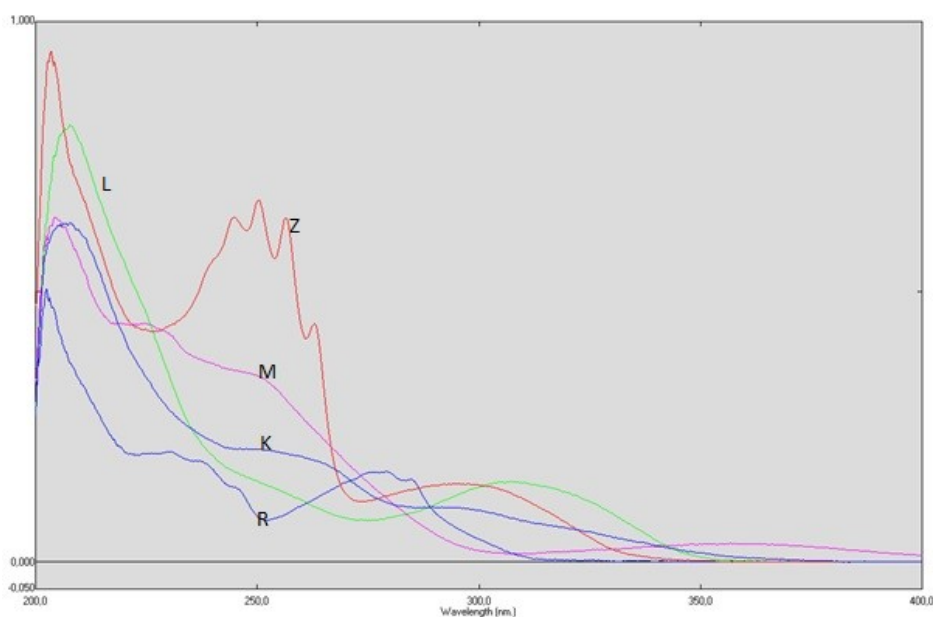


Obrázek 21 Retenční chování medazepamu v 1. a 2. nástřiku (MF 25:75, pH 2,8), detekce 250 nm

Vysvětlivky: černá – 1. nástřik, **ružová** – 2. nástřik

5.4 Detekce

Cílem spektrofotometrického měření bylo ověřit všechny vlnové délky s nejvyšší citlivostí u každého vybraného analytu. Do kyvety bylo odměřeno 100 μ l roztoku léčiva s koncentrací 0,1 mg/ml. Odpipetované množství bylo zředěno MeOH a obsah byl spektrofotometricky proměřen. Záznam měření je uveden na obr. 22. Z výsledného grafu byly testovány tyto vlnové délky: 210 nm, 215 nm, 225 nm, 230 nm, 240 nm a 250 nm. Při vlnových délkách 210 nm a 240 nm bylo dosaženo nejlepší citlivosti.

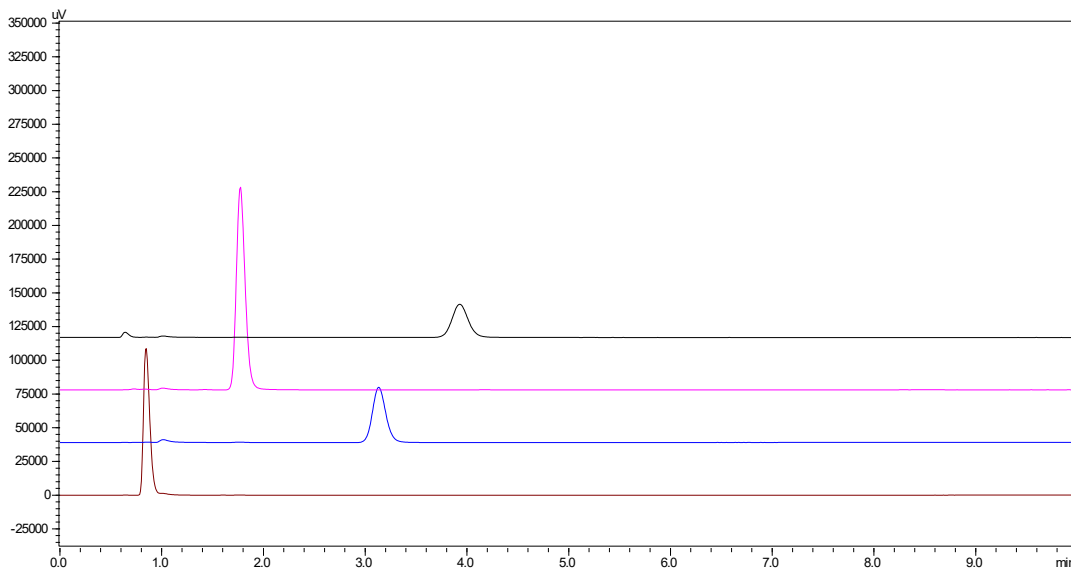


Obrázek 22 Absorpční spektrum methanolických roztoků léčiv a IS o koncentraci 0,1 mg/ml

Vysvětlivky: K – kvetiapin, Z – zolpidem, R – risperidon, L – lamotrigin, M – medazepam

5.5 Retenční chování vybraných analytů

Byla zopakována analýza vybraných analytů s MF 60:40 (v/v) pH 10,0. Výsledky této analýzy jsou uvedeny na obr. 23 a v tabulce 5.



Obrázek 23 Retenční chování analytů s MF 60:40 pH 10,0; detekce 250 nm

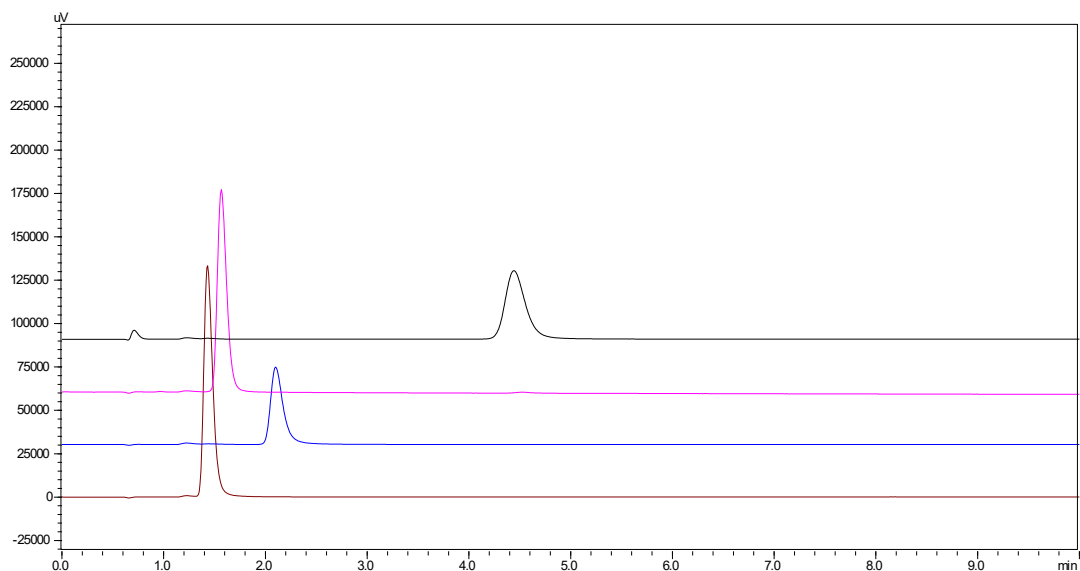
Vysvětlivky: černá – kvetiapin, růžová – zolpidem, modrá – risperidon, hnědá – lamotrigin

Komentář: Z chromatogramu je patrné, že lamotrigin byl eluován v t_R pod 1 minutu. Při analýze z plazmy by mohl být jeho pík zaměněn s odezvou čisté plazmy.

