

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ
CHEMIE
HPLC BIOAKTIVNÍCH LÁTEK

Diplomová práce

Hradec Králové 2022

Aneta Lukšánová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem 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 dne 15.5.2022

Aneta Lukšánová

Poděkování: Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví Csc. za odbornou pomoc, trpělivost, spolupráci, cenné rady a vřelý přístup při zpracovávání této diplomové práce. Rovněž také děkuji panu PharmDr. Marcelu Špulákovi za odbornou pomoc v chemických pasážích mé diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Biofyziky a fyzikální chemie

Školitel: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Student: Aneta Lukšanová

Název diplomové práce: HPLC bioaktivních látek

Diplomová práce popisuje hledání podmínek pro HPLC analýzu midazolamu a jeho dvou metabolitů – 1-hydroxymidazolamu a 4-hydroxy midazolamu, validaci metody a hledání vhodného vnitřního standardu.

HPLC analýza probíhala na reverzních fázích, byla použita kolona POROSHELL 120 EC-C18, 3.0 X 100 NM, 2.7 μm a jako mobilní fáze se osvědčila směs tvořená acetonitrilem a roztokem octanu amonného o pH 4.5 v poměru 35/65. Detekce byla provedena diode array detektorem při vlnových délkách 223 a 272 nm. Kolona byla termostatována na 25 °C, čas analýzy byl 10 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0.700 ml/min. Jako vnitřní standard se osvědčil diazepam.

Metoda byla validována na základě požadavku zadavatele pro stanovení 1-hydroxymidazolamu a 4-hydroxymidazolamu v potkaní plazmě. V rámci validace byly ověřeny následující parametry: přesnost, správnost, kvantitativní limit, linearita a selektivita.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Biophysics and Physical Chemistry

Consultant: Ing. Vladimír Kubiček, CSc.

Student: Aneta Lukšanová

Title of thesis: HPLC of bioactive compounds

This diploma thesis is focused on finding conditions of HPLC analysis of midazolam and its two metabolites – 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam, on method validation and on finding an appropriate internal standard.

The analysis was carried out under reversed-phase conditions, the chosen column was POROSHELL 120 EC-C18, 3.0 X 100 NM, 2.7 μm , and a mixture of acetonitrile and ammonium acetate buffer with pH 4.5 in a ratio of 35/65 has been proven to be effective mobile phase. Detection was carried out using the diode array detector with wavelength values 223 nm and 272 nm. The column was thermostated at 25 °C, the analysis time was 10 minutes. Flow rate of mobile phase was 0.700 ml/min. Diazepam was found as a suitable internal standard.

The method was validated only for 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam determination in rat plasma due to a submitter's request. Within the analytic method validation the following parameters were tested: precision, accuracy, lower limit of quantitation, linearity and selectivity.

Obsah

ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
SEZNAM ZKRATEK.....	7
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1. Benzodiazepiny	8
1.2. Midazolam	9
1.2.1. Fyzikálně chemické vlastnosti.....	10
1.2.2. Farmakokinetika.....	10
1.3. Chromatografie	11
1.3.1. Typy chromatografie	12
1.4. Volba chromatografické metody	13
1.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	13
1.5.1. Výhody HPLC:.....	14
1.6. Instrumentace HPLC	15
1.6.1. Zásobníky mobilní fáze	15
1.6.2. Degasser	15
1.6.3. Čerpadlo	16
1.6.4. Směšovací zařízení	16
1.6.5. Dávkovací zařízení	16
1.6.6. Předkolona.....	17
1.6.7. Kolony.....	17
1.6.8. Detektory	18
1.6.8.1. Spektrofotometrické detektory	19
1.6.8.2. Fluorometrické detektory	19
1.6.8.3. Elektrochemické detektory.....	20
1.6.8.4. Refraktometrické detektory	20
1.6.8.5. Spojení HPLC s hmotnostním spektrem	20

1.7.	Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatografické analýzy.....	21
1.8.	Validace	22
1.8.1.	Správnost	22
1.8.2.	Přesnost	22
1.8.3.	Linearita.....	23
1.8.4.	Citlivost – detekční a kvantitativní limit	23
1.8.5.	Robustnost	23
1.8.6.	Selektivita.....	24
1.8.7.	System Suitability Test.....	24
2.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	25
2.1.	Použité chemikálie.....	25
2.2.	Přístrojové vybavení	27
2.3.	Příprava vzorků.....	28
2.3.1.	Příprava základních roztoků midazolamu, 1-hydroxymidazolamu, 4-hydroxymidazolamu.....	28
2.3.2.	Příprava pufovacího roztoku octanu amonného – pH = 4.5	28
2.3.3.	Příprava roztoku diazepamů.....	28
2.3.4.	Příprava kalibračních roztoků	28
2.3.5.	Zpracování biologického materiálu.....	28
2.4.	Výchozí podmínky analýzy HPLC.....	29
3.	VÝSLEDKY	30
3.1.	Stanovení podmínek analýzy HPLC.....	30
3.1.1.	Pokusy s mobilní fází se složením: 50 % acetonitrilu a 50 % ultračisté vody, za průtoku 0.500 ml/min	30
3.1.2.	Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % ultračisté vody, za průtoku 0.500 ml/min	31
3.1.3.	Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % ultračisté vody, za průtoku 0.600 ml/min	32

3.1.4. Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min	33
3.1.5. Pokusy s mobilní fází se složením: 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min	35
3.1.6. Pokusy s mobilní fází se složením: 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.700 ml/min	38
3.2. Validace metody	43
3.2.1. Stanovení přesnosti.....	43
3.2.2. Stanovení správnosti.....	44
3.2.3. Selektivita.....	44
3.2.4. Linearita.....	45
3.2.5. Stanovení kvantitativního limitu	46
3.3. Aplikace metody při analýze reálných vzorků	46
4. ZÁVĚR.....	47
5. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	48
6. SEZNAM LITERATURY	50

ÚVOD A CÍL PRÁCE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří v dnešní době mezi jednu z nejvíce používaných analytických metod, jež si pro svou citlivost stanovení, rychlost analýzy, možnost automatizace a schopnost kvantitativního i kvalitativního vyhodnocení vydobyla své místo na poli analýzy léčiv. [1]

Midazolam je léčivo řadící se mezi benzodiazepiny, které disponují sedativními, anxiolytickými, antikonvulzivními a hypnotickými účinky. V běžné praxi se používá například pro indukci anestezie či jako součást premedikace. 1-hydroxymidazolam a 4-hydroxymidazolam jsou jeho aktivní metabolity, na které se metabolizuje pomocí cytochromu P450. Tohoto jevu se využívá například při modelování a popisu možných farmakologických interakcí na úrovni cytochromu P450. [2–4]

Cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodných podmínek pro HPLC analýzu midazolamu a jeho dvou metabolitů – 1-hydroxymidazolamu a 4-hydroxymidazolamu, vyhledání vhodného vnitřního standardu a validace metody stanovení obou metabolitů v potkaní plazmě.

SEZNAM ZKRATEK

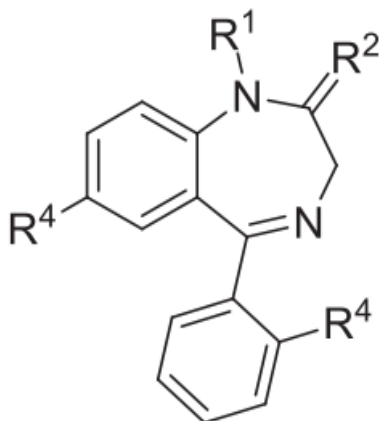
1-OH MZD	1-hydroxymidazolam
4-OH MZD	4-hydroxymidazolam
APCI	Chemická ionizace
APPI	Fotoionizace
CRL	Chemická referenční látka
DAD	Diode array detector
DZP	Diazepam
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
MZD	Midazolam
PC	Papírová chromatografie
SST	System Suitability Test
TLC	Tenkovrstvá kapalinová chromatografie

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Benzodiazepiny

Historie benzodiazepinů sahá až do padesátých let minulého století, kdy Leo Sternbach přivedl na svět první benzodiazepin, a to konkrétně chlordiazepoxid. Ten se po několika letech testování začal používat v běžné praxi. Časem se k chlordiazepoxidu přidal diazepam a benzodiazepiny tak pro své sedativní, anxiolytické, antikonvulzivní a hypnotické účinky začaly z trhu pomalu vytěsňovat do té doby hojně používané barbituráty. Rozmach benzodiazepinů pokračoval přes sedmdesátá léta až do let osmdesátých, kdy došlo k odhalení jejich rizik, konkrétně především k riziku vzniku závislosti, a do praxe začaly přicházet sloučeniny s podobnými účinky, ale odlišnou strukturou a mechanismem účinku. [5, 6]

Z chemického hlediska jsou benzodiazepiny (struktura viz č. obrázek 1) látky tvořené sedmičlenným diazepinovým kruhem s heteroatomy dusíku v polohách 1 a 4, v němž je na stranu [e] kondenzováno benzenové jádro, a na který je v poloze 5 připojen fenyl. Fenylsubstituent v poloze 5 umožňuje pozitivní alosterickou modulaci GABA receptorů. Další substituce této základní struktury ovlivňuje vystupňování konkrétního účinku dané látky, dále také například lipofilitu, která je důležitá pro přestup přes hematoencefalickou bariéru nebo způsob metabolizace, který má vliv na celkovou délku působení benzodiazepinů. [6]



Obrázek 1: Základní struktura benzodiazepinů [7]

Mechanismus účinku benzodiazepinů spočívá v prohloubení inhibičního působení γ -aminomáselné kyseliny, které je způsobeno jejich agonistickým navázáním se na podjednotky senzitivní k benzodiazepinům, jež se nacházejí se na $GABA_A$ receptoru. Na toto vazebné místo

se váže také flumazenil, který na rozdíl od benzodiazepinů působí antagonisticky, čehož se klinicky využívá při akutní intoxikaci benzodiazepiny. [5]

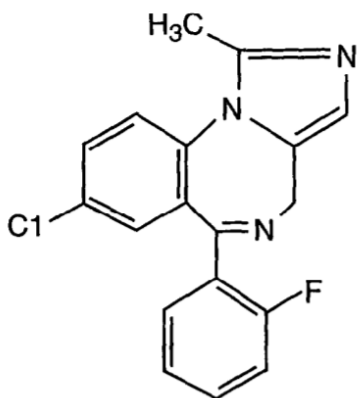
Z výše uvedeného mechanismu účinku vyplývá, že benzodiazepiny disponují anxiolytickými, sedativními, myorelaxačními, amnestickými, antikonvulzivními a hypnotickými vlastnostmi. V závislosti na struktuře je u každého konkrétního benzodiazepinu vystupňována jiná vlastnost, v případě sedativního a hypnotického účinku hraje důležitou roli také dávka konkrétního benzodiazepinu. [3, 5]

Jak už široké spektrum účinků napovídá, benzodiazepiny mají mnoho indikací, mezi ty nejčastější se řadí insomnie, úzkostné a úzkostně depresivní poruchy, akutní agitovanost, epilepsie, akutní reakce na stres, celková anestezie a další. Naopak kontraindikovány jsou u akutní intoxikace látkami tlumícími CNS, při myastenii gravis, syndromu spánkové apnoe, renální a hepatální insuficienci a při přecitlivělosti na benzodiazepiny. [5]

Mezi nežádoucí účinky se řadí především riziko vzniku závislosti a tolerance při dlouhodobém užívání, dále poruchy paměti a koncentrace, anterográdní amnézie, zvýšená únava a ospalost během dne, ovlivnění pozornosti při řízení motorových vozidel, závratě, ataxie, poruchy koordinace. [3, 5]

1.2. Midazolam

Midazolam (struktura viz obrázek 2) pro jeho krátký biologický poločas (1.5–3 hodiny) řadíme mezi krátkodobě působící benzodiazepiny. Jak již vyplývá z farmakologického zařazení, midazolam vykazuje účinky typické pro skupinu benzodiazepinů, konkrétně tedy anxiolytickou, antikonvulzivní, myorelaxační a sedativní až hypnotickou aktivitu. V klinické praxi je nejčastěji používán pro indukci anestezie, jako součást premedikace nebo při endoskopiích a jiných menších chirurgických zákrocích. [8]



Obrázek 2 Struktura midazolamu [8]

