

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

**Problém validace automatické HPLC analýzy v bioanalýze
exogenních látek pro potřeby analytické toxikologie**

Bakalářská práce

Děkuji doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za jeho vstřícnost a pomoc.

Děkuji PharmDr. Viktoru Voříškovi za jeho odborné vedení a cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

Děkuji také prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., přednostovi Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Obsah

1. Úvod	5
2. Cíl práce	7
3. Teoretická část	9
3.1 Chromatografické metody	10
3.1.1 Rozdělení chromatografie	10
3.2 Kapalinová chromatografie	12
3.2.1 Adsorpční kapalinová chromatografie	12
3.2.2 Rozdělovací kapalinová chromatografie	13
3.2.3 Ionově výměnná chromatografie	14
3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	14
3.3.1 Kapalinový chromatograf	15
3.3.1.1 Tlaková pumpa a směšovač mobilní fáze	15
3.3.1.2 Dávkovací zařízení	16
3.3.1.3 Chromatografické kolony	16
3.3.1.4 Detektory.....	17
3.4 Analytický systém REMEDI HS	18
3.4.1 Princip	18
3.4.2 Detekce	19
3.4.3 Identifikace píků	19
4. Experimentální část	22
4.1 Popis přístroje a příslušenství	23
4.1.1 Základní parametry přístroje	25
4.1.2 Příslušenství	25
4.1.2.1 Chromatografické kolony	25
4.1.2.2 Reagencie	26
4.1.2.3 Vnitřní standardy, kontrola	27
4.1.2.4 Mikrozkuřavky	27
4.2 Příprava před analýzou	27
4.2.1 Příprava vnitřních standardů	27
4.2.2 Příprava Check Mix	28
4.2.3 Příprava směsné moče	28
4.2.4 Navážení vybraných látek	29

4.2.5 Příprava vzorku – moče	29
4.3 Vlastní měření	29
4.3.1 Kalibrace	29
4.3.2 Měření vzorků	30
5. Výsledky	31
6. Diskuse	45
7. Závěr	48
8. Literatura	50

1. Úvod

Toxikologie v širokém pojetí studuje negativní důsledky chemikálií na živé organismy. Může být rozdělena na rozmanité disciplíny, k nimž také patří klinická toxikologie. Klinická toxikologie kombinuje analytickou chemii a obecnou toxikologii. Zahrnuje detekci a identifikaci potenciálně škodlivé látky - drogy v biologických vzorcích. Nicméně identifikace v biologických vzorcích často vyžaduje určení nejen mateřské látky, ale i metabolitů.

Ve většině případů je požadován k úspěšnému vedení léčby kvalitativní močový toxikologický screening. Proto se mnoho laboratoří zajímá o širokospektrý záchyt neznámé látky ve vzorku pacienta. Aby byly rutinní toxikologické analýzy účinné, používané postupy musí být schopné identifikovat rozmanité látky s časovou dostupností. Je vhodných jen několik technik.

Jednou z nich jsou kapkovací reakce typické pro dané sloučeniny. Ačkoliv tyto testy jsou jednoduché, jsou limitovány malým počtem sloučenin.

Imunochemické metody dávají pozitivní výsledky pro určitou skupinu látek bez přesného určení látky.

Chromatografické metody nabízí rychlý a specifický rozsah detekce látek. Chromatografie na tenké vrstvě je dobře zavedená metoda pro velké spektrum analyzovaných látek. Nicméně vyžaduje zkušenost personálu, aby bylo zaručeno, že interpretace tenké vrstvy je správná. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se používá pro široké spektrum analýz, proto je velmi potřebná i v toxikologii. Hmotnostní spektrometrie je referenční metodou pro konfirmace sloučenin. Přesto není užívána v klinických laboratořích pro screening z důvodu její složitosti a neschopnosti dosahovat výsledky rychle.

REMEDi HS je analytické zařízení, které provádí široké spektrum záchytu toxikologicky významných látek v moči a séru. Jedná se o systém využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s přípravou a analýzou vzorku on-line. Průchod přes několik chromatografických kolon umožňuje extrakci, vyčištění a separaci léčiv při následné UV detekci.

2. Cíl práce

Cílem mé práce bylo ověřit, že analytický systém REMEDi HS lze využívat nejen pro kvalitativní screening léčiv a drog v klinické toxikologii. V případě potřeby je možno provádět i kvantitativní měření určených látek. K tomuto účelu je používán zvláštní režim přístroje, kdy dochází nejen k identifikaci látek, ale i k jejich kvantifikaci.

3. Teoretická část

3.1 Chromatografické metody¹

Chromatografické metody umožňují nejenom dělení velmi složitých směsí, ale také identifikaci a kvantitativní stanovení jednotlivých látek. Používají se rovněž k izolaci látek ve velmi čistém stavu, k analytické kontrole čistoty barviv, léčiv, rozpouštědel, k přečištění chemikálií apod. Mají široké uplatnění v biomedicině při izolaci bílkovin, enzymů, nukleových kyselin atd., ve farmakologii a toxikologii při terapeutickém monitorování hladin léčiv, sledování léčby u toxikomanů, průkazu a stanovení léčiv a toxických látek. V klinické biochemii mají význam při dělení steroidů, lipidů, aminokyselin, sacharidů, izoenzymů, vitamínů, hormonů, antibiotik atd.

V praxi je nejvíce používanou metodou chromatografie na tenkých vrstvách, vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo chromatografie plynová. Chromatografické metody se zakládají na postupném ustavování rovnováhy dělených látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivou, stacionární fází tvoří materiál, kterým je naplněna chromatografická kolona nebo ze kterého je zhotovena tenká vrstva, na níž dělení probíhá. Pohyblivou, mobilní fází představuje kapalina, tj. eluční činidlo (rozpouštědlo, pufr) nebo plyn, kterými jsou jednotlivé složky z kolony nebo z tenké vrstvy vymývány.

Dělené látky jsou různou rychlostí unášeny ve směru toku pohyblivé fáze a různou silou jsou zadržovány na pevné fázi. Tím dochází k separaci směsi. Při chromatografické analýze se k identifikaci a stanovení separovaných látek využívá jejich rozdílné pohyblivosti při dělení a chování při detekci.

3.1.1 Rozdělení chromatografie²

Chromatografických metod je velké množství, proto je dělíme podle různých hledisek.

Podle povahy fyzikálně-chemického děje, který převládá při separaci:

- Rozdělovací chromatografie - o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn)
- Adsorpční chromatografie - o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze (tuhá látka)

- Ionově výměnná chromatografie - o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku
- Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu), menší molekuly se v pórech zdržují déle (molekulově síťový efekt)
- Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu)

Podle povahy mobilní fáze:

- Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC) – mobilní fází je kapalina
- Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC) – mobilní fází je plyn

Podle uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová (sloupcová) chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
- Plošná (planární) chromatografie
 - tenkovrstevná - stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu
 - papírová - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru

Podle pracovního způsobu:

- Eluční chromatografie
- Frontální chromatografie
- Vytěšňovací chromatografie

Podle pracovního účelu:

- Analytická chromatografie
- Preparativní chromatografie

Uvedené rozdělení je pouze informační, neboť jednotlivé pracovní techniky se většinou kombinují.

3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační analytická metoda založená na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi. Mobilní fází je kapalina. O rozdělení složek vzorku rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Jednotlivé analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány. Čas, který stráví v mobilní resp. ve stacionární fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii².

Kapalinová chromatografie je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn. Jedná se obvykle o eluční metodu.

3.2.1 Adsorpční kapalinová chromatografie²

Adsorpční kapalinová chromatografie (LCS) využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem. Jako adsorbenty se používají zrnité materiály na bázi silikagelu. Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch těchto adsorbentů. Na povrchu zrn se nachází silanolové skupiny. Analyt je zadržován polárními interakcemi. Adsorpční aktivita adsorbentu je dána jeho polaritou a počtem adsorpčních míst. Přítomnost vody v systému snižuje jeho aktivitu, protože se váže na adsorpční místa.