Tabulka 5 Retenční čas a tailing faktor při MF 60:40 pH 10,0

MF 60:40 (v/v) pH 10,0	t_R	T_F
Kvetiapin	3,76	1,16
Zolpidem	1,71	1,33
Risperidon	3,18	1,22
Lamotrigin	0,82	1,52

Hodnocení pomocí MF pH 2,8 probíhalo ve stejných poměrech jako při pH 5,7 a 10,0. Navíc byly zkoušeny poměry 35:65 a 25:75 (v/v). Vybraný příklad ukazuje MF 40:60 s pH 2,8 (obr. 24 a tab. 6).



Obrázek 24 Retenční chování léčiv s MF 40:60 pH 2,8; detekce 250 nm

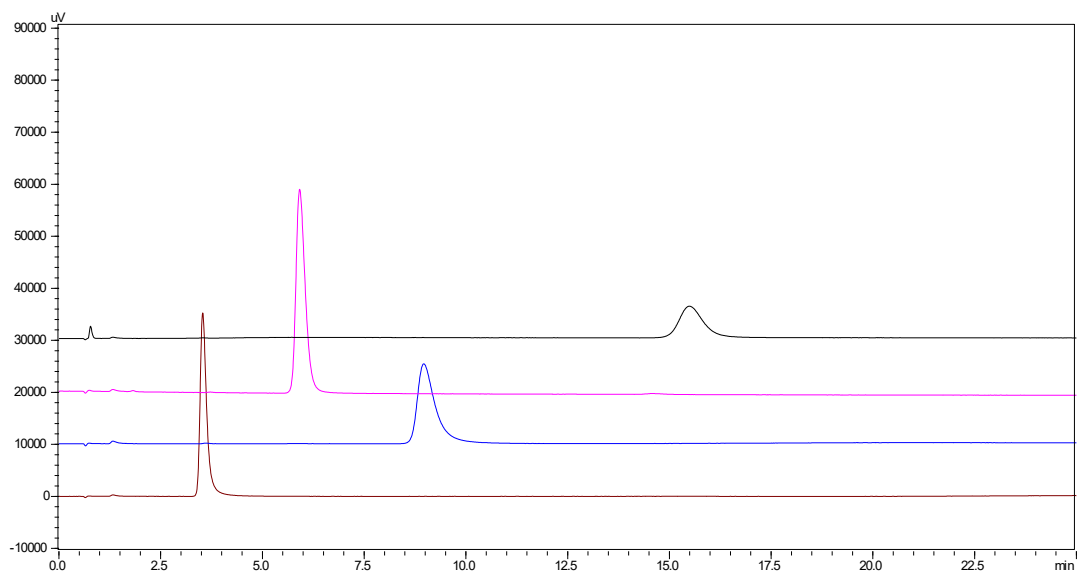
Vysvětlivky: *černá* – kvetiapin, *růžová* – zolpidem, *modrá* – risperidon, *hnědá* – lamotrigin

Komentář: Lamotrigin a zolpidem se eluovaly velmi blízko sebe, proto byl poměr MF změněn na 25:75.

Tabulka 6 Retenční čas a tailing faktor při MF 40:60 pH 2,8

MF 40:60 (v/v) pH 2,8	t_R	T_F
Kvetiapin	4,44	1,34
Zolpidem	1,56	1,40
Risperidon	2,11	1,60
Lamotrigin	1,43	1,51

Obsah pufru byl navýšen s cílem rozdělení píků lamotriginu a zolpidemu. Testovaná MF 25:75 pH 2,8 poskytovala lepší výsledky než předchozí poměr (obr. 25 a tab. 7).



Obrázek 25 Retenční chování léčiv s MF 25:75 pH 2,8; detekce 250 nm

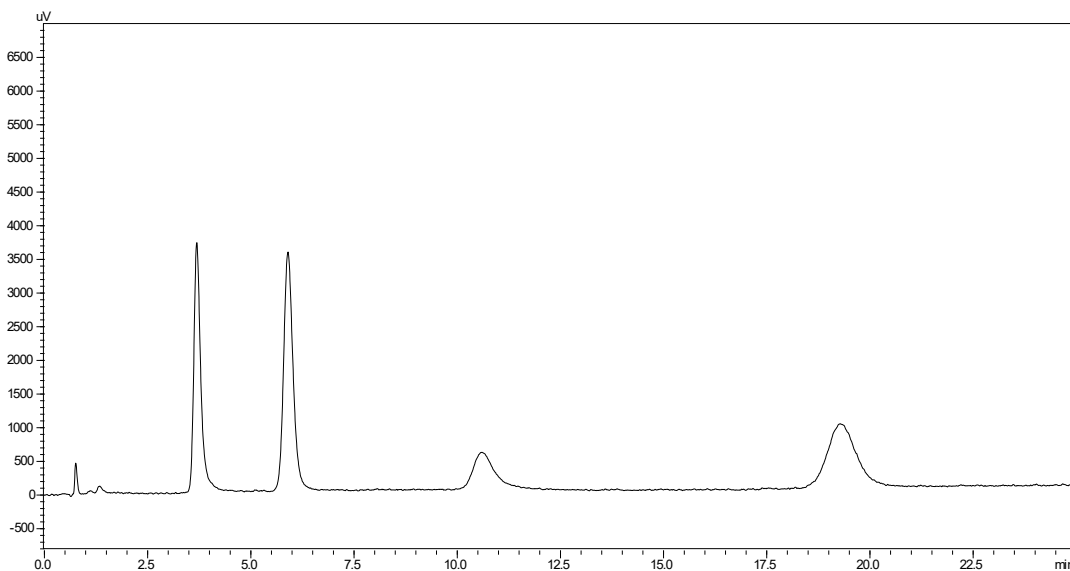
Vysvětlivky: *černá* – kvetiapin, *růžová* – zolpidem, *modrá* – risperidon, *hnědá* – lamotrigin

Komentář: Došlo k oddělení píků lamotriginu a zolpidemu, ale t_R se oproti předchozí analýze zvýšil.