1.2.1. Fyzikálně chemické vlastnosti

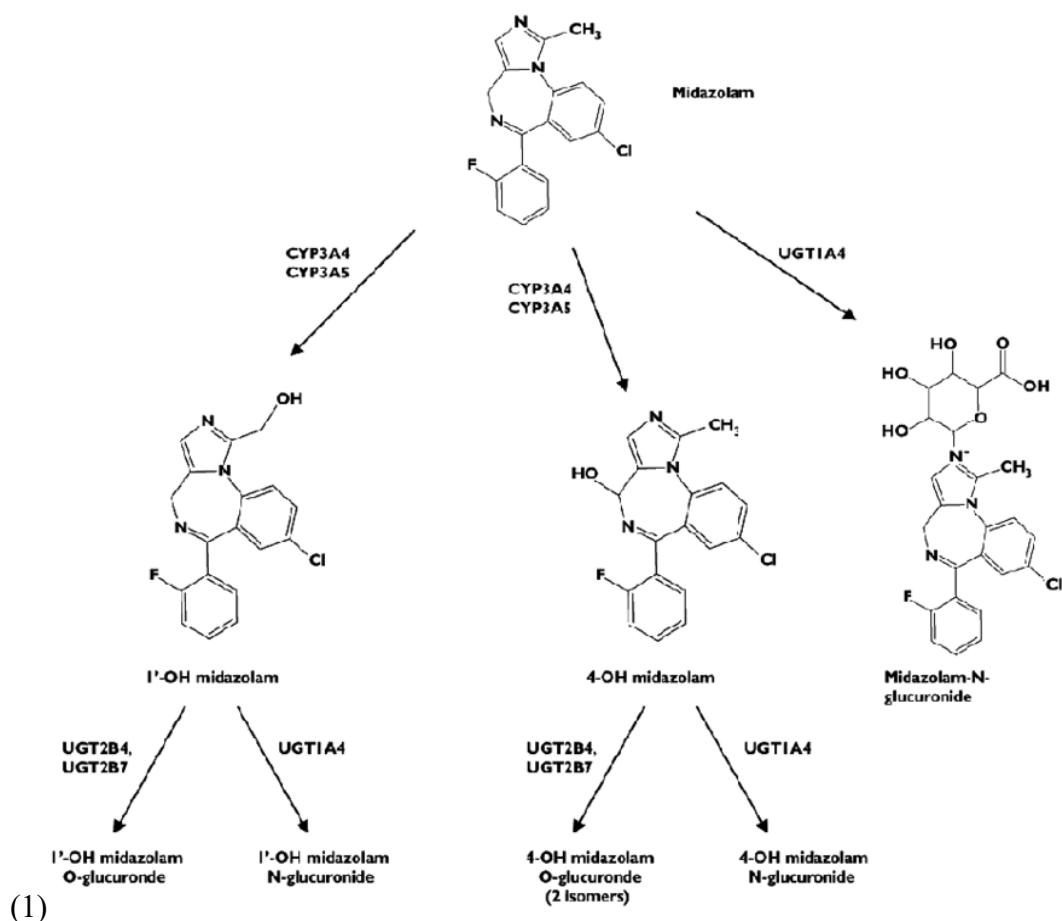
V molekule midazolamu je na stranu [a] sedmičlenného heterocyklu kondenzován imidazol, proto se midazolam řadí mezi imidazobenzodiazepiny. To mu propůjčuje bazicitu a schopnost rychlé metabolizace. Rozpustnost ve vodě a lipofilita se odvíjí od pH prostředí, ve kterém se midazolam nachází. V pH menším než 4 vykazuje vysokou rozpustnost ve vodě, naopak vysoce rozpustným v tucích se stává při fyziologickém pH. Společně s diazepamem se midazolam řadí k nejvíce lipofilním benzodiazepinům. Zásluhou těchto lipofilních vlastností rychle prostupuje přes hematoencefalickou bariéru a po perorálním podání se rychle vstřebává ze žaludku. [8, 9]

1.2.2. Farmakokinetika

Midazolam je možné aplikovat perorálně, intranasálně, rektálně, intramuskulárně a intravenózně. Vliv na jeho absorpci má ve velké míře first-pass efekt, který se projevuje především u podání perorálního, kdy se do systémové cirkulace dostane pouze 40–50 % podané dávky. Z hlediska rychlosti nástupu účinku se s časem 3 minut jako nejvhodnější jeví podání intravenózní. [8]

Z pohledu distribuce se midazolam ve velké míře váže na plazmatické proteiny, především na albumin, a z důvodu vysoké lipofility disponuje velkým distribučním objemem (1-2.5 L/kg). U těhotných žen má schopnost přestoupit do krevního oběhu plodu. [8]

Metabolizace probíhá v játrech na cytochromech CYP3A4 a CYP3A5. V prvním kroku hydroxylací vznikají dva farmakologicky aktivní metabolity, 1-hydroxymidazolam a 4-hydroxymidazolam. 1-hydroxymidazolam vzniká ve větší míře než 4-hydroxymidazolam, je schopen přestoupit přes hematoencefalickou bariéru a přispívá k celkovému klinickému působení midazolamu. Další fází metabolizace je glukuronidace, při které vznikají farmakologicky neaktivní metabolity. Schéma metabolismu je znázorněno na obrázku č. 3 str. 11. [4, 8, 9]



Obrázek 3 Schéma metabolizace midazolamu [10]

Midazolam je řazen mezi krátkodobě působící benzodiazepiny, a to z důvodu svého krátkého eliminačního poločasu, který činí 1.5–3 hodiny a je nezávislý na cestě podání. Jeho eliminace probíhá primárně v ledvinách, z menší části v játrech. [8]

1.3. Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda, která slouží k separaci analyzovaných látek a ke stanovení jejich koncentrace. Za jejího zakladatele je považován ruský chemik a botanik Michail Cvět, který na začátku dvacátého století poprvé rozdělil rostlinná barviva ve skleněné koloně s použitím organických rozpouštědel. Podstatou chromatografie je rozdělení látek mezi dvěma fázemi, které jsou vzájemně nemísitelné. První fází je fáze nepohyblivá, také označovaná jako stacionární, která je tvořena pevnými částicemi nebo tenkým kapalným filmem na povrchu pevných částic. Druhá fáze je fáze pohyblivá neboli mobilní, jež unáší směs analyzovaných látek chromatografickým systémem. Mobilní fáze je tvořena plynem nebo kapalinou. Rozdílná afinita analytů k mobilní a stacionární fázi ovlivňuje jejich distribuci a dobu setrvávání v jednotlivých fázích, čímž dochází k jejich separaci. Látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi se chromatografickým systémem pohybují pomaleji, a naopak látky s nižší

afinitou ke stacionární fázi zůstávají ve fázi mobilní a celým systémem se tak pohybují rychleji. Během celého procesu dochází k nepřetržitému ustavování rovnovážného stavu. Pro popis rozdělení analytu mezi dvě fáze při přiblížení se k rovnovážnému stavu slouží rozdělovací koeficient K:

$$K = [A]_s/[A]_m \quad [11]$$

kdy K představuje rozdělovací koeficient; $[A]_s$ koncentraci analytu ve stacionární fázi a $[A]_m$ koncentraci analytu ve fázi mobilní. [1, 11–16]

1.3.1. Typy chromatografie

Chromatografii lze rozdělit podle několika aspektů.

1) Podle skupenství mobilní fáze dělíme chromatografii na: [16, 17]

- Kapalinovou chromatografii, kdy je mobilní fáze kapalina (LC)
- Plynovou chromatografii, při které je mobilní fáze plyn (GC)

2) Podle uspořádání stacionární fáze dělíme chromatografii na: [16, 17]

- Kolonovou chromatografii, při které je stacionární fáze umístěna v koloně – například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)
- Plošné uspořádání, které lze dále rozdělit na:
 - Papírovou chromatografii (PC)
 - Tenkovrstvou chromatografii (TLC)

3) Podle podstaty děje převládajícího během separace: [12, 15–17]

- Adsorpční chromatografie je metodou, která využívá různé schopnosti analytu adsorbovat se na povrch adsorbentu (stacionární fáze).
- Rozdělovací chromatografie je metodou, při které se využívá rozdílné rozpustnosti separovaných látek ve fázi mobilní a fázi stacionární. Tyto dvě fáze musí být navzájem nemísitelné a stacionární fáze musí být tvořena kapalinou zakotvenou na vhodném nosiči, mobilní fáze může být kapalina nebo plyn.
- Iontově výměnná chromatografie využívá separace látek v iontové formě, které vykazují rozdílnou afinitu k funkčním skupinám stacionární fáze, jež je tvořena ionexem s bazickou nebo kyselou funkční skupinou. Pokud je aktivní skupina kyselá a nese záporný náboj, v praxi sulfo- nebo karboxy- kyselina, hovoříme o katexech a během chromatografického procesu dochází k dělení kationtů. V případě, že je aktivní skupina bazická a nese kladný náboj, v praxi kvarterní

amoniová báze nebo aminoskupina, hovoříme o anexech a během chromatografického procesu dochází k dělení aniontů.

- Gelová chromatografie využívá rozdělení na základě velikosti molekul. Stacionární fáze obsahuje póry, skrz které protéká mobilní fáze s analytem. Během tohoto procesu dochází k průniku malých molekul do pórů gelu, ve kterých dojde k jejich zdržení.
- Afinitní chromatografie, při které je ve stacionární fázi zakotvena látka (většinou biologické povahy), jež má schopnost specificky a reverzibilně vázat funkční skupiny analyzované látky. Typicky se jedná o interakce enzym-substrát, antigen-protilátka apod.

1.4. Volba chromatografické metody

Při výběru správné chromatografické metody v praxi je potřeba nejprve zvážit charakter vzorku, podle kterého se následně zvolí druh chromatografie a stacionární fáze. Poté následuje výběr fáze mobilní. [16]

Při výběru stacionární fáze je potřeba zvážit vlastnosti analytu, mezi které se řadí například relativní molekulová hmotnost, rozpustnost ve vodě a anorganických/organických rozpouštědlech, míra schopnosti disociace (iontové, disociovatelné a nedisociovatelné) a kyselost či zásaditost. [16]

Pro výběr mobilní fáze jsou klíčovými faktory viskozita, teplota varu, dielektrická síla a eluční síla. Eluční síla je závislá na polaritě rozpouštědla. [16]

1.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC z anglického High Performance Liquid Chromatography) je v současnosti jednou z nejvíce využívaných separačních analytických metod a používá se ve všech oblastech analýzy léčiv. Mezi její hlavní přednosti se řadí schopnost analyzovat i tepelně nestabilní látky, netěkavé látky a polymery, což ji činí mnohem použitelnější analytickou metodou než plynovou chromatografií (GC). [1, 18]

Principem HPLC je separace složek na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Vzhledem k tomu, že se mohou uplatnit všechny možné reversibilní mechanismy separace (adsorpce, rozdělování na základě rozpustnosti, síťový efekt gelu, iontová výměna nebo specifické interakce), je možné pomocí HPLC dělit směsi téměř všech organických látek. [16, 18]

Z hlediska polaritý fází může HPLC probíhat ve dvou variantách. Pokud je mobilní fáze tvořena nepolární kapalinou (pentan, benzen, isooktan, cyklohexan, dichlormetan) a stacionární fáze polární látkou (porézní oxid křemičitý = silikagel), jedná se o HPLC na normálních fázích. V případě, že je mobilní fáze tvořena polární kapalinou (voda, methanol, tetrahydrofuran, acetonitril) a stacionární fáze je nepolární (chemicky modifikovaný silikagel s navázanými hydrofobními skupinami – nejčastěji uhlíkaté řetězce C18), jedná se o HPLC na reverzních fázích. [16, 19, 20]

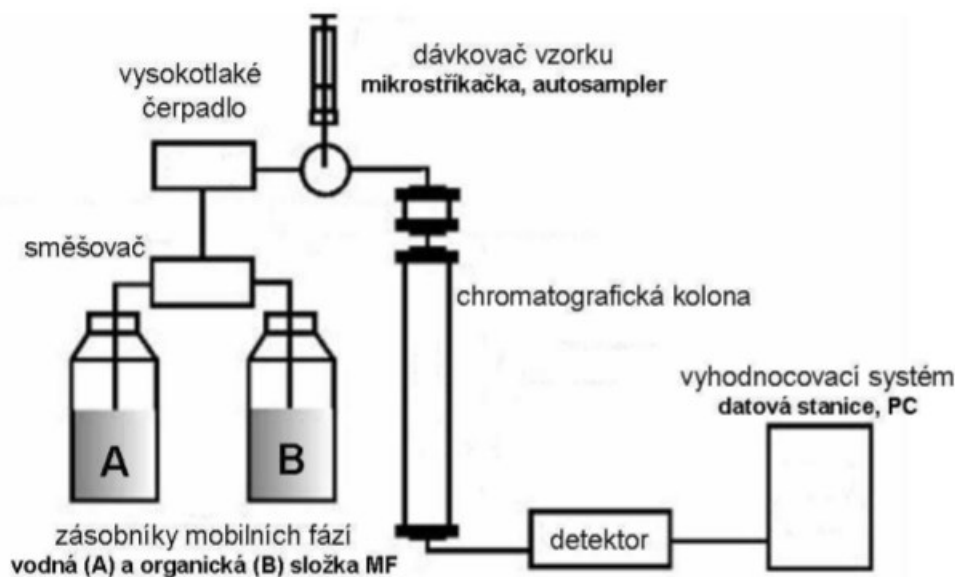
Během chromatografického procesu může být složení mobilní fáze konstantní – v tomto případě hovoříme o tzv. isokratické eluci. Isokratická eluce se využívá především pro separaci látek s podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Pokud se ale složení mobilní fáze mění s časem a dochází tak ke zvyšování eluční síly, jedná se o gradientovou eluci. Ta se používá pro separaci látek, které mají výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. U gradientové eluce může být doba analýzy kratší oproti izokratické eluci. [1, 21, 22]

Při HPLC analýze není potřeba převádět vzorek do plynného skupenství, proto je možné pracovat za normální teploty, avšak je nutné pracovat při vysokém tlaku, jelikož pro účinnou analýzu je třeba použít malá zrníčka sorbentu, která kladou pronikající kapalině odpor. [16]