Rozpouštědlo i rozpuštěné látky soutěží o místa na povrchu stacionární fáze. Vhodná volba rozpouštědla je proto důležitá pro eluci analytu. Nepochární analyty jsou eluovány nepolárními rozpouštědly a polární analyty polárními.

Mobilní fáze by neměla mít příliš velkou viskozitu, aby nekladla velký odpor proti převodu hmoty a protékala kolonou při určitém tlaku s dostatečnou rychlostí. Nesmí chemicky narušovat nebo vymývat stacionární fázi.

Mobilní fáze je charakterizována svojí eluční silou. Čím má rozpouštědlo větší eluční sílu, tím více se adsorbuje na stacionární fázi, a tím rychleji eluuje

složky, protože s nimi soutěží o místo na povrchu adsorbentu. Eluční síla roste v pořadí pentan, toluen, benzen, ethylbromid, propanol, ethylacetát, isopropylalkohol, dioxan, ethanol, aceton.

Velikost adsorpce dané složky roste s klesající hodnotou eluční síly rozpouštědla a rostoucí polaritou vlastních funkčních skupin. Nejkratší retenční časy mají nepolární alifatické uhlovodíky, po nich následují aromatické uhlovodíky, halogensloučeniny, ethery, terciární aminy, nitrosoučeniny, ketony, aldehydy, primární aminy, alkoholy, fenoly a nejdelší retenční časy mají velmi polární karboxylové a sulfonové kyseliny.

3.2.2 Rozdělovací kapalinová chromatografie

V rozdělovací kapalinové chromatografii (LLC) se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Mobilní fáze unáší analyty, stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči. Nosičem nejčastěji bývá silikagel, křemelina, silikáty a celulóza. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity^{2,3}.

V praxi se nejvíce uplatňuje systém obrácených fází (*Reversed-Phase Chromatography* – RPC). Stacionární fáze je nepolární (hydrofobní) rozpouštědlo a mobilní fází je polární (hydrofilní) rozpouštědlo².

Velmi se osvědčily chemicky modifikované stacionární fáze, které se připravují silylací silikagelu. Podle vázané skupiny mají různou polaritu od nepolárních, vysoce hydrofobních, používaných pro obrácený systém fází, až po polární.

Příklady substituentů: přes nepolární oktadecyl $-C_{18}H_{37}$, oktyl $-C_8H_{17}$, ethyl $-C_2H_5$, až k polárnějším substituentům amino $-(CH_2)_3NH_2$, cyano $-(CH_2)_3CN$ ³. V případě oktadecylsilikagelu a oktylsilikagelu je na povrchu lipofilní kartáč, který funguje jako zakotvená lipofilní kapalina⁴.

Mobilní fází je směs polárních rozpouštědel (methanol, acetonitril) ve směsi s vodou nebo puřem.

Složky jsou separovány na základě rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Lipofilnější molekuly jsou více zadržovány v lipofilním kartáči, hydrofilnější molekuly více v mobilní fázi. V lipofilním kartáči je analyt zadržován hydrofobními interakcemi, Londonovými silami a van der Waalsovými silami⁴.

3.2.3 Iontově výměnná kapalinová chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je realizována jen jako kapalinová chromatografie. Stacionární fází je iontoměnič. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celuloza, dextran aj.) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy².

Iontoměniče se dělí na anexy a katexy. Anexy jsou vysokomolekulární nerozpustné báze (kationty). Mají funkční skupiny silně bazické (amoniové NR_3^+), slabě bazické (aminoskupiny) a speciální (fosfoniové, sulfonové). Slouží k výměně anionů. Katexy představují vysokomolekulární nerozpustné kyseliny (aniony). Mají silně kyselé funkční skupiny (sulfoskupiny), slabě kyselé (karboxylové skupiny) a velmi slabě kyselé (fenolické skupiny). Slouží k výměně kationů⁵.

Iontově výměnnou chromatografií lze dělit pouze elektrolyty schopné existence v iontové podobě. Využívá se jak k separaci slabých organických kyselin a zásad, tak i anorganických iontů. Podstatou separace je rozlišná afinita dělených látek k iontovým skupinám iontoměniče⁶.

Mobilní fází bývají pufrů. Retence je řízena změnou pH nebo změnou iontové síly pufru².

3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je hojně užívaná analytická technika. Je to separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení separovaných složek.

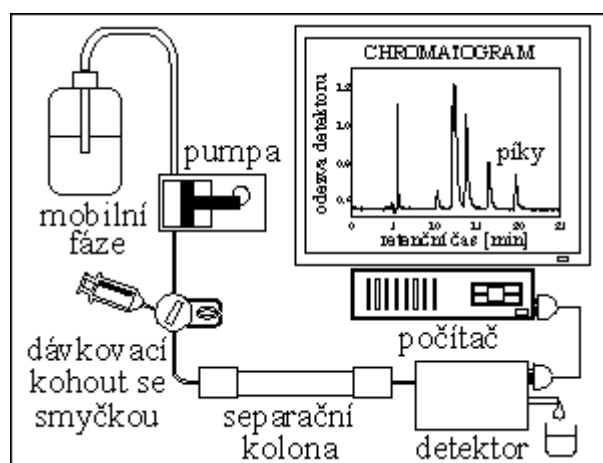
Tato instrumentální analytická technika dovoluje provádět rychlou, účinnou a reprodukovatelnou separaci látek ze směsi za vysokého tlaku, čímž dochází ke kratší době analýzy. Vysoká účinnost separace analytů je dána použitím úzkofrakčního sférického sorbentu s homogenními vlastnostmi povrchu silikagelových zrn (1,8 – 5,0 μm , v průměru 3,8 μm) v normálním módu nebo modifikovaný silikagel v reverzním módu stacionární fáze a definovaným

složením mobilní fáze. K hlavním výhodám také patří úspora mobilní fáze a možnost automatizace⁴.

3.3.1 Kapalinový chromatograf

Chromatograf pro HPLC je tvořen zásobníky mobilní fáze a vysokotlakou pumpou. Dávkovací zařízení slouží k nástřiku vzorku na kolonu. Po průchodu vzorku kolonou jdou rozdělené analyty do detektoru. Záznamy z detektoru jsou zpracovávány v počítači a je vtištěn výsledný protokol. Počítač také řídí celý chromatografický proces.

Schéma kapalinového chromatografu⁷



3.3.1.1 Tlaková pumpa a směšovač mobilní fáze

Mobilní fáze se do kolony čerpá pístovou nebo membránovou pumpou². Pumpa vhání rozpouštědlo do směšovače mobilní fáze, který pomocí přepínacích vysokotlakých ventilů mísí požadované složení mobilní fáze před jejím vstupem do dávkovacího zařízení a chromatografické kolony. Zpravidla docílí optimálního průtoku v souladu s van Deemterovou rovnicí v rozsahu od 0,5 - 2,0 ml za minutu při pracovním tlaku 6 - 15 MPa (maximálně až 40 MPa)⁴.

Naprogramované směšovací zařízení připravuje s využitím zásobníků různých kapalin směs mobilní fáze stálého složení nebo řídí změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace. Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce), nemění se eluční síla. Nebo se během separace složení mobilní fáze mění (gradientová eluce) za účelem rychlejšího vymytí komponent s dlouhými retenčními časy^{2,4}.

Pumpa nesmí být narušována mobilní fází a nesmí uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou zhotoveny z pryže nebo safíru. Jednočinná pístová pumpa by způsobovala rušivé tlakové rázy, proto jsou používány dvojčinné pumpy. Řízení mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulzů².

3.3.1.2 Dávkovací zařízení

Dalšími důležitými prvky HPLC chromatografu je dávkovací zařízení. Dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Pokud je použito injekční zařízení, musí být zhotoveno z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery). Injekční zařízení může být ovládáno ručně nebo automaticky. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkováním obtokovým dávkovacím šesticestným ventilem².

Autosampler je automatický dávkovač, který je vhodný při manipulaci s mnoha vzorky. Autosampler je řízen počítačem a umožňuje měření vzorků v sekvenci.