Tabulka 7 Retenční čas a tailing faktor při MF 25:75 pH 2,8

MF 25:75 (v/v) pH 2,8	t_R	T_F
Kvetiapin	15,49	1,28
Zolpidem	5,91	1,42
Risperidon	8,96	1,83
Lamotrigin	3,53	1,64

Poté byl vytvořen směsný roztok vybraných analytů a byl podroben HPLC analýze. Nejprve byla použita MF 60:40 (v/v) pH 10,0, ale nebyly detekovány všechny analyty a proto bylo ukončeno další testování. Pro další hodnocení byla vybrána MF 25:75 (v/v) pH 2,8. Byly detekovatelné píky všech analytů (obr. 26).



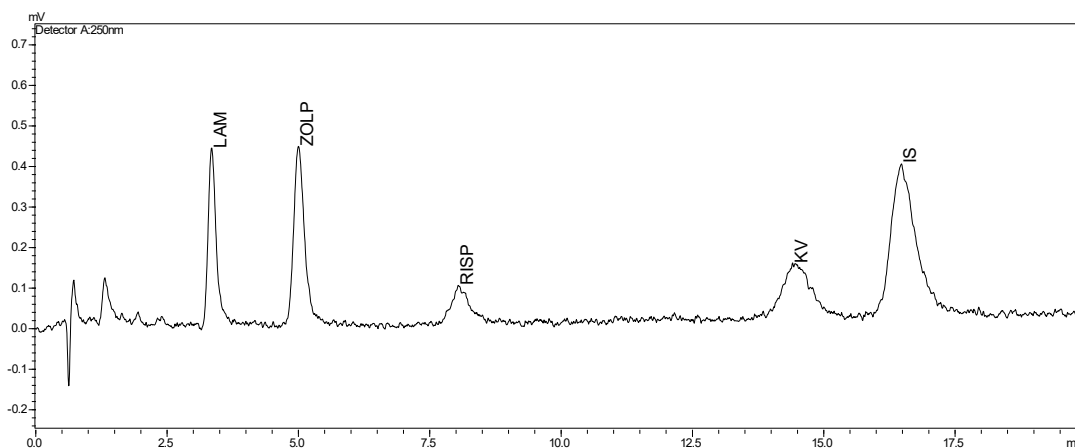
Obrázek 26 Retenční chování směsného roztoku s MF 25:75 pH 2,8; detekce 250 nm

Vysvětlivky: zleva: lamotrigin, zolpidem, risperidon, kvetiapin

5.6 Analýza z biologického materiálu při pH 2,8

Byly zkoušeny různé úpravy pH plazmy a byly přidávány různé objemy deproteinizačních činidel uvedené v kap. 4.2.5. Poté byl zvolen nejvhodnější postup deproteinace. Bylo použito 50 μ l králičí plazmy, 10 μ l směsného standardu, 5 μ l IS a 10 μ l 17,5% amoniaku. Směs byla třepána 10 sekund. Poté bylo přidáno 250 μ l ACN a eppendorfka s obsahem byla protřepána 30 sekund, poté byl obsah centrifugován. Bylo odebráno 200 μ l acetonitrilové vrstvy a vloženo do inzertu k následné HPLC analýze s MF 25:75 (v/v) pH 2,8. Úprava deproteinací nebyla z hlediska výsledků ideální, protože nebyly detekovány všechny analyty ze směsi. Byla zvolena úprava extrakcí kapalina-kapalina za účelem detekování všech analytů a zvýšení výtěžnosti.

Byly zkoušeny různé úpravy acidobazických vlastností plazmy a byla přidávána různá extrakční činidla (uvedená v kap. 4.2.5). Pro liquid-liquid extrakci byl vybrán postup obsahující 200 μ l králičí plazmy, 20 μ l směsné roztoku, 30 μ l IS, 40 μ l 17,5% amoniaku a obsah byl protřepán. Bylo přidáno 500 μ l ethylacetátu, protřepáno 2 minuty, centrifugováno 5 minut při 10 000 otáčkách/min a bylo odebráno 450 μ l k odpaření pomocí dusíku. K odparku bylo přidáno 100 μ l MeOH a celý obsah byl vložen do inzertu k analýze (obr. 27). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.



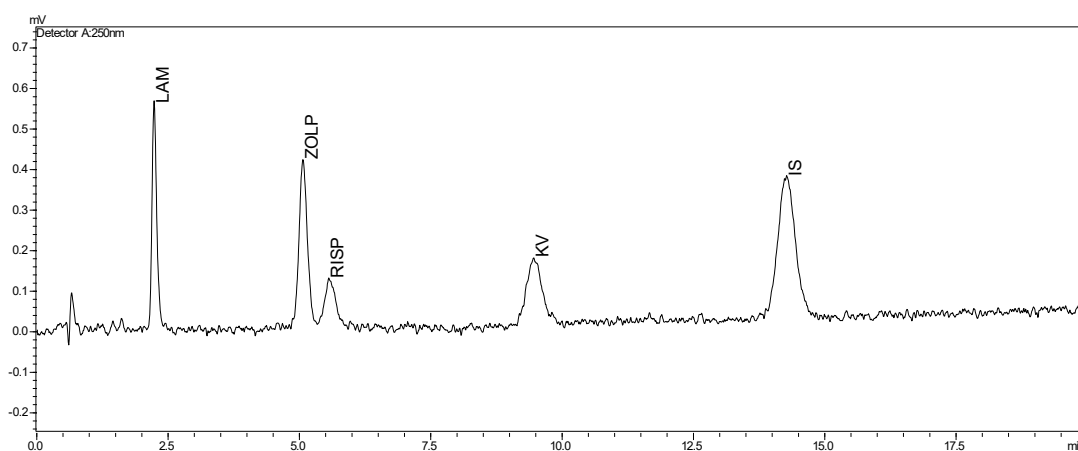
Obrázek 27 Nástřik směsného roztoku s IS po úpravě LLE, MF 25:75 (v/v) pH 2,8; detekce 250 nm

Vysvětlivky: LAM – lamotrigin, ZOLP – zolpidem, RISP – risperidon, KV – kvetiapin, IS

Tabulka 8 Retenční časy, rozlišení a výtěžnost po LLE

MF 25:75 (v/v) pH 2,8	t_R	R_S	výtěžnost (%)
Lamotrigin	3,34	-	81,88
Zolpidem	4,99	5,52	81,94
Risperidon	8,04	6,39	43,51
Kvetiapin	14,03	9,79	47,53
IS	16,48	2,81	-

S cílem snížit retenční časy a dobu analýzy po úpravě LLE bylo přistoupeno k výměně MeOH za ACN v mobilní fázi. Při poměru 25 (ACN): 75 (pufr pH 2,8) v/v, byla doba analýzy zkrácena na 5 minut, ovšem všechny analyty se eluovaly velmi blízko sebe. Poměr byl změněn na 20:80 a 30:70 (v/v), ale nebyla zaznamenána výrazná změna. Obsah pufru byl zvýšen na poměr 15:85 (v/v), kdy se zolpidem a risperidon eluovaly hned za sebou (obr. 28). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.