1.5.1. Výhody HPLC:

- a) HPLC umožňuje hodnotit separované složky po kvantitativní i kvalitativní stránce.
- b) Analýza probíhá rychle a s vysokou citlivostí (ta se odvíjí od zvoleného detektoru).
- c) Pro analýzu je potřeba pouze malé množství vzorku.
- d) V současnosti lze díky automatickým dávkovačům vzorku metodu snadno automatizovat.
- e) Umožňuje separaci netěkavých látek, což je vzhledem k faktu, že většina léčiv není těkavá, hlavním důvodem, proč je v analýze léčiv použitelnější metodou než plynná chromatografie. [18]

1.6. Instrumentace HPLC



Obrázek 4 Schéma HPLC [23]

HPLC analýza probíhá na zařízení, které se nazývá chromatograf. Jeho schéma je uvedeno na obrázku č. 4. Mobilní fáze je uložena v zásobnících mobilních fází, odkud je pomocí vysokotlakého čerpadla přes směšovač a degasser přinášena do chromatografického systému. Degasser zachycuje plyny nacházející se v mobilní fázi a zabraňuje jejich průniku na kolonu. Mezi čerpadlem a chromatografickou kolonou se nachází dávkořovač vzorku – autosampler, který nastřikuje vzorek, jež je dále unášen mobilní fází až na kolonu, v níž se nachází stacionární fáze. V koloně dochází k separaci vzorku. Separované složky jsou dále unášeny mobilní fází až k detektoru, který odesílá signály do počítače. Počítač řídí chod celého systému a umožňuje zpracování výsledků analýzy. Součástí systému bývá také velmi často předkolona, která je, jak již z názvu vyplývá, umístěna před kolonou a zachytáváním nečistot chrání kolonu před znečištěním. [1, 16, 24]

1.6.1. Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky jsou nejčastěji vyrobeny ze skla a slouží pro uchování mobilní fáze, která z nich je nasávána teflonovými hadičkami. Hadičky jsou na koncích opatřeny filtry, které odstraňují mechanické nečistoty. [24]

1.6.2. Degasser

Degasser zabraňuje proniknutí plynů z mobilní fáze do chromatografického systému. Přítomnost plynů v mobilní fázi může způsobit zkreslení retenčního času nebo dokonce

zastavení čerpadla. V praxi se proto využívá membránový vakuový odplyňovač, ve kterém protéká mobilní fáze směrem od zásobníků do čerpadla skrze semipermeabilní hadičku. V některých případech je potřeba odplynění provést předem. To lze několika způsoby:

- Proublání heliem – ačkoliv se odstranění plynu plynem může zdát nelogické, vzhledem k inertnosti helia vůči mobilní fázi patří mezi nejefektivnější odplyňovací techniky. Helium z mobilní fáze vytěsni přibližně 80 % rozpuštěných plynů.
- Vakuová filtrace – funguje na principu snížení tlaku na povrchu solventu. Tato metoda odstraní přibližně 60–70 % rozpuštěného plynu.
- Sonikace (ultrazvuk) – jejím principem je rozptýlení submikro-bublinek plynu. Samostatná sonikace je pro většinu chromatografických systémů nedostatečná (odstraní 20–25 % plynu), a proto je možné ji zkombinovat s vakuovou filtrací. [19, 24, 25]

1.6.3. Čerpadlo

Mobilní fáze je do chromatografického systému nasávána čerpadlem. Čerpadla jsou nejčastěji tvořena z nerezové oceli, skla nebo keramiky a musí být zcela inertní vůči mobilní fázi. V praxi se používají membránová nebo pístová čerpadla. Pístové čerpadlo nesmí být jednočinné (nasává a vytlačuje pouze jednou stranou pístu), jelikož způsobuje tlakové rázy, proto se využívá pístových čerpadel dvojčinných (má dva pracovní prostory a čtyři ventily → nasává a vytlačuje dvěma stranami), dále čerpadel sériově zapojených nebo čerpadel s více písty. Levnější alternativou k pístovým čerpadlům jsou stříkačková čerpadla, která zajišťují dokonalý bezpulzní tok eluentu, jejich nevýhodou je ale omezený objem mobilní fáze. [16, 24, 26]

1.6.4. Směšovací zařízení

Směšovací zařízení připravuje směs kapalin mobilní fáze, která může být složením stále stejná (isokratická eluce) nebo se její složení v průběhu chromatografického procesu mění (gradientová eluce). [16]

1.6.5. Dávkovací zařízení

Funkcí dávkovacího zařízení je nastříkání přesného množství vzorku analytu do mobilní fáze. V dřívější době se k dávkování vzorku používaly injekční stříkačky, které byly zhotovené z inertního materiálu (nerezová ocel, titan, polymery). Injekční dávkování lze ovládat manuálně nebo automaticky a při samotném dávkování musí dojít k zastavení toku

mobilní fáze. Mezi jeho nevýhody se řadí především horší těsnost a vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Proto se v současné době od injekčních systémů ustoupilo a jsou nahrazovány dávkovacím smyčkovým ventilem, který je ovládaný manuálně nebo automaticky. Objem smyčky udává objem vzorku, který je nastříknut v jedné dávce (μl). [16, 24]

Vzorek se nachází ve vialkách, ze kterých je po propíchnutí septa dávkovacím zařízením nastříknut na kolonu. [24]

1.6.6. Předkolona

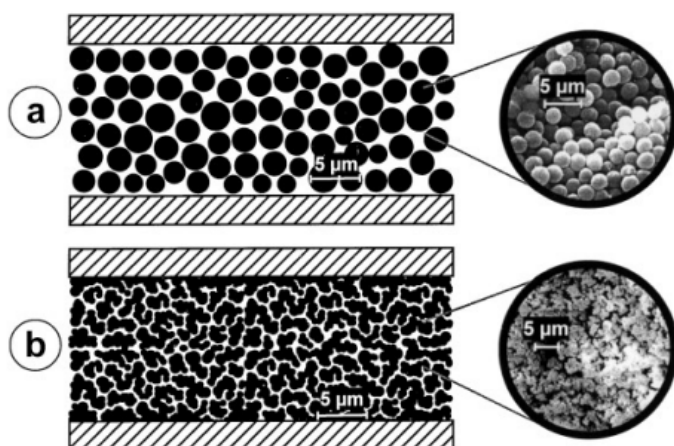
Předkolona je krátká kolona a nachází se před samotnou kolonou. Její funkcí je chránit kolonu před kontaminací, čímž významně zvyšuje životnost kolony (bez předkolony 1500-2000 analýz, s předkolonou 10000). Předkolona musí být naplněna naprosto stejným materiálem jako kolona, aby nedošlo ke zhoršení separace. [24, 27, 28]

1.6.7. Kolony

V analýze HPLC jsou častěji používány kolony částicové, nejčastěji zhotovené z nerezové oceli. Jsou dlouhé 5, 10, 15 nebo 25 cm s vnitřním průměrem od 2 do 5 mm a dovoleným průtokem do 2 ml za minutu. Kolony jsou plněné sorbenty. Nejčastěji užívaným typem sorbentu jsou chemicky vázané stacionární fáze, kde jsou na hydroxylových skupinách, jež se nachází na povrchu silikagelových zrn, navázány radikály. Tyto fáze mohou být nepolární, v tomto případě je na hydroxylových skupinách navázán uhlovodíkový řetězec C8 nebo C18. O středně polárních fázích hovoříme v případě, že je na hydroxylové skupiny navázán C3 řetězec s navázanou -CN nebo -NH₂ skupinou. Méně časté je využití polárních sorbentů, které jsou tvořeny především silikagelem nebo oxidem hlinitým. Speciálním případem je využití ionexů jako sorbentů pro potřeby iontové výměnné chromatografie a chirálních stacionárních fází pro analýzu enantiomerů. [1, 16]

Kolony používané při HPLC je možné rozdělit na částicové (a) a monolitické (b) (viz obrázek č. 5). Částicové kolony jsou naplněné částicemi sorbentu, na kterých je navázána funkční skupina ovlivňující charakter stacionární fáze. Velikost póru a průměr částic jsou přesně definovány. Jejich nevýhodou je omezení maximální rychlosti průtoku, což je způsobeno zpětným tlakem, který je nepřímo úměrný velikosti částic. Naproti tomu kolony monolitické, jak již název napovídá, jsou tvořeny jednou vysoce pórovitou částicí zaplňující celý vnitřní objem kolony. Póry umožňují volný průtok mobilní fáze skrz kolonu a na základě velikosti se dělí na makropóry (μm) a mesopóry (nm). Makropóry umožňují rychlý tok mobilní fáze skrze monolit bez překročení tlakového limitu, což má za důsledek zkrácení času analýzy.

Mesopóry zvyšují povrch pro interakci s analyzovanou látkou. Monolitické kolony se pro svou dobrou propustnost využívají především k separaci vysokomolekulárních látek. [29–31]



Obrázek 5 Rozdíl sktruktury částicové kolony (a) a monolitické kolony (b) [31]

1.6.8. Detektory

Detektory využívané v analýze HPLC by měly být dostatečně selektivní pro analyty a současně málo citlivé pro eluent. Použitý detektor určuje citlivost a selektivitu chromatografické metody. Detektory lze obecně rozdělit na concentration-sensitive, jejichž signál je úměrný koncentraci analytu a na mass-sensitive, jejichž signál je úměrný hmotnostnímu toku analytu (počet molekul za jednotku času). V analýze HPLC se používají především detektory citlivé na koncentraci. Dále je možné rozdělit detektory na univerzální (např. refraktometrický) a selektivní (např. UV/VIS). Univerzální detektory reagují na všechny látky, které jimi prostupují, naproti tomu detektory selektivní reagují jen na specifický analyt. [1, 16, 32, 33]

Na detektory jsou kladeny tyto požadavky:

- a) univerzálnost a citlivost
- b) široký lineárně dynamický rozsah
- c) malý mrtvý objem
- d) možnost gradientové eluce
- e) nejmenší možný mimokolonový příspěvek
- d) robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty [32, 33]

Typy detektorů:

1.6.8.1. Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou pro svou spolehlivost, jednoduchost použití a univerzálnost nejčastěji používanými detektory v HPLC analýze léčiv. Je možné je využít i při gradientové eluci. Fungují na principu měření absorbance¹ eluentu a zprostředkovávají plynulý signál, díky kterému je možné kvantifikovat množství přítomného chromoforu². Analýza léčiv probíhá nejčastěji v UV oblasti světla, případně i ve viditelné oblasti světla. Spektrofotometrické detektory lze rozdělit na čtyři podskupiny:

- UV detektor s fixní vlnovou délkou (254 nm nebo 280 nm), jedná se o jeden z cenově dostupnějších detektorů.
- UV/VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou; tento detektor využívá deuteriový a wolframový zdroj a monochromátor, což umožňuje výběr požadované vlnové délky.
- Scanning UV detektor; tento detektor snímá absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva.
- Diode array detector (DAD); tento detektor je schopen detekovat celé UV/VIS spektrum (od 190 nm do 800 nm) eluentu pomocí fotodiodového zobrazovacího senzoru, který se skládá z 512 nebo 1024 diod. Každá dioda sbírá data z 0.5-1 nm.

Citlivost spektrofotometrických detektorů se pohybuje mezi 10^{-9} až 10^{-10} g/ml. [1, 34, 35]

1.6.8.2. Fluorometrické detektory

Některé molekuly disponují schopností při deexcitaci elektronů emitovat světlo. Zmíněný proces se nazývá fluorescence. Fluorometrické detektory se tedy využívají pro detekci látek, jež mají schopnost fluorescence. Fluorometrické detektory lze v některých případech využít i pro detekci léčiv, která schopnost fluorescence nemají, ale jejich metabolity či rozkladné produkty ano. V některých případech lze nefluorescentní látky převést na fluorescentní látky pomocí vhodných činidel. Tento proces se nazývá derivatizace. Fluorometrická detekce je selektivnější a je možné ji využít i při gradientové eluci. Její citlivost se pohybuje mezi 10^{-9} až 10^{-12} g/ml. [1, 36]

¹ Absorbance je bezrozměrná veličina, která je definovaná jako záporný logaritmus transmitance (poměr intenzity světla, které prošlo vzorkem a intenzity světla, které do vzorku vstoupilo při určité vlnové délce). [34]

² Chromofor je ta část molekuly, která má schopnost absorbovat UV nebo viditelné světlo. [34]

1.6.8.3. *Elektrochemické detektory*

Elektrochemické detektory fungují na principu měření elektrochemické veličiny, která je přímo úměrná množství měřené látky, jež prošla skrze celu s elektrodami. Elektrochemickou detekci lze uplatnit pouze pro látky, které mají po kontaktu s elektrodou schopnost oxidace nebo redukce. Chemicky se jedná především o fenoly, aromatické aminy, heterocykly, halogenované fenoly, halogenované hydroxybifenyly, sulfonamidy, karoteny, thioly a disulfidy. Během analýzy je nutné zabezpečit vodivost mobilní fáze, toho lze dosáhnout přítomností elektrolytů (typicky fosfátové či citrátové soli), a také zajistit určitou hodnotu pH mobilní fáze, jež je důležité pro elektrochemickou aktivitu některých látek. Citlivost elektrochemických detektorů je 10^{-9} až 10^{-12} g/ml, což odpovídá citlivosti fluorometrických detektorů, avšak na rozdíl od nich nelze elektrochemické detektory použít u gradientové eluce. [1, 37, 38]