3.3.1.3 Chromatografické kolony²

Kolony používáme pouze náplňové. Mnoho různých aplikací kapalinové chromatografie podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně. Většinou jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (zpravidla 10 - 25 cm). Vnitřní průměr je 4,6 nebo 5 mm. Běžný průtok eluentu je 1 – 2 ml za minutu. Náplňový materiál pro analytické kolony má průměr 1,8 až 5 μm (kratší kolony jsou plněny jemnější náplní).

Jako ochrany hlavní kolony jsou hojně používány předklony umístěné mezi pumpu a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

Většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje temperování. Některé separace se významně zlepšují zvýšením teploty, což mnoho nových chromatografů umožňuje. Programová změna teploty se však v HPLC nevyužívá.

3.3.2 Detektory

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fázi. Průtoková cesta detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanější detektory jsou spektrofotometrické, fluorescenční, refraktometrické a hmotnostní spektrometry².

- Fotometrické detektory - patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Využívá se ultrafialové oblasti (UV) nebo viditelné (VIS). Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Dokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole (Diode Array Detektor – DAD) proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Rychle skenující UV-VIS detektor je schopen snímat celé absorpční spektrum a porovnávat poměry absorbancí^{3,4}.
- Fluorescenční detektory - jsou založeny na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak emitovat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Jsou vysoce selektivní. Vhodně lze kombinovat s fotometrickými detektory².
- Refraktometrické detektory - měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Nejsou příliš citlivé, ale jsou velmi univerzální. Při jejich použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu².

- Elektrochemické detektory - jsou založeny na redoxních změnách analytů⁴.
- Hmotnostní spektrometr - detekce je založena na ionizaci molekul analytu, separaci molekulových a fragmentových iontů na základě rozdílného poměru hmotnosti a velikosti náboje a následnou finální detekcí. Je spojena separační síla HPLC s detekční silou hmotnostní spektrometrie⁴.

3.4 Analytický systém REMEDi HS

REMEDi HS je analytický systém pro screening neznámých léčiv širokého spektra farmakologických skupin, návykových látek a jejich metabolitů v biologickém materiálu. Materiálem první volby je moč. Sérové vzorky lze také měřit po předchozí úpravě a filtraci při centrifugaci přes speciální filtr.

REMEDi HS využívá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s přípravou a analýzou vzorku on-line. Průchod přes několik chromatografických kolon zajišťuje vyčištění vzorku, jeho extrakci a separaci. Separované látky jsou detekovány multivlnovým UV detektorem.

Analytický systém lze používat nejen pro identifikaci složek ve vzorku, ale i pro stanovení vybraných látek ve zvláštním kvantifikačním režimu.

3.4.1 Princip⁸

Po nástřiku je analyzovaný vzorek purfován a prochází přes čtyři chromatografické kolony. První je purifikační kolona, kde dochází k jeho vyčištění a zakoncentrování analytů. Balastní látky typu proteinů, solí a minerálů odcházejí do odpadu. Všechny analyty, které jsou eluovány mobilní fází, jsou unášeny do extrakční kolony. Zde jsou zadrženy endogenní organické kyseliny, zatímco slabě kyselá, neutrální a bazická léčiva zadržena nejsou. Třetí kolonou v pořadí je separační kolona 1 s reverzní fází, která separuje slabě bazické látky. Čtvrtá, separační kolona 2 dělí bazické látky na základě iontové výměny. Všechny separace probíhají izokraticky. Saturátor mobilní fáze je kondicionační kolonou, která je třeba k zakoncentrování mobilní fáze.

Pro správný průběh analýzy a její vyhodnocení se používají vnitřní standardy. Vnitřní standardy (IS1 a IS2) sledují průběh chromatografického rozdělení na separačních kolonách. Jsou to speciálně syntetizované látky, které se klinicky nepoužívají a měly by být při každé analýze vždy identifikovány. Látka IS 1 je n-ethylnordiazepam, který monitoruje chromatografické chování vzorků na separační koloně 1 a tím kontroluje první část chromatogramu. Látka IS 2 je chlorpheniramin, který vyhodnocuje dělení na separační koloně 2 a tím udává symetrii druhé části chromatogramu.

Retenční čas IS 1 je v rozmezí 2,85 – 3,25 minut. Minimální plocha píku je 230 000. Retenční čas IS 2 je v rozmezí 8,85 – 10,55 minut. Minimální plocha píku je 200 000. Pokud nejsou vnitřní standardy identifikovány v rozmezí IS 1 ani IS 2, chromatogram není vyhodnocen, ani žádný jiný zakreslený pík .

3.4.2 Detekce⁸

Identifikace analytů je prováděna v průtokové kyteti multivlnovým UV detektorem spojeným s počítačovým programem. Skenující detektor je zabudovaná konkávní holografická mřížka, která se otáčí desetkrát za sekundu. Každá rotace přináší kompletní spektrum UV absorbancí s přesností vlnové délky 1 nm. Látka, která prochází detektorem je snímána v UV oblasti od 193 nm do 305 nm.

Spektra jednotlivých píků jsou průměrována a ukládána pro další zpracování dat po skončení analýzy.

3.4.3 Identifikace píků⁸

Analytický systém REMEDI HS automaticky řídí sbírání, uložení a zpracování dat. Autorizovaný program Peak ID identifikuje analyty pomocí relativních retenčních časů a porovnáváním spekter vzorku se spektry uloženými v knihovně systému. Knihovna obsahuje okolo 900 látek včetně metabolitů. Parentních látek je cca 300.

Z výsledků retenčních časů vnitřních standardů a analytů jsou tabelovány dva indexy relativních retenčních časů (RRT1, RRT2). RRT1 je index absolutního retenčního času konkrétní látky (RT) k absolutnímu retenčnímu

času vnitřního standardu 1 (RT IS1) po odečtení mrtvého času analýzy. RRT2 je index absolutního retenčního času konkrétní látky (RT) k absolutnímu retenčnímu času vnitřního standardu 2 (RT IS2) po odečtení mrtvého času analýzy. Mrtvý čas analýzy je 1,28 minut.

Identifikace se skládá z pěti základních kroků, které následují ve sledu po sobě:

- Nejprve je ověřována přítomnost vnitřních standardů.
 - Jestliže jsou oba přítomny, proces vyhodnocení pokračuje.
 - Jestliže jeden standard chybí, objeví se upozornění v pracovním protokolu a proces vyhodnocení pokračuje dále.
 - Jestliže není nalezen ani jeden standard, analýza není vyhodnocena.
- Dále je prováděno vyhledávání, porovnávání indexů relativních retenčních časů (RRT1, RRT2) a primárních hodnot vlnové délky píku ve spektru (L-Max). Pro mnoho analytů není nutná hodnota maximální absorbance. L-Max je určována strukturou analytu (např. přítomností nebo absencí fenolické skupiny). Neznámý analyt je srovnáván s každým záznamem v knihovně. Je vypočítáván faktor podobnosti (SF). Všechny knihovní záznamy hodnot RRT, L-Max a SF, které se shodují s neznámým analytem tvoří rozsah volby možných kandidátů.
- Probíhá zpětný výběr dalším porovnáváním hodnot sekundárních L-Max a hodnot druhé derivace absorpčního spektra (2DI – matematické znázornění spektra ukazující vrůstky nebo poklesy absorbance). Kandidáti, kteří projdou tímto výběrem zůstávají na seznamu možných identifikovaných analytů.
- Program Peak ID využívá směrnici křivky absorpčního spektra látky.
- Jsou vypočítávány poměry směrnice křivky absorpčního spektra látky pro neznámý analyt (Ratio 1, Ratio 2, Ratio 3), které jsou srovnávány s každým zbylým kandidátem. Zůstává základní výběr přijatelných kandidátů, u nichž je požadováno splnění všech kritérií výběru.

Pokud zůstal pouze jeden kandidát, identifikace je kompletní. Jestliže jsou vybráni dva nebo tři, program Peak ID bude především určovat, který kandidát má lepší, nižší SF vůči ostatním. V případě, kdy nemůže být vybrán žádný kandidát, systém pokračuje v dalším úzce specifikujícím postupu výběru.

Po skončení procesu jsou výsledná data vytištěna ve formě seznamu identifikovaných analytů (DRUGS IDENTIFIED). Analýza i její vyhodnocení je kompletní během 20 minut.