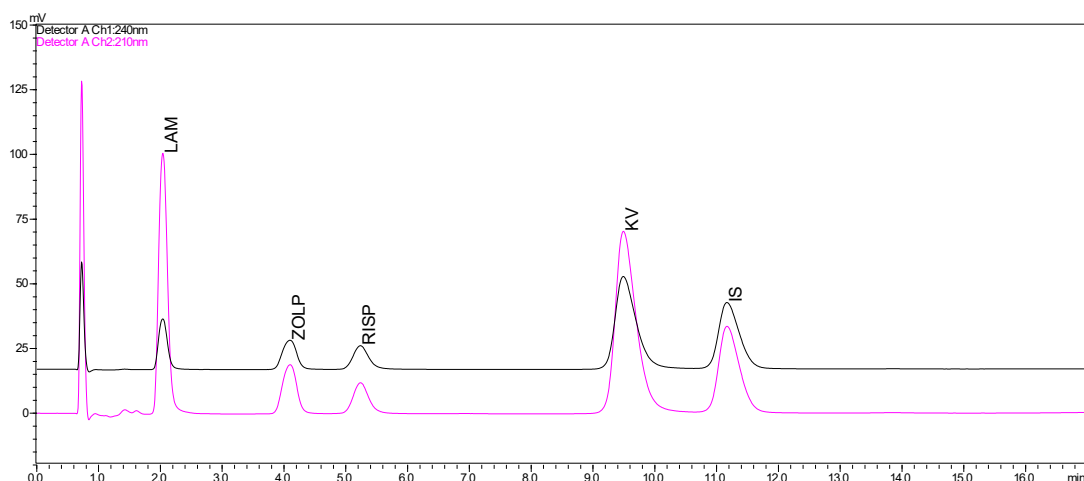
Obrázek 28 Nástřík směsného roztoku s IS po úpravě LLE , MF 15:85 (v/v) pH 2,8, detekce 250 nm

Vysvětlivky: LAM – lamotrigin, ZOLP – zolpidem, RISP – risperidon, KV – kvetiapin, IS

Tabulka 9 Retenční časy, rozlišení a výtěžnost

MF 15:85 (v/v) pH 2,8	t_R	R_S	výtěžnost (%)
Lamotrigin	2,23	-	92,88
Zolpidem	5,06	11,90	94,28
Risperidon	5,56	1,36	45,05
Kvetiapin	9,46	8,34	48,00
IS	14,27	8,64	-

Bylo nutné tyto dva analyty (zolpidem a risperidon) od sebe oddělit. Byla zkoušena MF 10 (MeOH): 10 (ACN): 80 (pufr), v/v. Došlo k výraznému oddělení píků zolpidemu a risperidonu. Byla připravena MF 5:15:85 (v/v) s detekcí při 240 a 210 nm (obr. 29). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10 a 11. Došlo ke kýženému zkrácení t_R . Mobilní fáze s poměrem 5:15:80 (v/v) byla zvolena jako nejvhodnější.



Obrázek 29 Nástřik směsného roztoku s IS po úpravě LLE, MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8, detekce 240 nm a 210 nm

Vysvětlivky: zleva odezva plazmy, LAM – lamotrigin, ZOLP – zolpidem, RISP – risperidon, KV – kvetiapin, IS, detekce při 240 nm (černá), detekce při 210 nm (růžová)

Tabulka 10 Retenční časy, rozlišení a výtěžnost pro detekci 240 nm

MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8	t_R	R_S	výtěžnost (%)
Lamotrigin	2,03	-	97,66
Zolpidem	4,09	6,07	42,91
Risperidon	5,23	2,58	57,20
Kvetiapin	9,49	7,84	112,45
IS	11,16	2,7	-

Tabulka 11 Retenční časy, rozlišení a výtěžnost pro detekci 210 nm

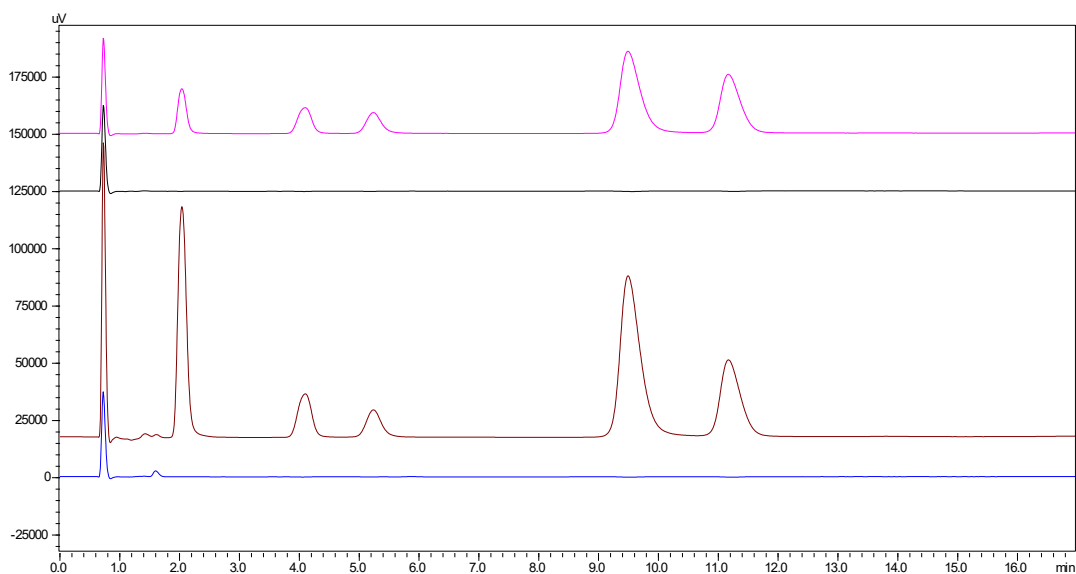
MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8	t_R	R_S	výtěžnost (%)
Lamotrigin	2,03	-	97,89
Zolpidem	4,09	6,07	44,60
Risperidon	5,23	2,59	55,10
Kvetiapin	9,49	7,87	104,46
IS	11,16	2,7	-

5.7 Parametry validace

Celý vývoj metody byl zaměřen na analýzu z biologického materiálu. Vyvinutá metoda extrakce kapalina-kapalina byla validována. Mezi validační parametry byly zařazeny selektivita, limit detekce a limit kvantifikace, linearita a přesnost. Limit detekce a kvantifikace byl určen pro kvetiapin, zolpidem, risperidon a lamotrigin. Pro další validační parametry byl zvolen lamotrigin.

5.7.1 Selektivita

Pro zjištění selektivity byl použit vzorek čisté plazmy a plazma se směsným roztokem o koncentraci 0,01 mg/ml. Byla použita MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8 (obr. 30).