1.6.8.4. *Refraktometrické detektory*

Refraktometrický detektor pracuje na principu měření rozdílu indexu lomu mezi eluátem obsahujícím analyt a čistou mobilní fází. Tato detekční metoda je univerzální, avšak oproti ostatním metodám je velmi málo citlivá (10^{-6} g/ml). Další její nevýhodou je nutnost udržení konstantní teploty během chromatografické analýzy. [1, 16]

1.6.8.5. *Spojení HPLC s hmotnostním spektrem*

Hmotností spektrometrie je jednou z nejcitlivějších detekčních metod. Kromě kvantifikace poskytuje také kvalitativní údaje potřebné pro identifikaci léčiv. Prvním krokem detekce je odpaření mobilní fáze a ionizace molekul analytu. Ionizace je proces, při kterém z neutrální molekuly vzniká nabitá částice. V hmotností spektrometrii lze ionizace dosáhnout třemi následujícími způsoby:

a) ionizace elektrosprejem (ESI) – tento způsob ionizace je považován za „měkký“ (molekule je předáno menší množství energie než při použití ostatních technik) a využívá se především pro analýzu peptidů a xenobiotik

b) chemická ionizace (APCI) – tato technika je vhodná pro malé, termostabilní molekuly

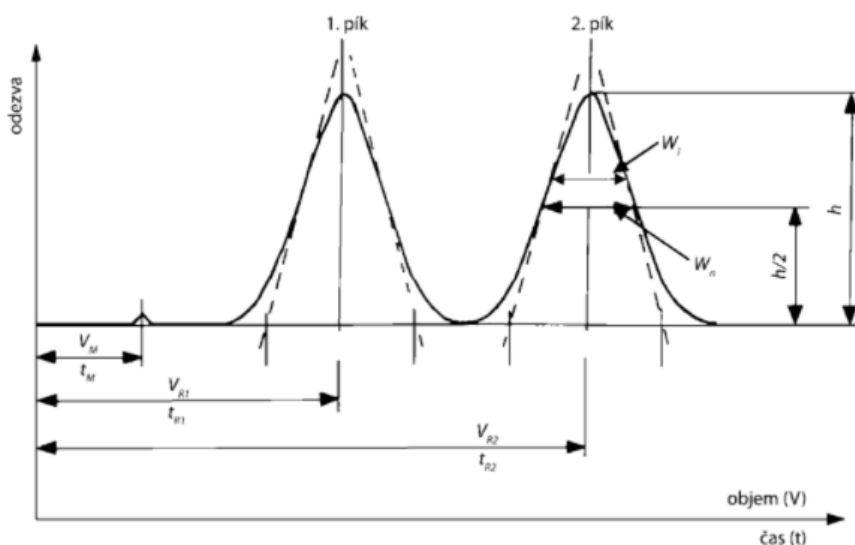
c) fotoionizace (APPI) – využívá se především pro analýzu neutrálních směsí (např. steroidů)

Dalším krokem detekce je separace nabitých částic, jež jsou v magnetickém či vysokofrekvenčním poli děleny dle hmotnosti a náboje. Výsledkem detekce je hmotnostní

spektrum. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie se řadí mezi finančně náročnější metody. [1, 39]

1.7. Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatografické analýzy

Grafickým výstupem každé chromatografické analýzy je chromatogram. Chromatogram je tvořen osou x a y, kdy osa x odpovídá retenčnímu času a osa y odezvě detektoru. Ideální chromatogram je tvořen gaussovskými píky, kdy každý pík představuje odezvu detektoru a odpovídá jedné analyzované látce. [40, 41]



Obrázek 6 Příklad chromatogramu [40]

Vyhodnocování dat v chromatografii můžeme rozdělit na kvalitativní (identifikace) a kvantitativní (stanovení). Kvalitativní charakteristikou je retenční čas t_r , což je čas potřebný pro eluci analytu, tedy čas od jeho nástřiku na kolonu až po dosažení vrcholu píku. Identifikace látek se provádí pomocí porovnání retenčního času analytu a standardu. [1, 40]

Kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem. Pro stanovení látek ve směsi se používají následující dvě metody: metoda vnějšího standardu a metoda vnitřního standardu.

a) *Metoda vnějšího standardu:* Při použití metody vnějšího standardu je zapotřebí připravit kalibrační roztoky standardů pro stanovovanou látku v určitém koncentračním rozmezí. Vnější standardem bývá chemická referenční látka (CRL), což je standard stanovované látky. V případě analýzy složených lékových přípravků se analyzuje jedna z jeho složek. Analýza standardu a neznámého vzorku probíhá v odlišném čase. Kvantifikace se provádí pomocí kalibrační křivky (plocha píku = osa y; koncentrace = osa x). [1, 42]

b) *Metoda vnitřního standardu*: Jak již název napovídá, při použití metody vnitřního standardu se jeho definovaný objem přidá ke známému objemu vzorku. Analýza neznámého vzorku a vnitřního standardu tedy probíhá současně, což je časově úspornější a dochází k eliminaci chyb, které mohou vzniknout u dvojího nástřiku. Na výběr vhodného vnitřního standardu jsou kladeny následující požadavky: musí být chemicky inertní, k jeho eluci musí docházet v blízkosti píků zkoumané látky a jeho koncentrace musí být podobná koncentraci zkoumané látky. Kvantifikace se provádí ze získaných chromatografických záznamů. [1, 42]

1.8. Validace

Validace je proces, jehož účelem je potvrdit, že je analytická metoda vhodná pro své zamýšlené použití, tzn. že je v konkrétní situaci s vysokým stupněm jistoty schopna opakovaně poskytovat konkrétní výsledek. O validaci hovoříme v případě, že je ověřován proces. Ověřování zařízení či systému je nazýváno jako kvalifikace. [43]

1.8.1. Správnost

Správnost metody je stupeň shody výsledku získaného měřením se správnou hodnotou. Stanovení správné hodnoty je možné pomocí analýzy modelového vzorku (placebo + známé množství analytu), analýzy vzorku s přidávkem analytu či provedením analýzy validovanou metodou. Správnost je vyjádřena výtěžností [%], jež se vypočítá dle vzorce: [43, 44]

$$R = \frac{\text{stanovená hodnota} * 100}{\text{správná hodnota}}$$

Správnost je hodnocena pomocí procentuální chyby, jež se vypočítá dle vzorce:

$$\frac{\text{stanovená hodnota} - \text{správná hodnota}}{\text{správná hodnota}} * 100$$

1.8.2. Přesnost

Přesnost metody vyjadřuje míru shody mezi individuálními výsledky naměřenými s jedním vzorkem. Přesnost tedy reflektuje schopnost reprodukovat stejné výsledky, ale nezabývá se jejich správností. Měření probíhá obvykle na šesti na sobě nezávisle připravených vzorcích a výsledek je vyjádřen relativní směrodatnou odchylkou. Relativní směrodatná odchylka se vypočítá dle následujícího vzorce:

$$RSD = \frac{d}{X} * 100 \%$$

kdy d je průměr a X směrodatná odchylka.

Kritéria přijatelnosti pro přesnost závisí na typu analýzy. Přesnost se dále dělí na tři úrovně:

a) Opakovatelnost

Pokud analýzu provádí jeden analytik, v jedné laboratoři, na jednom přístroji, se stejnými chemikáliemi během krátkého časového úseku, hovoříme o opakovatelnosti.

b) Mezilehlá přesnost

Oproti opakovatelnosti probíhá hodnocení mezilehlé přesnosti v delším časovém úseku (týdny) v jedné laboratoři. Jednotlivé analýzy se od sebe liší analytikem, jenž provedl analýzu, použitými chemikáliemi, použitými přístroji či kombinací výše uvedeného.

c) Reprodukovatelnost

Při hodnocení reprodukovatelnosti probíhá analýza v delším časovém úseku v rozdílných laboratořích. [43, 44]

1.8.3. Linearita

Linearitou se rozumí způsobilost metody poskytovat výsledky, jež jsou přímo úměrné koncentraci analytu obsaženého ve vzorcích. Pro stanovení linearity je potřeba provést měření na minimálně pěti roztocích standardu, přičemž koncentrace analytu se s každým vzorkem zvyšuje vždy o stejné množství (např. 80 %, 90 %, 100 %, 110 % a 120 %). Vyhodnocení probíhá matematicky i graficky, konkrétně s využitím grafu lineární regrese, rovnicí přímky a korelačního koeficientu. Korelační koeficient by se měl pohybovat v rozmezí 0.98 až 1.00, přičemž čím více se hodnota blíží 1.00, tím lepší linearitu metoda vykazuje. [43, 44]

1.8.4. Citlivost – detekční a kvantitativní limit

Detekčním limitem (LOD) se rozumí nejnižší možná koncentrace analytu, jež může být detekována nad hranicí šumu detektoru. Prakticky se tedy jedná o nejmenší možné nastříknuté množství analytu, které se na chromatogramu projeví píkem 2–3x větším, než je šum. [43, 44]

Oproti detekčnímu limitu je kvantitativním limitem (LOQ) nejnižší možná koncentrace analytu, kterou lze stanovit s dostatečnou precizností a přesností. Výška píku by měla být minimálně 10–20x větší než hodnota šumu. [43, 44]

1.8.5. Robustnost

Robustnost stanovuje, jak velký efekt mají operační parametry na výsledky analýzy. Pro určení robustnosti dané metody dochází ke sledování vlivu změny parametrů analýzy (např

průtok, teplota kolony...) na výsledky analýzy. Robustnost je ve validačním protokolu hodnocena vždy slovně.

1.8.6. Selektivita

Selektivita vyjadřuje schopnost metody analyzovat pouze analyt přítomnosti interferujících látek, kterými mohou být například syntetické prekurzory, degradační produkty, pomocné látky, rozpouštědla a jiné.

1.8.7. System Suitability Test

Systém Suitability Test (SST) neboli test způsobilosti chromatografického systému stanovuje podmínky, jejichž splnění zaručuje spolehlivost metody a provádí se vždy před začátkem měření, v průběhu měření a v jeho samotném závěru. SST se uplatňuje pouze u metod, které jsou již validované. Mezi sledované parametry se řadí opakovatelnost nástřiku, rozlišení, faktor symetrie píku, počet teoretických pater a poměr signálu k šumu. V případě, že nastane situace, kdy jeden nebo více parametrů nevyhovuje, je možné upravit podmínky analýzy, avšak během úprav nesmí dojít k podstatné změně metody a všechny úpravy musí být v souladu s lékopisnou monografií. [1, 43, 44]

2. PRAKTICKÁ ČÁST

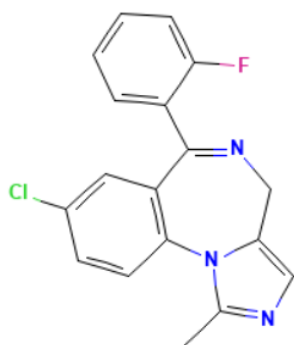
2.1. Použité chemikálie

Použité benzodiazepiny jsou shrnuty v tabulce číslo 1:

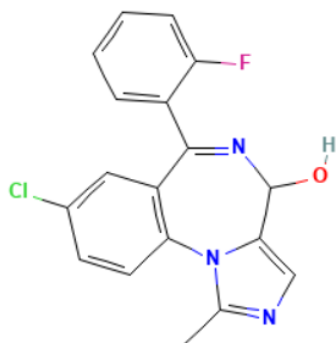
Látka	Systematický název	Zkratka	Dodavatel	M (g/mol)
Midazolam	8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-1-methyl-4 <i>H</i> -imidazo[1,5- <i>a</i>][1,4]benzodiazepin	MZD	Toronto Research Chemicals	325.8
4-hydroxymidazolam	8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-1-methyl-4 <i>H</i> -imidazo[1,5- <i>a</i>][1,4]benzodiazepin-4-ol	4-OH MZD	Toronto Research Chemicals	341.8
1-hydroxymidazolam	[8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-4 <i>H</i> -imidazo[1,5- <i>a</i>][1,4]benzodiazepin-1-yl]methanol	1-OH MZD	Toronto Research Chemicals	341.8
Diazepam	7-chlor-1-methyl-5-fenyl-2,3-dihydrobenzo[<i>e</i>][1,4]-diazepin-2-on	DZP	Dar prof. Doležala (katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy)	284.74

Tabulka 1 Přehled použitých benzodiazepinů

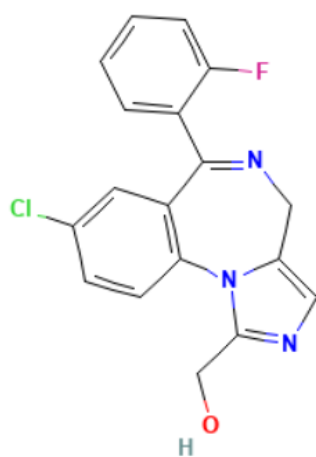
Struktury použitých benzodiazepinů jsou uvedeny na obrázcích (7-10):



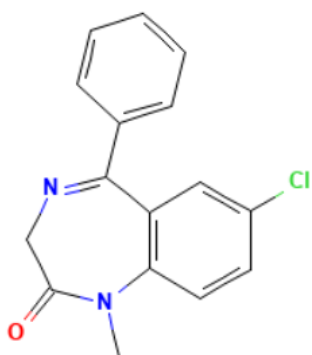
Obrázek 7 Struktura midazolamu [45]



Obrázek 8 Struktura 4-hydroxymidazolamu [46]



Obrázek 9 Struktura 1-hydroxymidazolamu [47]



Obrázek 10 Struktura diazepamu [48]

V tabulce č. 2 jsou shrnuty ostatní použité chemikálie:

Látka	Dodavatel
Methanol CHROMASOLV [®] gradient grade for HPLC	Aldrich
Ultračistá voda	FaF UK
Acetonitril CHROMASOLV [®] gradient grade for HPLC	Aldrich
Octan amonný p.a.	Penta
Kyselina octová 99.9 % p.a.	Lachema Neratovice

Tabulka 2 Ostatní použité chemikálie

2.2. Přístrojové vybavení

Během analýzy byly použity následující přístroje:

– Kapalinový chromatograf Shimadzu; Kapalinový chromatograf Shimadzu: degasér DGU A5, vysokotlaké čerpadlo LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp, kolonový termostat CTO-10Avp, PDA detektor SPD-M10Avp. Řízení chromatografu bylo prováděno prostřednictvím řídicí jednotky SCL-10Avp z počítače pomocí chromatografického software CLASS-VP.