4. Experimentální část

4.1 Popis přístroje a příslušenství

Rutinní provoz analytického systému REMEDI HS je pro uživatele jednoduchý a snadný, ačkoliv lze zachytit stovky analytů. Systém má plně automatizovaný diagnostický rutinní provoz.

Obsluha pouze napíše specifikaci vzorku a navolí startovní podmínky (pozice vzorků) v menu Organize Run v tabulce Set Up Runs. Přístroj se uvádí do chodu kliknutím na příkaz START v levém rohu obrazovky.

Před každým nástřikem vzorku na kolony dochází k ověření, že přístroj je schopen provést analýzu dle standardního operačního postupu. Jedná se o aktuální atest, který zajišťuje, že pumpy, ventily, detektor a kolony jsou v řádném chodu a systém je připraven k měření. Rutinně probíhá přezkoušení kapacity paměti, tlaku na pumpách, kontrola teploty, hladin roztoků v reagentních a v odpadních nádobách, čísla nástřiku.

Pokud se objeví nějaký problém, je vytvořena hláška, která je zaznamenána do deníku. Tyto hlášky pomáhají operátorovi k odhalení a odstranění případné chyby nebo závady. Pokud je v systému detekována nějaká závažná mechanická nebo funkční chyba, která by bránila ve správné činnosti přístroje, analýza je zastavena, až do doby, dokud problém není určen a odstraněn. Tato funkce neanalyzování vzorků zabraňuje plýtváním času a reagentiemi, když přístroj není schopen zajistit a vydávat správná data.

Systém také tvoří hlášky jako připomínky k provedení pravidelné údržby, např. doplnění reagentů, vylití odpadu či výměně kolon.

Obr. č.1: Analytický systém REMEDi HS



Obr. č.2: Analytický systém REMEDi HS – uložení reagentů a kolon



4.1.1 Základní parametry přístroje⁸

REMEDi HS Drug Profiling System, firma Bio-Rad Laboratories, USA

Pumpy: 2 identické pumpy (A, B) stejného typu se safírovým pístem, minimalizující pulsaci

Pracovní tlak: 2000 psi (13,79 MPa)

Horní limit tlaku: 4000 psi (27,58 MPa)

Průtok: 0,1 – 5,0 ml/min (pumpa A)

0,1 – 2,0 ml/min (pumpa B)

Detektor: rozmezí vlnové délky 193 – 305 nm

Objem průtokové kyvety: 16 μ l

Autosampler: kapacita 50 vzorků

Objem nástřiku: 1000 μ l \pm 10 μ l

Rychlost nástřiku: 2,0 ml/min

Doba nástřiku: méně než 120 sekund

4.1.2 Příslušenství

Chromatografické kolony, reagentie, vnitřní standardy a kontrola jsou chráněny patentem firmy Bio-Rad, tudíž nelze specifikovat jejich přesné složení.

4.1.2.1 Chromatografické kolony

- Purifikační kolona – polymerní hydrofobní kolona, obsahuje divinylbenzenovou pryskyřici, 3.2 I.D. x 20 mm. Kapacita měření je 125 analýz. Uchovává se při 15-30 °C.
- Extrační kolona –polymerní aniont iontově výměnná kolona (anex), obsahuje divinylbenzenovou pryskyřici a kationt, 4.6 I.D. x 20 mm. Kapacita měření je 250 analýz. Uchovává se při 15-30 °C.
- Separační kolona 1 – kolona s reverzní fází (C₈), 3.2 I.D. x 35 mm. Kapacita měření je 250 analýz. Uchovává se při 15-30 °C.
- Separační kolona 2 – silikagelová kolona. 4.6 I.D. x 160 mm. Kapacita měření je 250 analýz. Uchovává se při 15-30 °C.

- Saturátor mobilní fáze a filtr – silikagelová iontově výměnná kolona aktivovaná určitým podílem vody, 4.6 I.D. x 235 mm. Kapacita měření je 250 analýz. Uchovává se při 15-30 °C.

Obr. č.3: Detail temperovaného prostoru s extrakční, separační 1 a separační 2 kolonou



4.1.2.2 Reagencie

- Exchange Buffer – 1 láhev obsahuje 940 ml borátového roztoku s méně než 2% isopropylalkoholu, pH 6,3. Uchovává se při 15-30 °C.
- Transfer Buffer – 1 láhev obsahuje 940 ml roztoku pentasulfonové kyseliny s méně než 20% ethylalkoholu a méně než 2% kyseliny octové. Uchovává se při 15-30 °C.
- Wash Reagent – 1 láhev obsahuje 940 ml roztoku methanolu a ethanolu. Je toxický a vysoce hořlavý. Uchovává se při 15-30 °C.
- Application Buffer – 1 láhev obsahuje 2,5 l borátového pufru, pH 7,7. Uchovává se při 15-30 °C.
- Mobilní fáze – 1 láhev obsahuje 3,8 l fosfátového pufru s méně než 40% acetonitrilu. Uchovává se při 15-30 °C.

4.1.2.3 Vnitřní standardy, kontrola

- Ředící roztok pro vnitřní standardy pro moč (Internal Standard Diluent – Urine) – 1 lahvička obsahuje 75 ml acetátového pufru. Uchovává se při 15-30 °C.
- Ředící roztok pro vnitřní standardy pro sérum (Internal Standard Diluent – Serum) – 1 lahvička obsahuje 75 ml roztoku methanolu a acetátového pufru. Uchovává se při 15-30 °C.
- Check Mix - lyofilizovaná lidská moč, obsahuje diazepam, amfetamin, imipramin, morfin a hydrocodon. Uchovává se při 2-8 °C.
- Internal Standard Combination – 1 lahvička obsahuje n-ethylordiazepam (IS 1) a chlorpheniramin (IS 2). Po rozpuštění její objem činí 10 ml. Uchovává se při 2-8 °C.

4.1.2.4 Mikrozkušavky

- Mikrozkušavky – polypropylenové vialky, objem 2 ml.
- Mikrozkušavky s filtrem 0,2 µm
- Víčka na mikrozkušavky

4.2 Příprava před analýzou

4.2.1 Příprava vnitřních standardů

Podle měřeného biologického materiálu jsem používala vnitřní standardy pro moč. Do lahvičky Internal Standard Combination jsem přidala 1,5 ml Wash Reagent (promývacího roztoku). Zamíchala a nechala stát 10 minut. Pak jsem přidala 9,5 ml Internal Standard Diluent – Urine pro měření vzorků moče. Nechala stát 1 - 2 minuty, pak jsem jemně míchala 30 minut na míchačce. Rozpuštěné vnitřní standardy jsou stále 30 dnů uchovávány při teplotě 2 - 8 °C.

4.2.2 Příprava Check Mix

Check Mix je kontrolní vzorek, který obsahuje různé složky s různými retenčními časy. Jeho analýza a následné vyhodnocení nám určuje kvalitu chromatografických kolon. Kontrolujeme správnost retenčních časů, ale i plochu píku příslušných látek. Po čtyřiceti nástřicích přístroj automaticky vyžaduje tento kontrolní vzorek.

Lahvičku lyofilizované moče Check Mix jsem rozpustila v 10 ml destilované vody. Nechala stát 1 - 2 minuty. Pak jsem jemně míchala 5 minut na třepačce. Rozpuštěný Check Mix je stálý 30 dnů uchovávaný při teplotě 2 – 8 °C.

Před analýzou jsem odpipetovala 1 ml rozpuštěného Check Mix do umělohmotné vialky, přidala jsem 0,2 ml roztoku vnitřních standardů pro moč a důkladně promíchala. Centrifugovala jsem 5 minut při 8000 g. Po centrifugaci jsem vložila otevřenou vialku do autosampleru a v tabulce Set Up Runs jsem navolila pozici a specifikaci vzorku Check Mix. Poté jsem spustila analýzu příkazem START.

Tabulka udává vyhodnocení identifikovaných látek.