Obrázek 30 Chromatogram s nástřiky čisté plazmy a plazmy se směsným roztokem, MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8, detekce 240 nm a 210 nm

Vysvětlivky: shora dolů nástřik směsného roztoku (růžová) a čisté plazmy při 240 nm (černá), nástřik směsného roztoku (hnědá) a čisté plazmy (modrá) při 210 nm

Komentář: Chromatogram dokládá nepřítomnost interferujících komponent a dostatečné oddělení píků.

5.7.2 Limit detekce a limit kvantifikace

Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) byly stanoveny pro léčiva uvedené v tabulce 12. Jejich hodnoty jsou vyjádřené ke koncentraci stanovovaných látek v plazmě.

Tabulka 12 Hodnoty limitu detekce a kvantifikace při 240 nm

	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Kvetiapin	0,11	0,36
Zolpidem	0,08	0,27
Risperidon	0,15	0,5
Lamotrigin	0,12	0,41

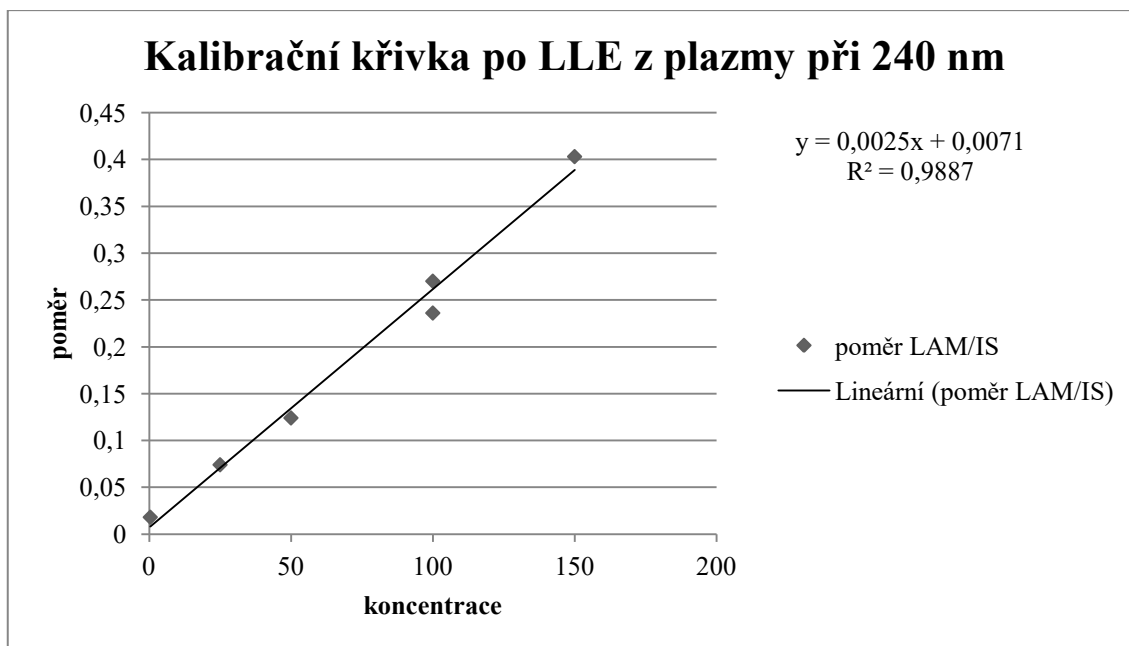
5.7.3 Linearita

Kalibrační křivka byla měřena na šesti koncentračních hladinách. Po sestrojení kalibrační křivky roztoku po provedení LLE byly získány rovnice pro výpočet přesné koncentrace a výtěžnosti zkoušeného roztoku.

Tabulka 13 Hodnoty kalibrační křivky pro lamotrigin při 240 nm

Koncentrační úroveň	c (µg/ml)	Poměr ploch LAM/IS
150%	150	0,403
100%	100	0,270
80%	100	0,236
50%	50	0,124
25%	25	0,074
LOQ	0,4	0,018

Komentář: Aby bylo docíleno koncentrační úrovně 80%, bylo přidáno do plazmy 15 µl roztoku lamotriginu (c = 0,1 mg/ml) namísto obvyklých přidávaných 20 µl.

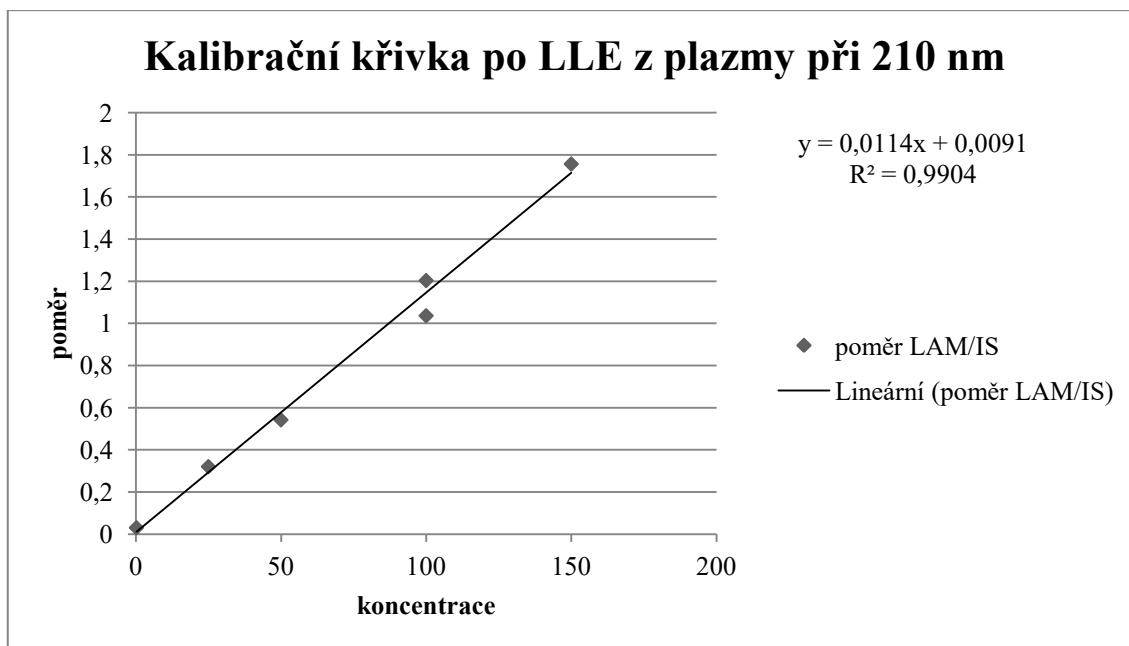


Obrázek 31 Graf závislosti poměru ploch LAM/IS na koncentraci lamotriginu v plazmě

Tabulka 14 Hodnoty kalibrační křivky pro lamotrigin při 210 nm

Koncentrační úroveň	c (µg/ml)	Poměr ploch LAM/IS
150%	150	1,756
100%	100	1,203
80%	100	1,036
50%	50	0,542
25%	25	0,320
LOQ	0,2	0,030

Komentář: Aby bylo docíleno koncentrační úrovně 80%, bylo přidáno do plazmy 15 µl roztoku lamotriginu (c = 0,1 mg/ml) namísto obvyklých přidávaných 20 µl.