- Kolona POROSHELL 120 EC-C18, 3.0 X 100 NM, 2.7 µm (Agilent technologies)
- pH-metr inoLab 720 (WTW) s kombinovanou elektrodou SenTix61 (WTW)
- Digitální váhy (Sartorius)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Aparatura pro vakuovou filtraci (Vakuová vývěva KNF N810 (Neuberger) s filtračním zařízením (Supelco))
- Laboratorní třepačka Vibramax 110 (Heidolph)
- Centrifuga (Hermle Z100M)
- Koncentrátor 5301 AG (Eppendorf)
- Laboratorní sklo

– Vialky

2.3. Příprava vzorků

2.3.1. Příprava základních roztoků MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD

Navážka látky (MZD 1.3 mg; 1-OH MZD 1 mg; 4-OH 1.1 mg) byla v kádince rozpuštěna v potřebném množství methanolu a následně v 10 ml odměrné baňce doplněna methanolem po rysku. Výsledkem tedy byly roztoky následujících koncentrací: MZD 0.13 mg/ml; 1-OH MZD 0,1 mg/ml; 4-OH MZD 0,11 mg/ml.

2.3.2. Příprava pufovacího roztoku octanu amonného – pH = 4.5

Pro přípravu roztoku octanu amonného pH 4.5 (pufru) pro mobilní fázi byla navážka (0.5740 g) rozpuštěna v přibližně 450 ml ultračisté vody v kádince. Úprava pH byla provedena na pH metru inoLab 720 (WTW) s kombinovanou elektrodou SenTix61 (WTW) a pomocí kyseliny octové bylo pH ustáleno na hodnotě 4.5. Roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn ultračistou vodou po rysku. Připravený roztok byl zbaven nečistot vakuovou filtrací. Koncentrace připraveného roztoku byla 0,015 mol/l.

2.3.3. Příprava roztoku DZP

Navážka 1 mg DZP byla rozpuštěna v potřebném množství methanolu, převedena do 10 ml odměrné baňky a následně doplněna methanolem po rysku. Výsledkem byl roztok diazepamu o koncentraci 0.1 mg/ml.

2.3.4. Příprava kalibračních roztoků

Byla vytvořena řada kalibračních roztoků ze základních připravených dle podkapitoly 2.3.1. a to následujícím způsobem: bylo smícháno 10 µl MZD, 10 µl 1-OH MZD, 10 µl 4-OH MZD a 10 µl DZP jako vnitřního standardu v jedné vialce. Ke směsi byl přidán 1 ml mobilní fáze (300 µl acetonitrilu a 700 µl octanu amonného). 7.5 µl MZD, 7.5 µl 1-OH MZD, 7.5 µl 4-OH MZD a 10 µl DZP jako vnitřního standardu bylo v jedné vialce smícháno s 1 ml mobilní fáze (300 µl acetonitrilu a 700 µl octanu amonného). Obdobně bylo postupováno pro objemy vzorků 5 µl a 2.5 µl.

2.3.5. Zpracování biologického materiálu

V mikrozkuhavce Eppendorf bylo ke 200 µl plazmy přidáno 10 µl amoniaku 25%, 10 µl roztoku vnitřního standardu 0,1 mg/ml a 300 µl MTBE. Tato směs byla třepána na laboratorní třepačce 10 minut a poté odstředěna na centrifuze při 2200 otáčkách/min po dobu 3 minut. Poté byla MTBE vrstva odebrána do čisté mikrozkuhavky Eppendorf, z níž byla odpařena v koncentrátoru při 45°C 30 minut. Odparek byl poté rekonstituován 80 µl mobilní fáze.

Při přípravě vzorků pro validaci bylo k plazmě před extrakcí přidáno nejprve příslušné množství analytů, tato směs byla 5 minut protřepána na laboratorní třepačce a poté byl již postup zpracování shodný s postupem v předchozím odstavci.

2.4. Výchozí podmínky analýzy HPLC

Během každé analýzy bylo nastříkováno 10 μ l vzorku. Kolona byla termostatována na 25 °C. Detekce byla prováděna pomocí diode array detektoru při vlnových délkách 223 a 272 nm. Analýza byla prováděna na reverzních fázích za využití isokratické eluce.

3. VÝSLEDKY

3.1. Stanovení podmínek analýzy HPLC

3.1.1. Pokusy s mobilní fází se složením: 50 % acetonitrilu a 50 % ultračisté vody, za průtoku 0.500 ml/min

Analýza probíhala při 25 °C, s nástřikem 10 µl. Detekce byla prováděna pomocí diode array detektoru při vlnových délkách 223 nm a 272 nm. Tyto podmínky zůstaly neměnné i pro následující analýzy.

Mobilní fáze byla tvořena acetonitrem a ultračistou vodou v poměru 50/50. Průtok mobilní fáze byl nastaven na rychlost 0.500 ml/min. Nastříkovány postupně byly MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD. Retenční časy jsou shrnuty v tabulce č. 3:

Látka	Retenční čas (min)
MZD	2.976
1-OH MZD	2.069
4-OH MZD	1.931

Tabulka 3 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 50/50 a průtoku 0.500 ml/min

Retenční časy 1-OH MZD a 4-OH MZD jsou příliš blízko u sebe, v následující analýze je třeba zvýšit množství ultračisté vody.

3.1.2. Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % ultračisté vody, za průtoku 0.500 ml/min

Složení mobilní fáze bylo změněno na poměr acetonitrilu a ultračisté vody 30/70. Rychlost průtoku mobilní fáze zůstala na hodnotě 0.500 ml/min. Nastříkovány postupně byly MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD. Retenční časy jsou shrnuty v tabulce č. 4:

Látka	Retenční čas (min)
MZD	19.312
1-OH MZD	9.883
4-OH MZD	8.288

Tabulka 4 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 30/70 a průtoku 0.500 ml/min

Při změně poměru složení mobilní fáze došlo ke zvýšení rozdílu retenčních časů 1-OH a 4-OH MZD, které jsou již dobře separovány. Jelikož má ale voda nižší eluční sílu než acetonitril, došlo k prudkému nárůstu hodnot retenčních časů analytů, zejména MZD. V následující analýze se bude zvyšovat rychlost průtoku mobilní fáze.

3.1.3. Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % ultračisté vody, za průtoku 0.600 ml/min

Během této analýzy zůstalo složení mobilní fáze stejné jako v předchozí (acetonitril/ultračistá voda 30/70). Rychlost průtoku mobilní fáze byla zvýšena z 0.500 ml/min na 0.600 ml/min. Nastříkované postupně byly MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD. Retenční časy jsou shrnuty v tabulce č. 5:

Látka	Retenční čas (min)
MZD	18.789
1-OH MZD	9.728
4-OH MZD	8.453

Tabulka 5 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 30/70 a průtoku 0.600 ml/min

Zvýšením rychlosti průtoku mobilní fáze došlo k minimálnímu snížení retenčních časů. V následující analýze bude ultračistá voda zaměněna za roztok octanu amonného o pH 4.5.

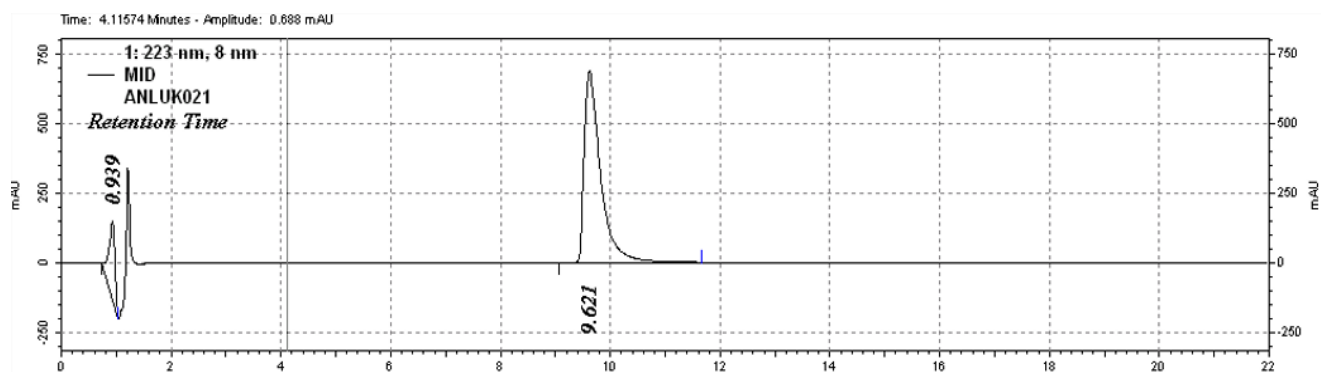
3.1.4. Pokusy s mobilní fází se složením: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min

Během této analýzy došlo ke změně složení mobilní fáze: ultračistá voda byla nahrazena roztokem octanu amonného pH 4.5, poměr zůstal stejný (acetonitril/octan amonný 30/70). Rychlost průtoku mobilní fáze byla stále na hodnotě 0.600 ml/l. Nastříkovány postupně byly MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD. Retenční časy jsou shrnuty v tabulce č. 6:

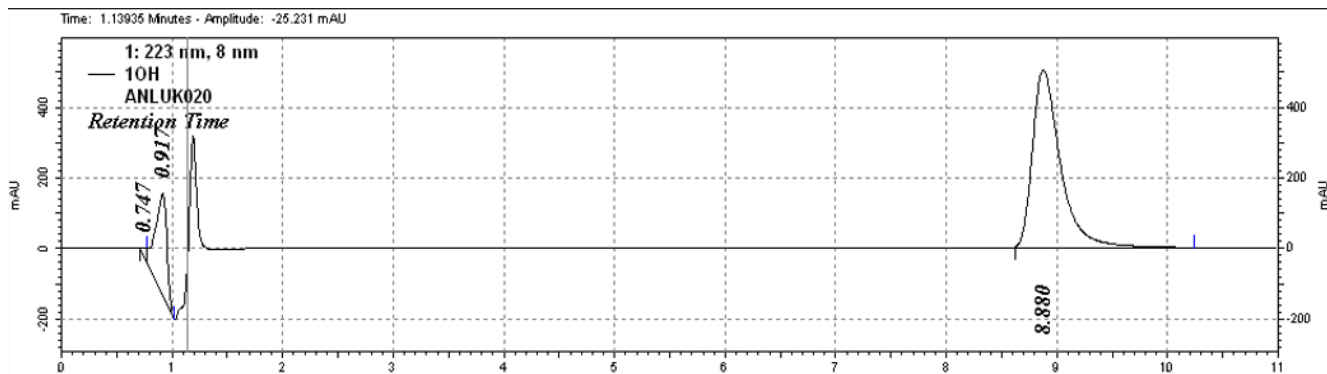
Látka	Retenční čas (min)
MZD	9.621
1-OH MZD	8.875
4-OH MZD	5.547

Tabulka 6 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 30/70 a průtoku 0.600 ml/min

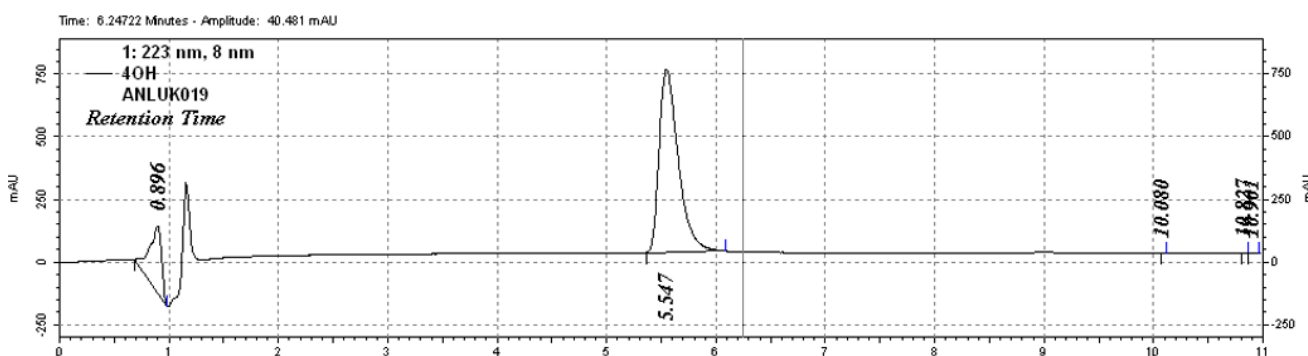
Chromatogramy jednotlivých analytů jsou znázorněny na obrázcích č. 11–13.