Identifikovaná látka:	Minimální plocha píku:	Retenční čas (min.):	Koncentrace (µg/ml):
Cofein		1,45 - 1,55	
Diazepam	150 000	2,31 - 2,77	1,50
Amfetamin	187 000	3,98 - 5,09	2,20
Imipramin	150 000	5,58 - 7,85	2,00
Morphin	87 500	6,29 - 8,71	2,00
Hydrocodon	60 000	9,55 - 13,45	2,00

4.2.3 Příprava směsné moče

Vybrala jsem vzorky močí od 20 pacientů, jejichž toxikologický nález byl negativní. Z těchto vzorků jsem připravila směsnou moč, kterou jsem naředila

destilovanou vodou v poměru 1 : 3. Tuto naředěnou moč jsem zanalyzovala pro ujištění, že vzorek neobsahuje nežádoucí látky, ale pouze biomatrici.

4.2.4 Navážení vybraných látek

Pro kvantifikaci jsem vybrala tyto látky:

- Codein, N-desmethyl, (hydrochlorid, trihydrát), $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot HCl \cdot 3 H_2O$, $M = 375,8 \text{ g/mol}$; Sigma
- Morphin 6-acetat (MAM) (hydrochlorid), $C_{19}H_{21}NO_4 \cdot HCl$, $M = 363,8 \text{ g/mol}$; Sigma
- Fenfluramin (hydrochlorid), $C_{12}H_{16}F_3N \cdot HCl$, $M = 267,7 \text{ g/mol}$; Sigma

Navážila jsem vždy 1 mg každé z uvedených látek, rozpustila v 1 ml methanolu a doplnila do objemu 10 ml. Tyto tři zásobní roztoky jsem používala pro naředění vzorků směsné moče obsahující všechny uvedené sloučeniny v různých koncentracích (viz tabulky – výsledky).

4.2.5 Příprava vzorku – moče

Vzorky jednotlivých koncentrací směsné moče s výše uvedenými sloučeninami jsem převedla do speciálních vialek s filtrem. Centrifugovala jsem 5 minut při 3000 g. Odpipetovala jsem 1 ml přefiltrované moče do umělohmotné mikrozkušavky. Přidala jsem 0,2 ml roztoku vnitřních standardů pro moč. Opět jsem centrifugovala 5 minut při 8000 g. Po centrifugaci jsem vložila otevřenou mikrozkušavku do autosampleru.

4.3 Vlastní měření

4.3.1 Kalibrace

Analytický systém REMEDI HS je rutinně používán v režimu kvalitativního vyhodnocování analýz. Pro kvantitativní analýzy je třeba nejprve definovat název stanovení, kalibrátor a ostatní potřebné údaje v příslušné tabulce kvantitativních metod. V menu Options, Method Setup jsem navolila

Quantitative Method, Edit. Název jsem zvolila OPIAT1. V knihovním seznamu všech analytů jsem vyhledala zvolené látky a zadala jejich koncentrace. Příkazem Include byly tyto analyty zahrnuty do kalibračního procesu i následného kvantitativního měření.

Příprava vzorku pro kalibraci je stejná jako pro rutinní měření. V menu Organize Run v tabulce Set Up Runs jsem navolila specifikaci kalibrátoru. Název metody byl přepsán na OPIAT1.QNT. Přívlástek QNT značí, že přístroj bude měřit v režimu kvantitativního vyhodnocování. Analýzu jsem spustila příkazem START.

Po změření kalibrátoru přístroj vykalkuloval pro každý analyt fixní faktor, kterým byly přepočítávány koncentrace dalších naměřených vzorků.

4.3.2 Měření vzorků

Všechny vzorky jsem měřila po navolení příslušné pozice a specifikace v menu Organize Run v tabulce Set Up Runs a po zvolení metody OPIAT1.QNT.

Vytištěný pracovní protokol obsahoval seznam identifikovaných analytů a naměřené koncentrace jednotlivých složek směsné moče.

5. Výsledky

Tabulka č.1: Výsledky měření – Codein, N-desmethyl

Cílová koncentrace (ng/ml)	Měřené koncentrace (ng/ml)			
24,75	x	x	x	x
49,5	49,1	46,6	50,7	x
99	114,4	98,2	98,4	93,5
198	186,1	176,9	205,6	186,5
490	509,4	457,3	482,5	x
588	532,7	557,5	572,5	x
784	770,7	748,8	759,2	x
980	949,8	953,5	975,4	x

Průměr měřených vzorků	Směrodatná odchylka	Variační koeficient (%)	Recovery (%)	Počet měření
48,80	1,69	3,46	98,59	3
101,13	7,91	7,82	102,15	4
188,78	10,45	5,53	95,34	4
483,07	21,27	4,40	98,59	3
554,23	16,41	2,96	94,26	3
759,57	8,94	1,18	96,88	3
959,57	11,30	1,18	97,91	3

Tabulka č.2: Výsledky měření – Morphin 6-acetat

Cílová koncentrace (ng/ml)	Měřené koncentrace (ng/ml)			
49,75	x	x	x	x
99,5	118,5	93,0	99,9	x
199	205,2	184,3	200,1	210,6
495	509,8	481,5	460,2	x
594	582,2	574,6	563,4	x
792	767,6	785,4	747,6	x
990	990,6	938,4	975,8	x

Průměr měřených vzorků	Směrodatná odchylka	Variační koeficient (%)	Recovery (%)	Počet měření
103,80	10,77	10,38	104,32	3
200,05	9,82	4,91	100,53	4
483,83	20,32	4,20	97,74	3
573,40	7,72	1,35	96,53	3
766,87	15,44	2,01	96,83	3
968,27	21,97	2,27	97,80	3

Tabulka č.3: Výsledky měření – Fenfluramin

Cílová koncentrace (ng/ml)	Měřené koncentrace (ng/ml)		
197	x	x	x
485,2	458,1	476,2	465,9
582,2	567,6	573,4	549,2
776,2	726,2	755,4	738,6
970,3	964,1	935,3	941,9

Průměr měřených vzorků	Směrodatná odchylka	Variační koeficient (%)	Recovery (%)	Počet měření
466,73	7,41	1,59	96,20	3
563,40	10,32	1,83	96,77	3
740,07	11,97	1,62	95,34	3
947,10	12,32	1,30	97,61	3

Tabulka č.4: Vypočítané výsledky měření – průměrné hodnoty

Průměry:	Směrodatných odchylek	Variačních koeficientů	Výtěžností
Codeine, N-desmethyl	11,14	3,79	97,67
Morphin 6-acetat	14,34	4,19	98,96
Fenfluramin	10,50	1,58	96,48

$$x_p = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(x_i - x_p)^2}{(n-1)}}$$

$$CV = \frac{SD}{x_p} * 100 \quad [\%]$$

$$R = \frac{x_p}{c_{ref}} * 100 \quad [\%]$$

x_paritmetický průměr

x_inaměřená koncentrace

c_{ref}cílová koncentrace

npočet měření

SD.....směrodatná odchylka

CV.....variační koeficient

R.....výtěžnost (recovery)

Obr.č.1: Ukázka pracovního protokolu

DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OPIAT1.GMT VOLUME: 1000
 SAMPLE ID: 130207002 INJ# 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
 COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN

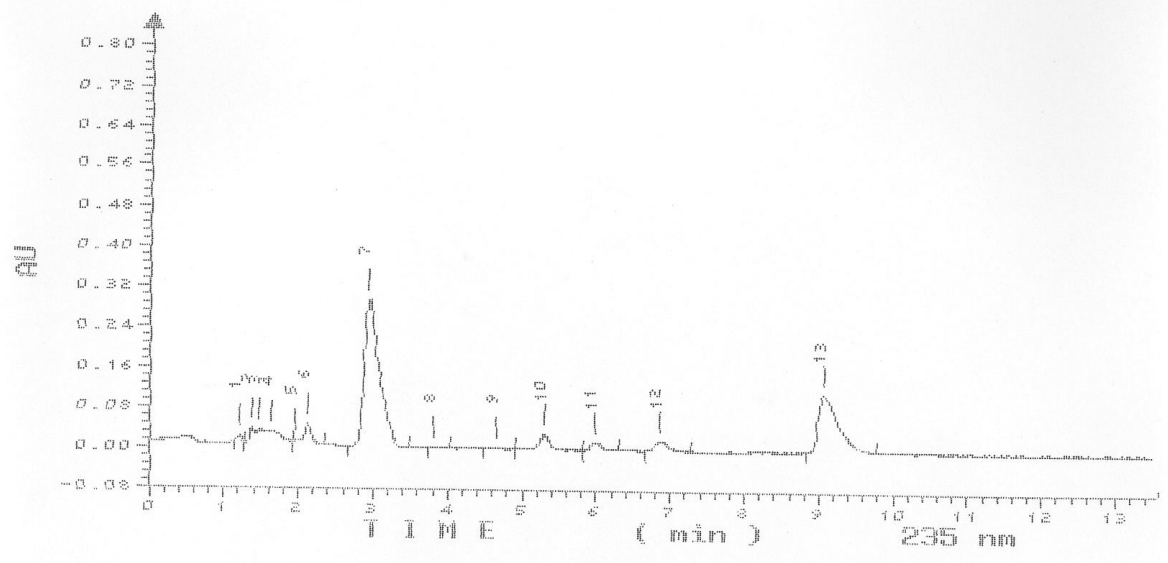
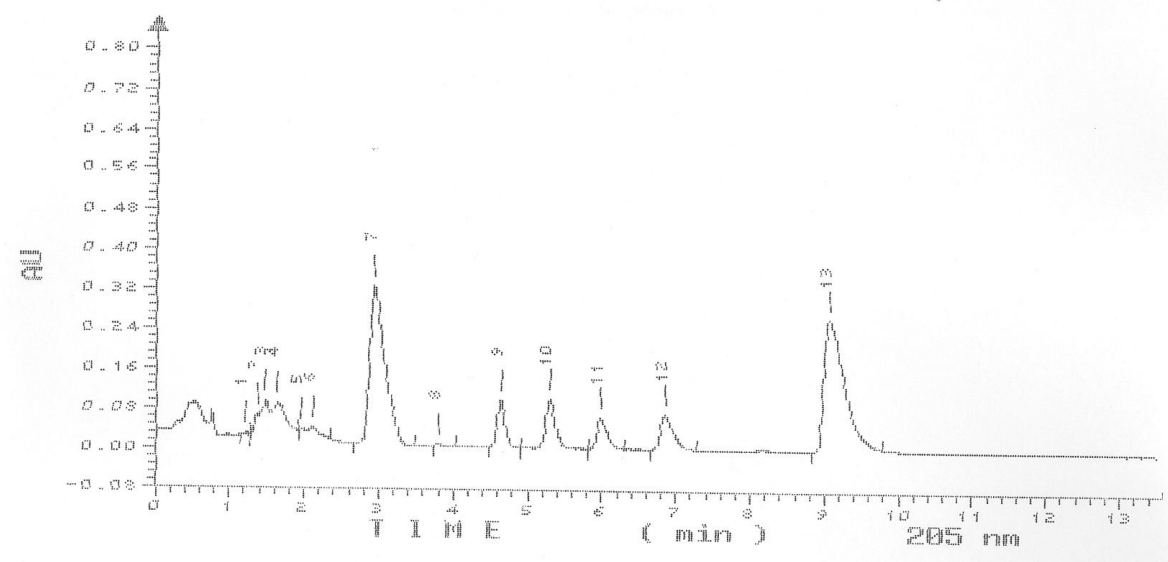
PEAKS DETECTED

IDENTITY	NOTES	PEAK#	RT	L-MAX	PEAK-HT	W-L
		1	1.23	242	10220	235
		2	1.38	277	40150	205
		3	1.50	281	66581	205
		4	1.65	254	59623	205
		5	1.98	UNKNOWN	7339	205
		6	2.13	246	36357	235
IS1[Nordiazepam,N-ethyl]		7	2.96	234	317052	205
		8	3.82	UNKNOWN	5093	205
Fenfluramine	S1	9	4.65	208	94511	205
CODEINE,N-DESMETHYL /**R1**		10	5.30	214	97180	205
Morphine,6-O-Monoacetyl		11	6.00	211	61011	205
MORPHINE		12	6.87	212	69814	205
IS2[Chlorpheniramine]		13	9.07	230	265319	205

DRUGS QUANTITATED

IDENTITY	CONC-mcg/ml	NOTES	PEAK#	RT	PEAK-H
Morphine,6-O-Monoacetyl	0.5822		11	6.00	61011
CODEINE,N-DESMETHYL /**R1**	0.5030		10	5.30	97180
Fenfluramine	0.5676	S1	9	4.65	94511

DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OPIAT1.QNT VOLUME: 1000
SAMPLE ID: 130207002 INJ# 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN



DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OPIAT1.QNT VOLUME: 1000
 SAMPLE ID: 130207002 INJ# 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
 COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN

			Library #	SF
PEAK 1	-	No Candidates, No Match		
PEAK 2	-	No Candidates, No Match		
PEAK 3	-	No Candidates, No Match		
PEAK 4	-	Candidates: Ampyrone[--s-] No Qualified Candidates, No Match	128	0.481
PEAK 5	-	Peak height below minimum required for processing		
PEAK 6	-	Candidates: *[Endogenous Peak #1] No Qualified Candidates, No Match	549	0.100
PEAK 7	-	ISI		
PEAK 8	-	Peak height below minimum required for processing		
PEAK 9	-	Candidates:		
		Debrisoquin	804	0.016
		Solanine	902	0.100
		Fenfluramine	134	0.009
		PSEUDOEPHEDRINE	44	0.044
		/EPHEDRINE		
		/(Phenmetrazine		
		EPHEDRINE	45	0.030
		/PSEUDOEPHEDRINE		
		/(Phenmetrazine		
		(Phenmetrazine)	131	0.057
		*Methylaminorex,4-	409	0.024
	- Qualif. Candidates:	Fenfluramine	134	0.009
	- Match	Fenfluramine	134	0.009

DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OPIAT1.QNT VOLUME: 1000
 SAMPLE ID: 130207002 INJ# 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
 COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN

	PEAK 9	LIBRARY	Library #	SF
L-MAX	208	208		
RRT1	2.010	2.250		
RRT2	0.432	0.435		
SF (205-250nm)	0.009			
Ratio 3	1.603	1.738		
Ratio 1	0.973	0.997		
Ratio 4	2.651	2.870		
ZDI	223	224		
Drug Class		R		
Notes	S1			

PEAK 10	- Candidates:	CODEINE,N-DESMETHYL	46	0.017
		/**R1**		
		Bupivacaine	226	0.238
	- Qualif. Candidates:	CODEINE,N-DESMETHYL	46	0.017
		/**R1**		
	- Match	CODEINE,N-DESMETHYL	46	0.017
		/**R1**		

	PEAK 10	LIBRARY
L-MAX	214	NONE
RRT1	2.398	2.741
RRT2	0.516	0.531
SF (215-265nm)	0.017	
Ratio 2	0.953	0.970
Ratio 3	1.052	1.082
Ratio 4	1.288	1.337
ZDI	265	265
Drug Class		M

DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OFIAT1.QNT VOLUME: 1000
 SAMPLE ID: 130207002 INJW 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
 COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN

PEAK 11	Candidates:		Library #	SF
		METHADONE	66	0.213
		/(Norfentanyl)		
		/(Mirtazepine)		
		*Piperidolate	123	0.248
		*Deptropine	331	0.202
		*Butethamate	332	0.213
		(Norfentanyl)	556	0.120
		(Mirtazepine)	837	0.220
		Oxycodone	55	0.219
		/Hydrocodone,N-desmethyl		
		/**R1**		
		Morphine,6-O-Monoacet	29	0.013
		Diprenorphine	334	0.141
		Mianserin	92	0.192
	- Qualif. Candidates:	Morphine,6-O-Monoacet	29	0.034
	- Match	Morphine,6-O-Monoacet	29	0.034

	PEAK 11	LIBRARY
L-MAX	211	209
RRT1	2.816	3.059
RRT2	0.605	0.620
SF (205-250nm)	0.034	
Ratio 4	1.404	1.460
Ratio 7	1.449	1.479
Ratio 1	0.945	0.961
2DI	227	227
Drug Class		Y