Obrázek 32 Graf závislosti poměru ploch LAM/IS na koncentraci lamotriginu v plazmě

5.7.4 Přesnost

Vyjadřuje míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek. Přesnost byla určena při třech koncentracích. Od každého koncentračního stupně bylo hodnoceno 6 vzorků LLE. Byly hodnoceny tyto koncentrace lamotriginu: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml. Výsledky jsou uvedeny v tab. 15 a 16. Tabulky 15 a 16 uvádí průměrné plochy píků ze dvou nástřiků jak lamotriginu, tak IS při detekci 240 nm a 210 nm.

Tabulka 15 Stanovení přesnosti pro lamotrigin s detekcí při 240 nm

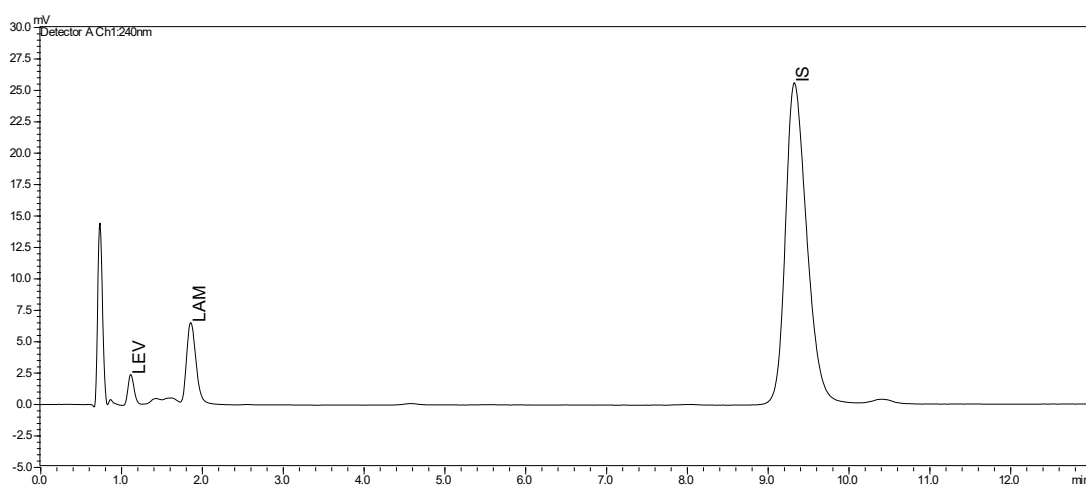
	Plochy píků při c = 100 µg/ml		Plochy píků při c = 50 µg/ml		Plochy píků při c = 25 µg/ml	
	Lamotrigin	IS	Lamotrigin	IS	Lamotrigin	IS
1	107308	291340	143399	739644	56381	777599
2	149299	254120	156184	814997	51192	751949
3	110274	244755	126470	607620	55333	711606
4	132252	210783	133592	729415	57364	760515
5	125961	196515	133071	761747	61721	822132
6	137812	231159	107011	557278	65957	809649
Průměr	127151	238112	133287,8	701783,5	57991,33	772241,7
SD	14777,16	30711,38	15075,17	89776,05	4719,581	36839,85
RSD	11,62%	12,90%	11,31%	12,79%	8,14%	4,77%

Tabulka 16 Stanovení přesnosti pro lamotrigin s detekcí při 210 nm

	Plochy píků při c = 100 µg/ml		Plochy píků při c = 50 µg/ml		Plochy píků při c = 25 µg/ml	
	Lamotrigin	IS	Lamotrigin	IS	Lamotrigin	IS
1	584231	381161	712136	956697	333642	1010165
2	605141	346951	768405	1064478	250514	788088
3	452783	317881	634561	790315	272382	732941
4	659647	342652	672024	947774	278510	799511
5	646767	256121	667410	989455	239046	942901
6	500277	299612	534501	723236	272541	1052027
Průměr	574807,7	324063	664839,5	911992,5	274439,2	887605,5
SD	75088,4	39542,76	71793,58	117590,7	29873,27	120207
RSD	13,06%	12,20%	10,80%	12,89%	10,89%	13,54%

5.8 Analýza reálných vzorků

Reálné vzorky představovalo krevní sérum získané od pacientů s obsahem lamotriginu. Vyvinutá metoda s MF 5 (MeOH):15 (ACN):80 (tlumivý roztok pH 2,8), v/v a vyvinutou LLE byla aplikována na reálné vzorky. Bylo použito 200 μ l krevního séra a další postup LLE byl stejný. Upravené vzorky byly podrobeny HPLC analýze. Testovaný vzorek obsahoval kromě lamotriginu i levetiracetam, rozlišení obou píků bylo $R_s = 3,96$. Lamotrigin s levetiracetamem se eluovaly blízko balastů z plazmy (obr. 33).



Obrázek 33 Nástřik reálných vzorků levetiracetamu a lamotriginu, MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8

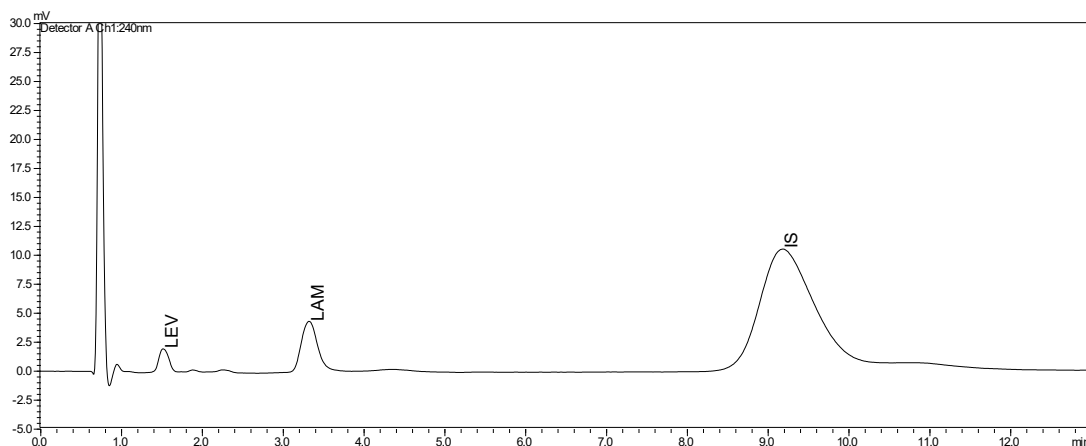
Vysvětlivky: zleva odezva plazmy, LEV – levetiracetam, LAM – lamotrigin, IS – medazepam, detekce 240 nm

Tabulka 17 Retenční čas a výtěžnost lamotriginu, MF 5:15:80 (v/v)

MF 5:15:80 (v/v) pH 2,8	t_R	Plocha píků	c (mg/ml)	Výtěžnost (%)
Lamotrigin	1,85	54841	0,01255	94,65
IS	9,32	471746	-	-

Následně byla testována možnost úpravy validované metody pro společnou analýzu obou látek. Byla zkoušena MF se zvýšeným obsahem pufru s poměrem 2,5:7,5:90 (v/v). Tato analýza byla problémová v tom, že nebyl detekován pík IS. Zastoupení organické fáze bylo zmenšeno a již nepřinášelo vhodné výsledky. V důsledku těchto problémů bylo navýšeno množství ACN. Vznikl poměr

2,5:12,5:85 (v/v). Byl zaznamenán posun t_R lamotriginu. Píky levetiracetamu a lamotriginu byly více oddělené a více oddělené od balastů z plazmy, rozlišení obou píků bylo $R_S = 5,96$, (obr. 34).