Obrázek 11 Chromatogram MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min



Obrázek 12 Chromatogram 1-OH MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min



Obrázek 13 Chromatogram 4-OH MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min

Změnou mobilní fáze došlo k výraznému poklesu hodnot retenčních časů studovaných látek. V dalším kroku došlo k naředění vzorků analytů následujícím způsobem: 10 μ l analytu bylo ve vialce zředěno směsí skládající se ze 300 μ l acetonitrilu a 700 μ l octanu amonného. Tímto způsobem se postupovalo individuálně pro každou látku (MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD). Takto připravené vzorky byly analyzovány za podmínek totožných s poslední analýzou. Retenční časy jsou shrnuty v tabulce č. 7:

Látka	Retenční čas (min)
MZD	9.632
1-OH MZD	8.784
4-OH MZD	5.413

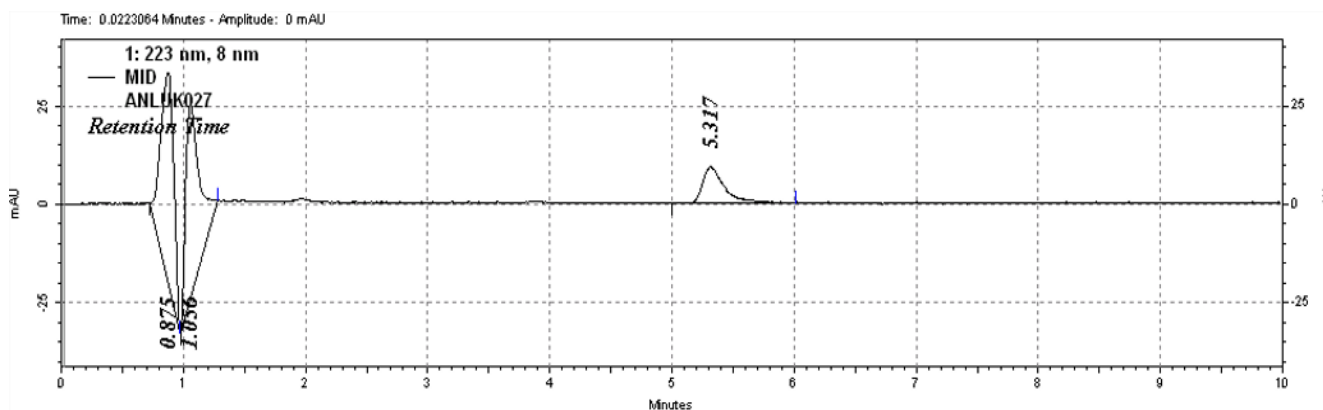
Tabulka 7 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 a průtoku 0.600 ml/min po naředění vzorků

3.1.5. Pokusy s mobilní fází se složením: 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min

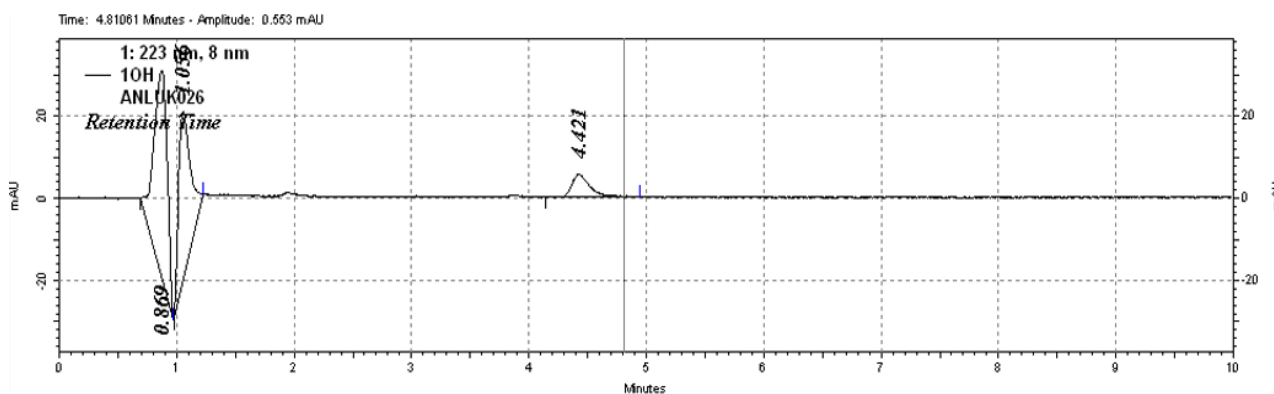
Během tohoto pokusu byl změněn poměr složek mobilní fáze acetonitril/octan amonný na 35/65. Rychlost průtoku mobilní fáze byla stále 0.600 ml/min. Analýza byla provedena s naředěnými vzorky analytů. Retenční časy jsou uvedeny v tabulce č. 8, chromatogramy na obrázcích č. 14–16.

Látky	Retenční čas (min)
MZD	5.317
1-OH MZD	4.421
4-OH MZD	3.243

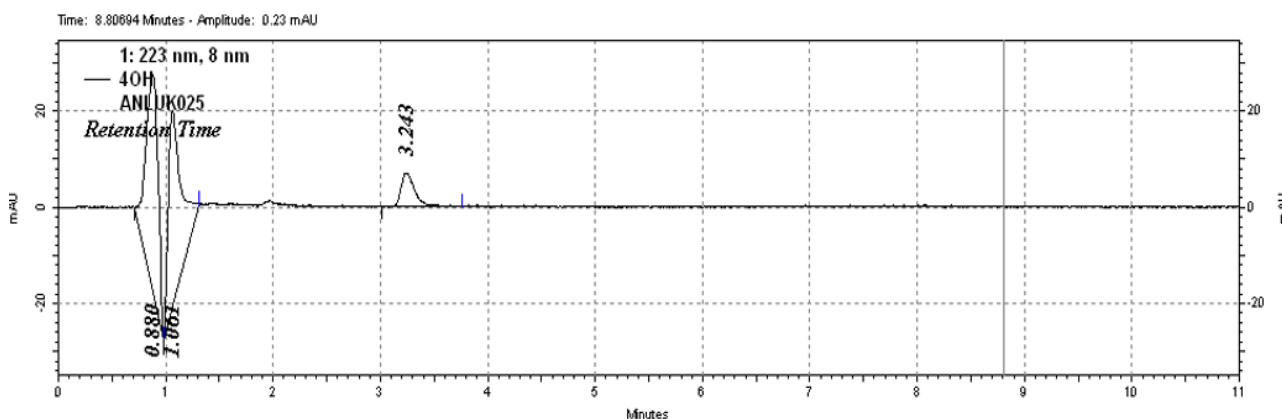
Tabulka 8 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 35/65 a průtoku 0.600 ml/min



Obrázek 14 Chromatogram MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min



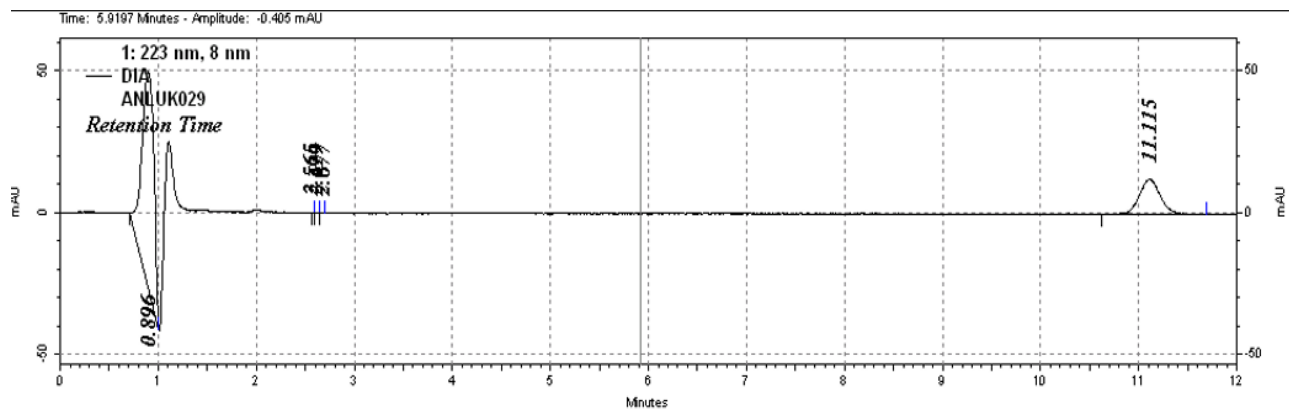
Obrázek 15 Chromatogram 1-OH MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min



Obrázek 16 Chromatogram 4-OH MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min

Takto nastavené chromatografické podmínky poskytují uspokojivé hodnoty retenčních časů. Za těchto chromatografických podmínek byl jako vnitřní standard analyzován vzorek diazepamu, jehož příprava je popsána v podkapitole 2.3.3.

Výsledný retenční čas diazepamu byl **11.184 min.** V dalším kroku bylo 10 µl roztoku diazepamu 100x naředěno směsí skládající se ze 300 µl acetonitrilu a 700 µl octanu amonného. Tento roztok byl podroben analýze za stále stejných chromatografických podmínek. Výsledný retenční čas byl **11.115 min**, chromatogram viz obrázek č. 17. Diazepam se jeví jako vhodný standard, avšak jeho retenční čas by mohl ideálně být ještě kratší, proto v další analýze dojde ke zvýšení rychlosti průtoku.



Obrázek 17 Chromatogram DZP při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min

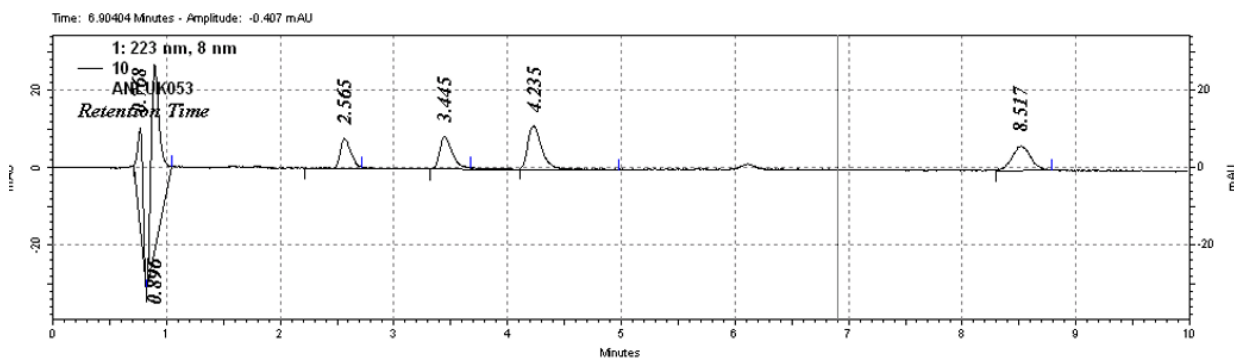
3.1.6. Pokusy s mobilní fází se složením: 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.700 ml/min

Během tohoto pokusu bylo zachováno složení mobilní fáze, ale rychlost průtoku se změnila z 0.600 ml/min na 0.700 ml/min. Analýza byla prováděna na kalibrační řadě roztoků připravených dle podkapitoly 2.3.4.

Retenční časy vzorku obsahujícího 10 µl MZD, 1-OH MZD, 4-OH MZD a DZP jsou uvedeny v tabulce č. 9, chromatogram je zobrazen na obrázku č. 18.

Látka	Retenční čas (min)
MZD	4.235
1-OH MZD	3.445
4-OH MZD	2.565
DZP	8.517

Tabulka 9 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH=4.5 30/70 a průtoku 0.700 ml/min



Obrázek 18 Chromatogram 4-OH MZD, 1-OH MZD, MZD a DZP při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.700 ml/min

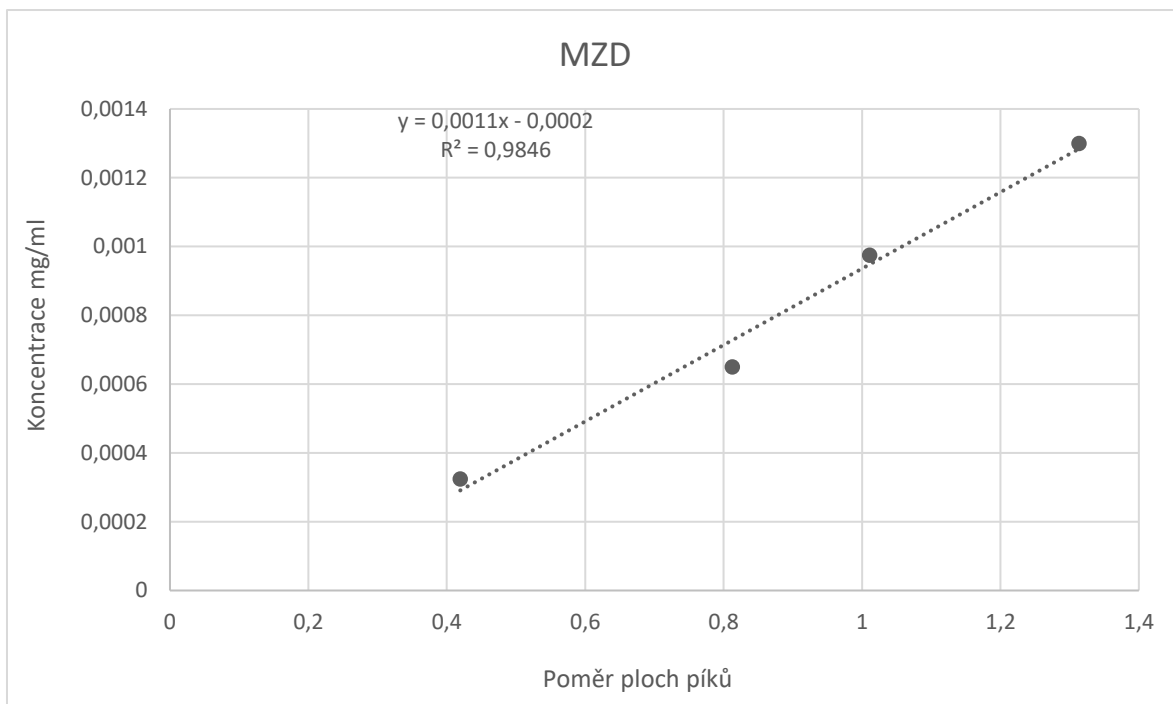
Hodnoty retenčních časů jsou uspokojivé.