DATE : 03/13/2007 TIME: 11:06 hrs METHOD: OFIAT1.QNT VOLUME: 1000
 SAMPLE ID: 130207002 INJ# 14456 S/W ID: 5.32.33/2.0/1.6
 COMMENTS: KONTR. 600 VIAL # 3 OPERATOR ID: JN

	Library #	SF
PEAK 12 - Candidates:		
MORPHINE	67	0.008
*Clidinium /(#628)	251	0.238
/(#807)		
Disulfoton	844	0.069
*Coumaphos	870	0.231
*Monoacetylcodeine,6-	407	0.043
- Qualif. Candidates:		
MORPHINE	67	0.012
- Match	MORPHINE	67
		0.012

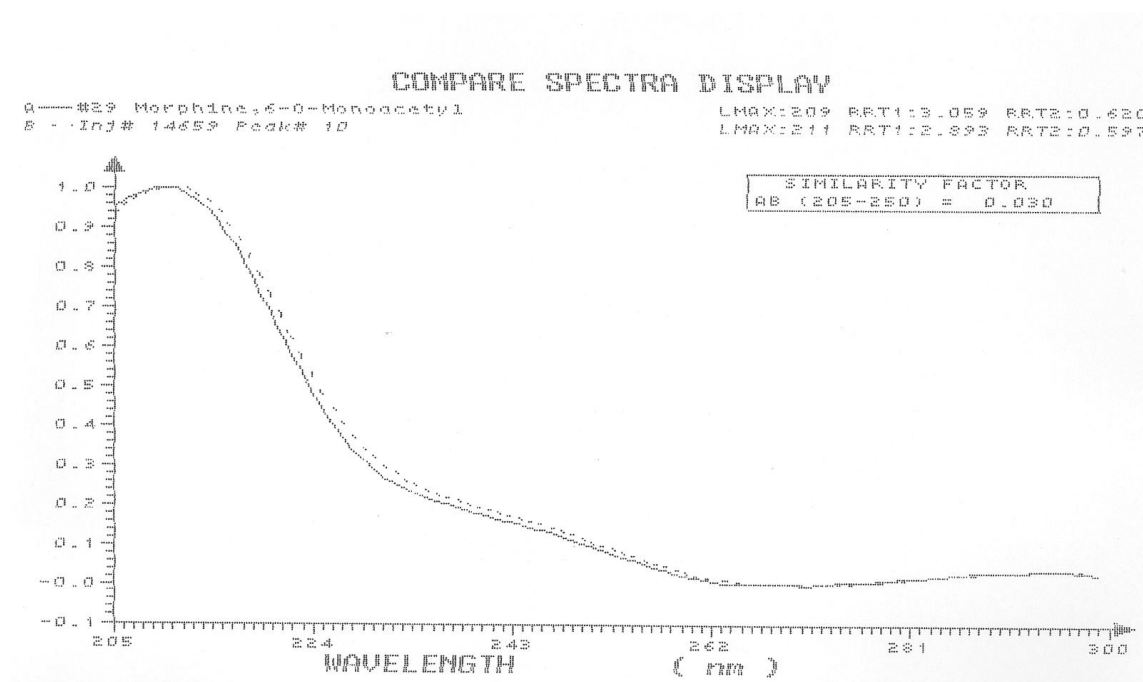
	PEAK 12	LIBRARY
L-MAX	212	NONE
RRT1	3.333	3.795
RRT2	0.717	0.741
SF (205-250nm)	0.012	
Ratio 2	0.978	0.996
Ratio 3	1.121	1.135
Ratio 1	0.922	0.950
2DI	229	229
Drug Class		Z

PEAK 13 - IS2

Obr.č.2: Porovnání absorpčního spektra morfinu 6-acetat s knihovním spektrem

— knihovní spektrum

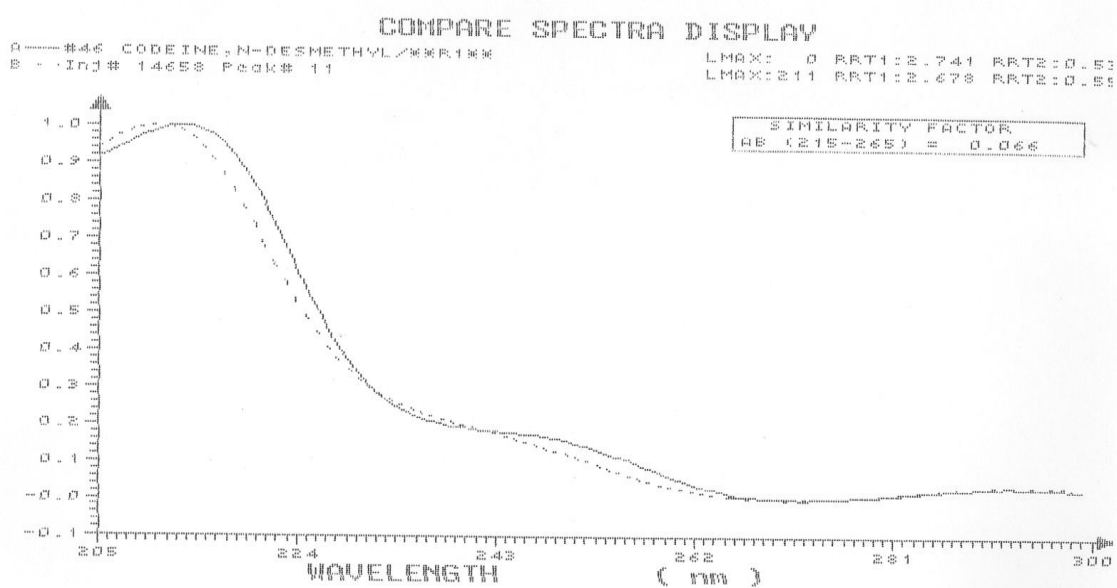
..... naměřené spektrum



Obr.č.3: Porovnání absorpčního spektra codeinu, N-desmethyl s knihovním spektrem

— knihovní spektrum

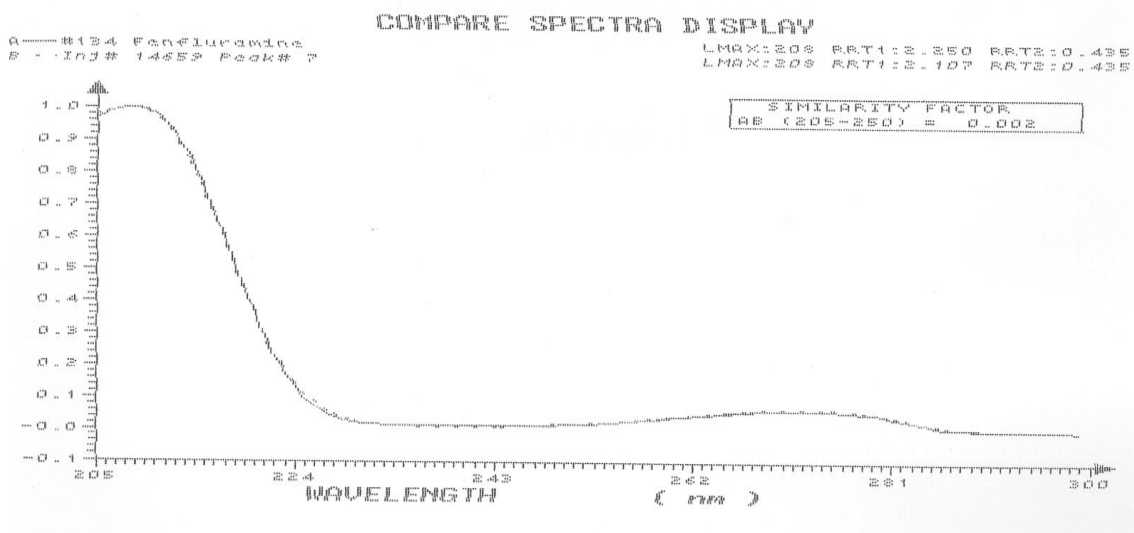
..... naměřené spektrum



Obr.č.4: Porovnání absorpčního spektra fenfluraminu s knihovním spektrem

— knihovní spektrum

..... naměřené spektrum



6. Diskuse

Analytický systém REMEDi HS je rutinně používán k toxikologickému screeningu již několik roků na úseku toxikologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF a FN v Hradci Králové. Na tomto úseku jsem řadu let s přístrojem pracovala, proto nebylo třeba se seznamovat s jeho základním provozem, který jsem dobře znala. Systém je nastaven v kvalitativním režimu, který je využíván po celých dvacetčtyři hodin denně pro klinické účely. Kvantitativní analýzy jsem prováděla ve speciálním nastavení, které bylo pro mě novým poznatkem a které jsem se naučila používat.