Obrázek 34 Nástřik reálných vzorků levetiracetamu a lamotriginu, MF 2,5:12,5:85 (v/v) pH 2,8

Vysvětlivky: zleva odezva plazmy, LEV – levetiracetam, LAM – lamotrigin, IS, detekce 240 nm

Tabulka 18 Retenční čas a výtěžnost lamotriginu, MF 2,5:12,5:85 (v/v)

MF 2,5:12,5:85 (v/v) pH 2,8	t_R	Plocha píků	c (mg/ml)	Výtěžnost (%)
Lamotrigin	3,32	70955	0,01185	89,37
IS	9,18	467956	-	-

HPLC analýza s využitím posledních dvou zmíněných poměrů MF představovala nástin toho, jak je lze v budoucnu využít k dalšímu hodnocení biologických vzorků. K optimalizaci analýzy s využitím těchto MF bude pravděpodobně potřeba vyzkoušet gradientovou eluci a případně ještě upravit poměr organické fáze a tlumivého roztoku.

Metodou používanou ve FN HK bylo stanoveno množství levetiracetamu 109,6 $\mu\text{mol/l}$ a lamotriginu 51,77 $\mu\text{mol/l}$, resp. 18,6 mg/l a 13,26 mg/l a naší metodou bylo nalezeno 12,55 mg/l lamotriginu, což je o 5,37 % méně. Metoda pro stanovení lamotriginu ve FN HK je prováděna na koloně C18 (150×4,6 mm), 5 μm s předkolonou C18 (3,9×20 mm, Waters); průtok isokratický 1,0 ml/min; teplota na koloně: 40°C;

mobilní fáze ACN – octanový pufr pH 6,8 (28% – 72%); nástřik 25 μ l; DAD spektrum: 190-600 nm, hodnocení při 306 nm; doba analýzy 8 min. Pro zjištění hladiny levetiracetamu by musel být použit jeho standard o známém obsahu, který nebyl k dispozici. Pro úplné srovnání obou metod by muselo být provedeno větší množství měření a na větším počtu vzorků.

6. ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce se zabývá analyzovanými léčivy, jejich fyzikálně-chemickými a farmakologickými vlastnostmi. Jsou zde uvedeny jak mechanismy účinku, indikace, tak i farmakokinetické vlastnosti. Dále se teoretická část věnuje především vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Kapitoly zahrnují základní princip, instrumentaci, separační způsoby, druhy stacionárních fází, detekční systémy a hodnotící parametry. V rámci teoretické části jsou také uvedeny způsoby úpravy biologických vzorků před analýzou.

Experimentální část uvádí retenční chování vybraných léčiv při hodnotách pH 5,7; 10,0 a 2,8. Byla použita kolona Kinetex EVO C18 (150,0 x 3,0 mm). Postupně byly vystřídány různé poměry organické fáze a roztoku pufru pro každou hodnotu pH zvlášť. U mobilní fáze s tlumivým roztokem o pH 5,7 a 10,0 nevykazovaly hodnocené léčiva tak dobré retenční chování jako u mobilní fáze s pufrům o pH 2,8. Zmíněné mobilní fáze, úpravy poměrů a výměna MeOH za ACN, použití gradientové eluce či spojení s hmotnostní spektrometrií představují další možnosti využití při budoucím testování. K dalšímu hodnocení byla vybrána mobilní fáze s fosforečnanovým pufrům o pH 2,8 a byl nalezen nejvhodnější poměr 5 (MeOH):15 (ACN):80 (pufr). Byla vyvíjena metoda pro extrakci kvetiapinu, zolpidemu, risperidonu a lamotriginu z plazmy. Ethylacetát byl zvolen nejvhodnějším extrakčním činidlem pro své výsledky. Jako vnitřní standard byl vybrán medazepam. Analýza probíhala při průtoku 1ml/min s UV spektrofotometrickou detekcí při 210 nm a 240 nm. Injikovaný objem vzorků po úpravě byl 10 μ l. Validační parametry byly testovány u lamotriginu. Dále byly za výše uvedených podmínek a se stejnou mobilní fází analyzovány reálné biologické vzorky od pacientů.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT_{1A}, 5-HT₂ – 5-hydroxytryptamin

7-OH – 7-hydroxykvetiapin, metabolit kvetiapinu

ACN – acetonitril

APCI – Atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku

API – Atmospheric pressure ionization, ionizace za atmosférického tlaku

APPI – Atmospheric pressure photoionization, fotoionizace za atmosférického tlaku

BEH – Bridge ethyl hybride, technologie ethylenových můstkových hybridů

CAD – Corona-discharge detector, aerosolový detektor nabitých částic

CNS – centrální nervový systém

CRL – chemická referenční látka

D₁, D₂ – dopaminové receptory

DAD – Diode array detectors, detektor s diodovým polem

ESI – Electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

GC – Gas chromatography, plynová chromatografie

GPC – Gel permeation chromatography, gelová permeační chromatografie

H₁ – histaminový receptor

HDL – High density lipoprotein, vysokodenzitní lipoprotein

HILIC – Hydrophilic interaction chromatography, hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – High Performace Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IEC – Ion exchange chromatography, iontově výměnná chromatografie

IS – Internal standard, vnitřní standard

KV – kvetiapin

LAM – lamotrigin

LC-MS – Liquid chromatography-mass spectrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LDL – Low density lipoprotein, nízkodenzitní lipoprotein

LEV – levetiracetam

LLE – Liquid-liquid extrakce, extrakce na kapalně fázi

MARTA – Multiacting receptor targeted antagonists, multireceptoroví antagonisté

MeOH – methanol

MF – mobilní fáze

Mr – relativní molekulová hmotnost

NOR – norkvetiapin, metabolit kvetiapinu

NP-HPLC – Normal phase high performance liquid chromatography, chromatografie na normálních fázích