Byla změřena kalibrační řada vzorků MZD, 1-OH MZD, 4-OH MZD a vnitřního standardu DZP pro případnou kontrolu koncentrací dříve připravených roztoků. Tento krok byl požadován spolupracující katedrou biochemických věd, výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 10. Z naměřených výsledků byl pro každou látku vytvořen graf lineární závislosti koncentrace na

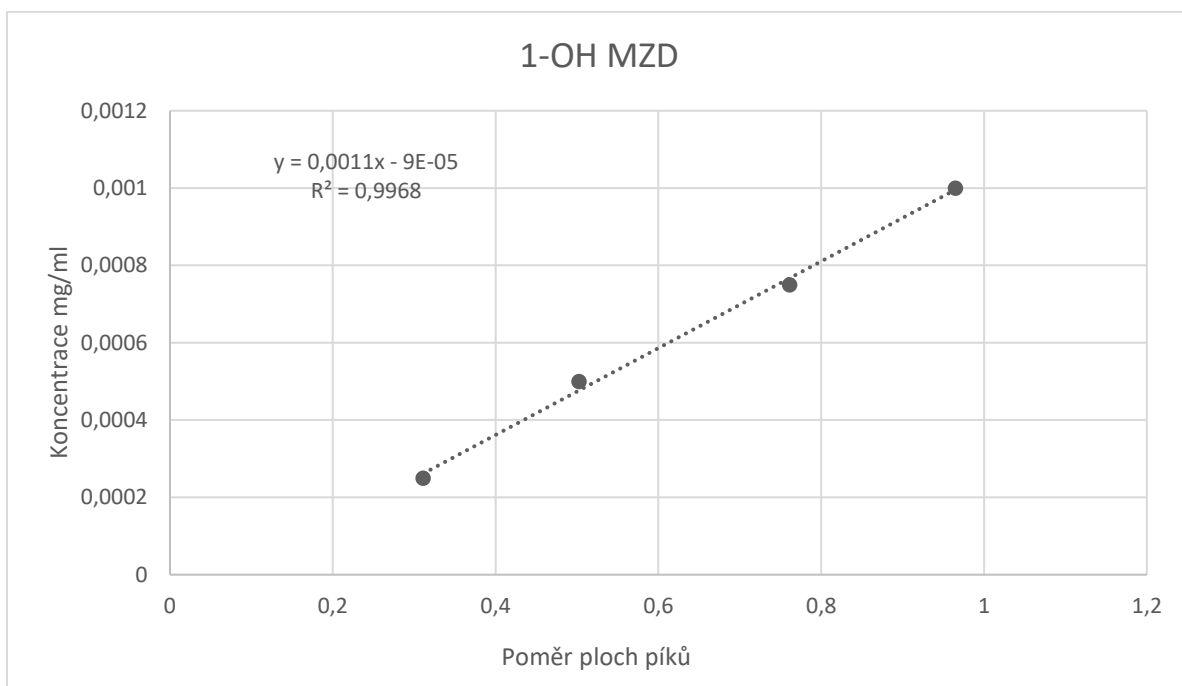
poměru ploch píků analytu a vnitřního standardu, tedy kalibrační křivka. (kalibrační křivky viz. obrázky č. 19-21)

Objem látky ve vzorku	Koncentrace (mg/ml)	Plocha píku (mAU.min)	Plocha píku diazepamu (mAU.min)	Poměr ploch píků (vzorek/DZP)
MZD				
2.5 µl	0.000325	34816	83006	0.41944
5 µl	0.00065	63935	78715	0.812234
7.5 µl	0.000975	81707	80826	1.0109
10 µl	0.0013	101750	77468	1.313446
1-OH MZD				
2.5 µl	0.00025	25813	83006	0.310978
5 µl	0.0005	39539	78715	0.502306
7.5 µl	0.00075	61502	80826	0.760919
10 µl	0.001	74728	77468	0.964631
4-OH MZD				
2.5 µl	0.000275	19421	83006	0.233971
5 µl	0.00055	28465	78715	0.361621
7.5 µl	0.000825	43140	80826	0.533739
10 µl	0.0011	55279	77468	0.7352

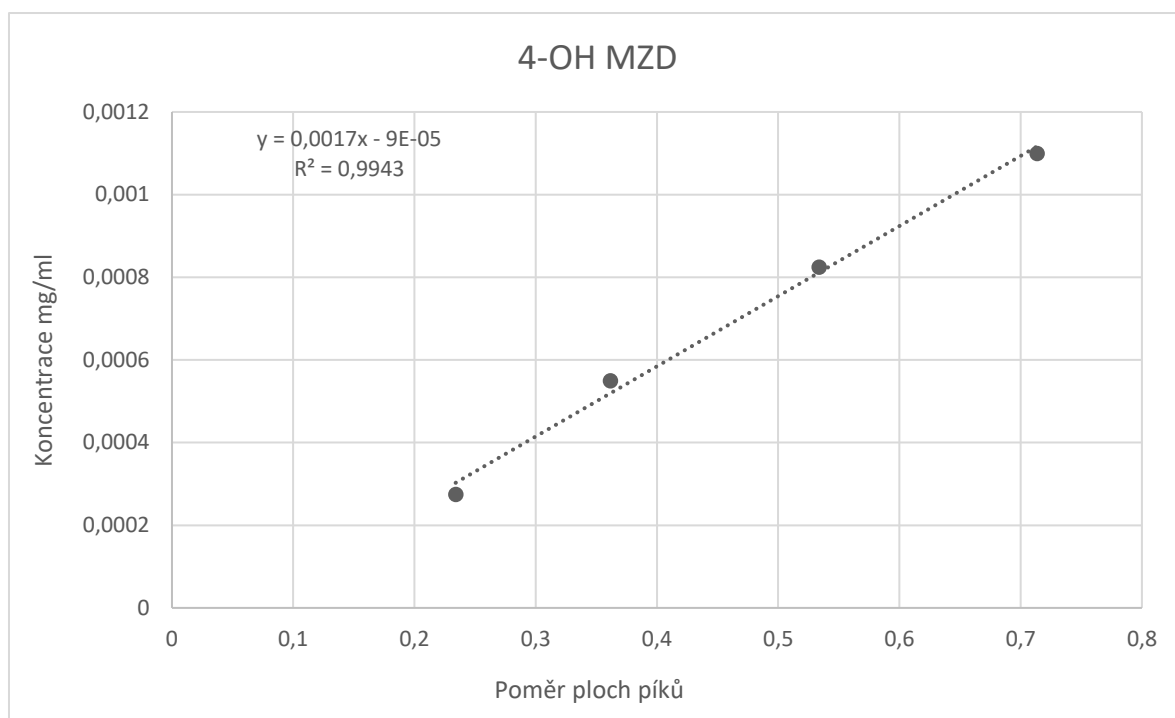
Tabulka 10 Výsledky kalibrační řady



Obrázek 19 Kalibrační křivka pro MZD



Obrázek 20 Kalibrační křivka 1-OH MZD



Obrázek 21 Kalibrační křivka 4-OH MZD

Souhrn nalezených podmínek pro HPLC analýzu MZD, 1-OH MZD a 4-OH MZD je v tabulce č. 11:

Kolona	POROSHELL 120 EC-C18, 3.0 X 100 NM, 2.7 μ m
Nástřik	10 μ l
Rychlost průtoku mobilní fáze	0.700 ml/min
Složení mobilní fáze	35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného o pH 4.5
Detekce	Diode array detector při vlnových délkách 223 nm a 272 nm
Teplota kolony	25 °C
Doba analýzy	10 minut
Vnitřní standard	Diazepam

Tabulka 11 Souhrn nalezených optimálních podmínek pro HPLC analýzu

Poznámka: V následujících krocích byl nástřik zvýšen na 40 μ l.

3.2. Validace metody

V dalším kroku byla vyvinutá metoda testována k možnému použití pro stanovení obou metabolitů v potkaní plazmě. Validace metody byla proto prováděna pouze pro látky 1-OH MDZ a 4-OH MDZ, stanovení MDZ nebylo požadováno. V rámci validace byly hodnoceny následující parametry: přesnost (opakovatelnost), správnost, kvantitativní limit, linearita a selektivita. Na základě požadavku zadavatele byla kalibrace vztažena na jednotky látkového množství (nmol). Validace byla prováděna na biologických vzorcích připravených dle podkapitoly 2.3.5.

3.2.1. Stanovení přesnosti

Stanovení přesnosti bylo provedeno na šesti vzorcích, každý vzorek byl změřen na třech následujících úrovních látkového množství: 1 nmol, 4 nmol, 7 nmol. Relativní směrodatná odchylka byla vypočítána dle vzorce uvedeného v podkapitole 1.8.2.

Stanovení přesnosti pro 1-OH MZD je shrnuto v tabulce č. 12:

Množství (nmol)	Vz. 1 ³	Vz. 2	Vz. 3	Vz. 4	Vz. 5	Vz. 6	Průměr	Smodch ⁴	RSD ⁵
1	0.96	0.92	1.08	0.99	1.11	0.89	0.99	0.09	8.82
4	4.11	4.04	3.88	3.99	4.09	4.01	4.02	0.08	2.05
7	6.95	6.99	7.08	7.1	7.05	6.96	7.02	0.06	0.91

Tabulka 12 Stanovení přesnosti pro 1-OH MZD

Stanovení přesnosti pro 4-OH MZD je shrnuto v tabulce č. 13:

Množství (nmol)	Vz. 1	Vz. 2	Vz. 3	Vz. 4	Vz. 5	Vz. 6	Průměr	Smodch	RSD
1	1.09	0.9	0.95	0.89	0.92	1.13	0.98	0.1	10.57
4	4.07	4.1	3.82	4.14	4.0	4.13	4.04	0.12	2.98
7	7.07	6.9	6.93	7.15	7.1	7.11	7.04	0.1	1.46

Tabulka 13 Stanovení přesnosti pro 4-OH MZD

Relativní směrodatná odchylka nepřekročila ani v jednom případě 11 %. Dle požadavků FDA [49] je limitem směrodatné odchylky hodnota 15 %. Přesnost metody tomuto požadavku vyhovuje.

³ Vz. = vzorek

⁴ Smodch = směrodatná odchylka

⁵ RSD = relativní směrodatná odchylka

3.2.2. Stanovení správnosti

Při stanovení správnosti se při výpočtech vycházelo z údajů uvedených v tabulkách 12 a 13. Správnost byla hodnocena pomocí procentuální chyby dle vzorce uvedeného v podkapitole 1.8.1 a pomocí výtěžnosti (vzorec pro její výpočet uveden též v podkapitole 1.8.1.). Jako stanovená hodnota se dosazoval průměr. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 14:

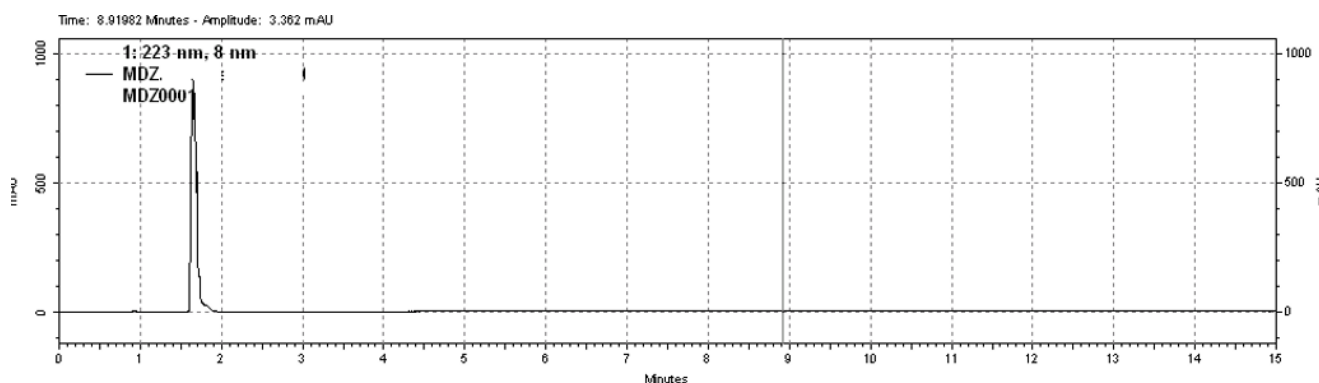
Množství [nmol]	1-OH MZD		4-OH MZD	
	Procentuální chyba [%]	Výtěžnost [%]	Procentuální chyba [%]	Výtěžnost [%]
1	-0.83	99.17	-2.0	98
4	0.5	100.5	1.08	101
7	0.31	100.31	0.62	100.62

Tabulka 14 Stanovení správnosti

Výtěžnost pro 1-OH MZD se pohybuje v rozmezí 99.17–100.31 %. Nejvyšší procentuální chyba je -0.83 %. Pro 4-OH MZD se výtěžnost pohybuje od 98–101 %. Nejvyšší procentuální chyba je -2.0 %. Požadavek (stanoven dle FDA [49]) na výtěžnost je 100 ± 15 %, čemuž získaná validační data vyhovují. Dle požadavku FDA na správnost je limit procentuální chyby ± 15 %, jelikož žádná z vypočítaných hodnot tento limit nepřekračuje, správnost metody vyhovuje.