Ačkoliv není možné pracovat s kalibrací ve smyslu správné laboratorní praxe, výsledky splnily naše očekávání. Programové vybavení umožňuje kalibraci pouze jednou vybranou koncentrací látky, kdy je stanoven fixní faktor, pomocí kterého jsou vzorky přepočítávány na koncentrace. Pro srovnání byly provedeny kalibrace ve dvou koncentračních hladinách, kdy bylo zjištěno, že hodnota fixního faktoru se změnila minimálně.

Vzhledem k tomu, že je analytický systém využíván pro klinické potřeby, vzorky byly měřeny v průběhu dvou měsíců, čímž byla testována i životnost kolon, která je definována počtem nástřiků. Tento údaj je však relativní, protože v okamžiku zhoršené separace, která se projeví asymetrií píků, chvostováním, anebo v důsledku znečištění kolon balasty dojde k vysokému tlaku na jedné či více kolonách. V tomto případě je třeba provést purifikaci nebo výměnu inkriminované kolony.

Navzdory výše uvedeným podmínkám výtěžnost dopadla uspokojivě. Hodnoty se pohybovaly mezi 94 – 104%. Průměrná výtěžnost pro codein, N-desmethyl byla 97,67%, pro morphin 6-acetat byla 98,96% a pro fenfluramin 96,48%. Hodnoty směrodatných odchylek byly lepší v nižších koncentracích. Zvyšující se koncentrace korelují v jisté míře s hodnotami směrodatné odchylky, což je dáno symetrií píku a delším časem eluce látky z kolony. Pro codein, N-desmethyl se hodnoty směrodatné odchylky pohybovaly v rozmezí 2 - 20 ng/ml, průměrná hodnota byla 11,14 ng/ml. Pro morphin 6-acetat se hodnoty směrodatné odchylky pohybovaly v rozmezí 7 – 21 ng/ml, průměrná hodnota byla 14,34 ng/ml. Pro fenfluramin se hodnoty směrodatné odchylky pohybovaly v rozmezí 7 – 12 ng/ml, průměrná hodnota byla 10,50 ng/ml. Průměrná hodnota variačních koeficientů pro codein, N-desmethyl byla 3,79%,

pro morfin 6-acetat byla 4,19% a pro fenfluramin 1,58%. Byly zjištěny nejnižší koncentrace záchytu měřených analytů na kolonách. Pro codein, N-desmethyl byla hodnota nejnižší změřené koncentrace 50 ng/ml, pro morfin 6-acetat 100 ng/ml a pro fenfluramin 500 ng/ml.

Z dnešního pohledu nejsou plně využity vnitřní standardy pro kvantitativní hodnocení. Systém nebere v úvahu jejich výtěžnost při konkrétní analýze, tudíž nebere v potaz stav separačních kolon, kdy ke konci jejich životnosti se mění i plocha pík separovaných vnitřních standardů. Je kalkulováno pouze s jejich retenčními časy v hodnocení kvality analýzy. Přesto se dá měření koncentrací analytickým systémem REMEDI HS chápat jako velmi dobrá semikvantitativní analýza.

Všechny výsledky byly naměřeny v moči. Z důvodu přítomnosti průměrné biomatrice byla směsná moč připravena z výběru dvaceti pacientů, kteří měli negativní toxikologický nále. Moč se nejvíce využívá pro odhad míry intoxikace ve srovnání s klinickými výsledky. Tento biologický materiál je také nejsnáze dostupný v relativně dostatečném množství. Jsem si vědoma, že měření kvantity v séru by bylo analyticky zajímavější, avšak z ekonomických aspektů byla zvolena pouze moč. Lze očekávat, že měření v séru by přineslo podobné výsledky, pouze by došlo ke změně biomatrice. V séru musí být nejprve odstraněny bílkoviny. I přesto dochází k zanášení analytických kolon a hrozí jejich kratší životnost.

Při měření kvantity analytický systém REMEDI HS umožňuje identifikaci i ostatních separovaných analytů, i když nebyla provedena jejich kalibrace a nemají fixní přepočítávací faktor. Analyty nejsou tedy kvantifikovány, jsou však vytištěny v pracovním protokolu v seznamu identifikovaných látek. Tím lze spojit měření kvantity i kvality v jedné analýze. Odhad odpadů analytů v moči by mohl velmi dobře sloužit klinikům k monitorování intoxikace. Problémem však zůstává dostupnost standardů potřebných ke kalibracím, zvláště v oblasti návykových látek.

Analytický systém REMEDI HS je unikátní a v kategorii rychlého toxikologického screeningu je nenahraditelný. Po léta je užíván především v zemích západní Evropy, v naší republice je ojedinělý. Je škoda, že jeho komerční produkce končí, avšak bude pravděpodobně nahrazen systémem s vyšší specifickou detekcí typu hmotnostní spektrometrie.

7. Závěr

Byla provedena kalibrace třech vybraných sloučenin v režimu měření kvantity analytického systému REMEDi HS.

Byly změřeny vzorky moče, které obsahovaly tyto tři vybrané látky v osmi různých hladinách koncentrací.

Z výsledků lze vyhodnotit, že analytický systém REMEDi HS by mohl velmi dobře sloužit pro semikvantitativní analýzy, i když jeho hlavní těžiště v klinické laboratoři je v rychlém toxikologickém screeningu farmakologicky významných a návykových látek.

8. Literatura

- 1) Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, IDVPZ, Brno, 1995, 89 - 118
- 2) Klouda P.: Moderní analytické metody, P. Klouda, Ostrava, 2003, 10 – 31
- 3) Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2005, 265 – 281
- 4) Přednášky z předmětu Analýza exogenních látek v biologickém materiálu – 11/2006
- 5) Hrabálek A. a kol.: Chemická laboratorní technika pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2000
- 6) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
- 7) <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> - 4/2007
- 8) Windemuth A., Jeguttzki W.: Handbuch der REMEDi, Bio-Rad, Laboratoriem GmbH, Mnichov, verze 11/97
- 9) Poklis A., Edinboro L.E.: REMEDi drug profiling systém readily distinguishes between cyclobenzaprine and amitriptyline in emergency toxicology urine specimen, Clin Chem. 38, 1992, 2349 – 2350
- 10) Ohtsuji M., Lain J.S., Binder S.R., Kondo T., Takyasu T., Ohshima T.: Use of REMEDi HS in emergency toxicology for a rapid estimate of drug concentrations in urine, serum and gastric samples, J Forensic Sci. 41, 1996, 881 - 886
- 11) Sadeg N., Francois G., Petit B., Dutertre-Catella H., Dumontet M.: Automated liquid-chromatographic analyzer used for toxicology screening in general hospital: 12 months' experience, Clin Chem. 43, 1997, 498 - 504
- 12) Musshoff F., Madea B.: First experience with the REMEDi HS urine benzo assay, Clin Chem Lab Med. 36, 1998, 803 - 808
- 13) Regenthal R., Krueger M., Trauer H., Boehm R., Preiss R.: Evaluation of REMEDi in diagnosis of dimethoate poisoning, Ther Drug Monit. 24, 2002, 297 - 301
- 14) Baskin L.B., Morgan D.L.: Drugs detected in patients suspected of acute intoxication, Tex Med. 93, 1997, 50 – 58
- 15) Kalasinsky K.S., Schaefer T., Binder S.R.: Forensic application of an automated drug profiling systém, J Anal Toxicol. 19, 1995, 412 - 418