PDA – Photodiode array, detektor s diodovým polem

PS-DVB – kopolymer polystyrenu a divinylbenzenu

QT interval – vzdálenost mezi kmitem Q a koncem vlny T

RISP – risperidon

RP-HPLC – Reversed phase high performance liquid chromatography, kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech

R_S – rozlišení

SDA – Serotonine dopamine antagonists, antagonisté serotoninu a dopaminu

SEC – Size exclusion chromatography, molekulová vylučovací chromatografie

SPE – Solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

T_F – Tailing factor, míra souměrnosti píku

t_R – retenční čas

UV – Ultra violet, ultrafialová oblast světla

UV/VIS – Ultra violet/visible, ultrafialová a viditelná oblast světla

ZOLP – zolpidem

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Český lékopis 2017. Praha: Grada Publishing, a.s., 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
2. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
3. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 15. 2. 2017. Souhrn údajů o přípravku Kventiax 300mg. [cit. 2017-10-20]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0111875>
4. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 11. 5. 2016. Souhrn údajů o přípravku Quetiapin Teva 25 mg. [cit. 2017-10-20]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0136089>
5. National Center For Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [Online] aktualizováno 16. 12. 2017 [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281025#section=Top>
6. Lincová, D.; Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
7. Bakken, G. V.; Rudberg, I.; Christensen, H.; Molden, E.; Refsum, H.; Hermann, M. Metabolism of Quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in Presence or Absence of Cytochrome B5. *Drug Metabolism And Disposition*. 2009. Sv. 37, 2, stránky 254-258. Dostupné také z: <http://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/37/2/254.full.pdf>
8. National Center For Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [Online] aktualizováno 24. 2. 2018 [cit. 2018-2-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441338#section=Top>
9. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 29. 3. 2017. Souhrn údajů o přípravku Zolpidem Mylan 10 mg [cit. 2017-10-25]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0146894&tab=info>
10. Malešević, M.; Zivanović, L.; Protić, A.; Radišić, M.; Lausević, M.; Jović, Z.; Zečević, M. Stress degradation studies on zolpidem tartrate using LC-DAD and LC-MS methods. *Acta Chromatographica*. Květen 2013. Sv. 26, 1, stránky 81-96. Dostupné také z: <http://www.akademaii.com/doi/abs/10.1556/AChrom.26.2014.1.8>

11. Malešević, M.; Živanović, L.; Protić, A.; Jović, Z. Multiobjective Optimization Approach in Evaluation of Chromatographic Behaviour of Zolpidem Tartrate and Its Degradation Products. *Chromatographia*. Srpen 2011. Sv. 74, 3-4, stránky 197-208. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10337-011-2064-9>
12. National Center For Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [Online] aktualizováno 24. 2. 2018 [cit. 2018-2-26]. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5073#section=Top>
13. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 21. 1. 2015. Souhrn údajů o přípravku Risperidon Farmax 3 mg [cit. 2017-11-04]. Dostupné z:
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0197637&tab=info>
14. National Center For Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [Online] aktualizováno 24. 2. 2018 [cit. 2018-2-26]. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3878#section=Top>
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] aktualizováno 6. 4. 2017. Souhrn údajů o přípravku Lamictal 100 mg [cit. 2017-11-15]. Dostupné z:
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0151057>
16. Zárubová, J.; Doležal, T. Lamotriginum. *Remedia* [online]. 2002(6/2002), 375-380 [cit. 2017-11-16]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Lamotriginum/6-I-g7.magarticle.aspx>
17. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: HPLC – historie a základní principy [online]. [cit. 2018-01-03]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod_resource/content/7/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%201_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf
18. Kazakevich, Y.; Lobrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-047-1681-625.
19. Klimeš, J. a kol.. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové, 2015. ISBN: 978-80-2608175-3
20. Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3

21. Laboratoryinfo.com. [Online] aktualizováno 28. 7. 2015. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
22. Waters The Science Of What's Possible. [Online] 2018. How Does High Performance Liquid Chromatography Work? [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
23. Hplc.cz. [Online] aktualizováno 19. 6. 2016. Teorie HPLC. [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
24. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: HPLC – popis základního hardwaru [online]. [cit. 2018-01-04]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%20HPLC%20instrumentace.pdf
25. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: HPLC – stacionární fáze a separační módy [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%20Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf
26. Vávrová, J. [Online] Gelová permeační chromatografie. [cit. 2018-02-17]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZG.htm>
27. Sielc. [Online] 2018. HILIC. [cit. 2018-02-17]. Dostupné z: http://www.sielc.com/Technology_HILIC.html
28. Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanská, M.; Zvolánková, M.. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*. 2007. Sv. 101, stránky 190-199. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf
29. Jandera, P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of separation science*. Květen 2008. Sv. 31, stránky 1421-1437. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jssc.200800051>
30. Zirchrom Separations. [Online] 2018. ZirChrom[®]-PBD Method Development Companion. [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: <http://www.zirchrom.com/PBDUse.asp>

31. Chromedia [Online] 2018. Hybrid Stationary Phases. [cit. 2018-02-17].
Dostupné z:
[http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=nvlh1DsHiemBpdmBIIecCdB
&subNav=htxjqDsHiemBpdmBIIecCdBL](http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=nvlh1DsHiemBpdmBIIecCdB&subNav=htxjqDsHiemBpdmBIIecCdBL)
32. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: HPLC – detektory [online]. [cit. 2018-01-20]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf
33. Chromatographyonline.com. [Online] 2018. The LCGC Blog: Diode Array Detector Settings – Five Minutes To Change Your Chromatography Forever. [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>
34. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie [online]. [cit. 2018-01-28]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce%206_MS.pdf
35. Fridecký, D.; Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2012. Sv. 20, 41, stránky 152-157. Dostupné také z:
<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
36. Ho, C., et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews*. Únor 2003. Sv. 24, 1, stránky 3-12. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>
37. Phenomenex. [Online] 2018. Kinetex. Yes You Can! [cit. 2018-02-24].
Dostupné z: <http://www.muso.ro/download/Brosura%20Kinetex.pdf>
38. Chromservis. [Online] 2018. Gemini NX. [cit. 2018-02-24]. Dostupné z:
<https://www.chromservis.eu/i/gemini-nx/c/more-about-chromatography>
39. Phenomenex. [Online] 2018. Gemini HPLC Information. [cit. 2018-02-24].
Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Gemini>

40. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *Kvalitativní a kvantitativní analýza, vývoj analytické metody* [online]. [cit. 2018-03-01].
Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241561/mod_resource/content/5/Lekce%207_Kvalita%2C%20kvantita%2C%20vyvoj%20metody.pdf
41. Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
42. Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém materiálu, úprava vzorku* [online]. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z:
https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/251418/mod_resource/content/8/Lekce%208_Bioanal%C3%BDza%2C%20%C3%BAprava%20vzorku.pdf
43. Pedersen-Bjergaard, S.; Gjølstad, A.; Halvorsen, T. G. *Sample Preparation*. [Online] Aktualizováno 22. 5. 2015 [cit. 2018-03-04]. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118716830.ch6/pdf>