3.2.3. Selektivita

Pro stanovení selektivity byl změřen slepý vzorek matrice (obrázek 22).

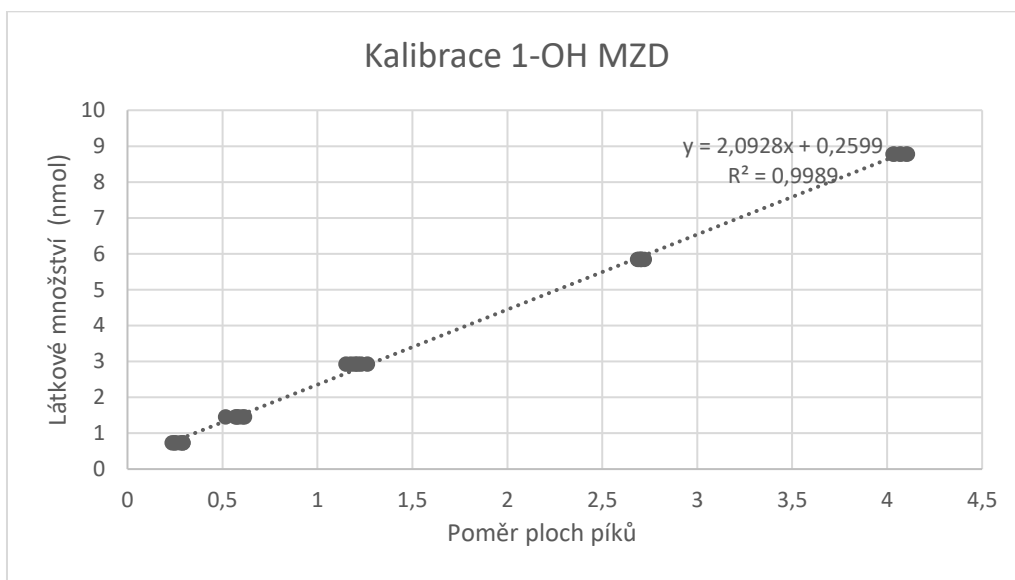


Obrázek 22 Chromatogram slepého vzorku

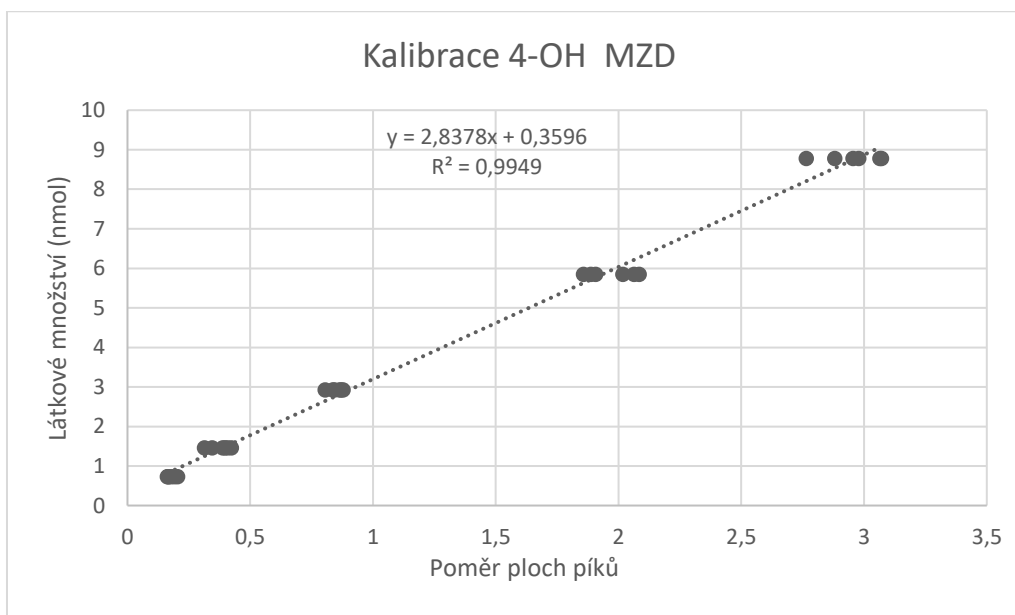
Z chromatogramu slepého vzorku je zřejmé, že v retenčních časech sledovaných analytů nejsou přítomny píky látek, které by s nimi interferovaly. HPLC metoda tedy umožňuje selektivně změřit plochy píků odpovídající analytům.

3.2.4. Linearita

Linearita byla hodnocena zvlášť pro každý analyt s využitím kalibračních roztoků s přesně stanoveným látkovým množstvím: 8,78 nmol, 5,85 nmol, 2,93 nmol, 1,46 nmol, 0,73 nmol. Kalibrace je prováděna jako závislost látkového množství na poměru ploch pík analytu a vnitřního standardu (DZP). Vyhodnocení bylo provedeno s použitím metody lineární regrese. Kalibrační křivky metabolitů midazolamu jsou znázorněny na obrázcích č. 23 a 24.



Obrázek 23 Kalibrační křivka 1-OH MZD pro stanovení linearitu



Obrázek 24 Kalibrační křivka 4-OH MZD pro stanovení linearitu

Rovnice kalibrační křivky pro 1-OH MZD je $y = 2.0928x + 0.2599$. Korelační koeficient je $R^2 = 0.9989$. Rovnice kalibrační přímky pro 4-OH MZD je $y = 2.8378x + 0.3596$. Korelační

4. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodných podmínek pro HPLC analýzu midazolamu a jeho dvou metabolitů – 1-hydroxymidazolamu a 4-hydroxymidazolamu, nalezení vhodného vnitřního standardu a v neposlední řadě validace metody pro analýzu biologických vzorků. Tyto cíle byly splněny.

Midazolam je znám a používán již delší řadu let, proto již v minulosti proběhly pokusy pro jeho stanovení. Přesto ale existuje velmi málo metod, které se zaměřují na stanovení midazolamu a současně i jeho dvou metabolitů. V těchto publikovaných rešerších se jako vhodný způsob provedení jeví HPLC s UV detekcí. Jako vhodná mobilní fáze se nabízí směs acetonitrilu a pufru s pH 4.5-4.7, přičemž acetonitril je z hlediska poměrového zastoupení v menšině. [2, 50]

Vzhledem k faktu, že midazolam je nepolární sloučenina, byla prováděna HPLC analýza na reverzních fázích. Byla použita kolona POROSHELL 120 EC-C18, 3.0 X 100 mm, 2.7 μm . Použití této kolony k danému účelu nebylo v době začátku experimentů v této diplomové práci v literatuře objeveno. V mobilní fázi byl na základě rešerše používán acetonitril v roli organické složky. V roli složky vodné byly testovány tři možnosti, z nichž se nejlépe osvědčil pufr octanu amonného o pH 4.5. Byla použita UV detekce pomocí diode array detektoru při vlnových délkách 223 nm a 272 nm. I tato detekce poskytla dostatečnou citlivost stanovení. Nástřik během vývoje metody byl 10 μl . Jako vhodný vnitřní standard byl zvolen diazepam.

Dle požadavku zadavatele byla metoda validována pro stanovení 1-hydroxymidazolamu a 4-hydroxymidazolamu v potkaní plazmě. Validace potvrdila, že metoda je schopná poskytovat dostatečně přesné a správné výsledky, což ji činí vhodnou pro zamýšlené použití. Metoda byla posléze úspěšně aplikována při analýze reálných vzorků v rámci biochemického výzkumu.

5. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

OBRÁZKY:

Obrázek 1: Základní struktura benzodiazepinů [7].....	8
Obrázek 2 Struktura midazolamu [8].....	9
Obrázek 3 Schéma metabolizace midazolamu [10].....	11
Obrázek 4 Schéma HPLC [23].....	15
Obrázek 5 Rozdíl sktruktury částicové kolony (a) a monolitické kolony (b) [31]	18
Obrázek 6 Příklad chromatogramu [40].....	21
Obrázek 7 Struktura midazolamu [45].....	25
Obrázek 8 Struktura 4-hydroxymidazolamu [46]	26
Obrázek 9 Struktura 1-hydroxymidazolamu [47]	26
Obrázek 10 Struktura diazepamu [48]	26
Obrázek 11 Chromatogram MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min	33
Obrázek 12 Chromatogram 1-OH MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min.....	34
Obrázek 13 Chromatogram 4-OH MZD při složení mobilní fáze: 30 % acetonitrilu a 70 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min.....	34
Obrázek 14 Chromatogram MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min	35
Obrázek 15 Chromatogram 1-OH MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min.....	36
Obrázek 16 Chromatogram 4-OH MZD při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min.....	36
Obrázek 17 Chromatogram DZP při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.600 ml/min	37
Obrázek 18 Chromatogram 4-OH MZD, 1-OH MZD, MZD a DZP při složení mobilní fáze 35 % acetonitrilu a 65 % roztoku octanu amonného pH 4.5, s průtokem 0.700 ml/min..	38
Obrázek 19 Kalibrační křivka pro MZD.....	40
Obrázek 20 Kalibrační křivka 1-OH MZD	40
Obrázek 21 Kalibrační křivka 4-OH MZD	41
Obrázek 22 Chromatogram slepého vzorku.....	44

Obrázek 23 Kalibrační křivka 1-OH MZD pro stanovení linearity	45
Obrázek 24 Kalibrační křivka 4-OH MZD pro stanovení linearity	45
Obrázek 25 Chromatogram reálného biologického vzorku	46

TABULKY:

Tabulka 1 Přehled použitých benzodiazepinů	25
Tabulka 2 Ostatní použité chemikálie.....	27
Tabulka 3 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 50/50 a průtoku 0.500 ml/min	30
Tabulka 4 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 30/70 a průtoku 0.500 ml/min	31
Tabulka 5 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/voda 30/70 a průtoku 0.600 ml/min	32
Tabulka 6 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 30/70 a průtoku 0.600 ml/min	33
Tabulka 7 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 a průtoku 0.600 ml/min po naředění vzorků	34
Tabulka 8 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH 4.5 35/65 a průtoku 0.600 ml/min	35
Tabulka 9 Retenční časy benzodiazepinů při poměru acetonitril/octan amonný pH=4.5 30/70 a průtoku 0.700 ml/min	38
Tabulka 10 Výsledky kalibrační řady	39
Tabulka 11 Souhrn nalezených optimálních podmínek pro HPLC analýzu.....	42
Tabulka 12 Stanovení přesnosti pro 1-OH MZD.....	43
Tabulka 13 Stanovení přesnosti pro 4-OH MZD.....	43
Tabulka 14 Stanovení správnosti	44

6. SEZNAM LITERATURY

- [1] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [2] JUŘICA, Jan, Miroslav DOSTÁLEK, Jiří KONEČNÝ, Zdeněk GLATZ, Eva HADAŠOVÁ a Josef TOMANDL. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **852**(1–2), 571–577. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.02.034
- [3] LINCOVÁ, Dagmar, Hassan FARGHALI, a ET AL. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [4] OLKKOLA, K. T. a J. AHONEN. Midazolam and Other Benzodiazepines. In: *Modern Anesthetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, s. 335–360. ISBN 978-3-540-72813-9.
- [5] ŠVIHOVEC, Jan a ET AL. *Farmakologie*. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- [6] DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2407-5.
- [7] ARORA, Nidhi, Prashant DHIMAN, Shubham KUMAR, Gurpreet SINGH a Vikramdeep MONGA. Recent advances in synthesis and medicinal chemistry of benzodiazepines. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2020, **97**, 103668 [vid. 2022-03-10]. ISSN 00452068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2020.103668
- [8] NORDT, Sean Patrick a Richard F. CLARK. Midazolam: A review of therapeutic uses and toxicity. *The Journal of Emergency Medicine*. 1997, **15**(3), 357–365. ISSN 07364679.
- [9] J.G. REVES a AT AL. Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology* [online]. 1985, **62**(3), 310–324 [vid. 2022-01-09]. Dostupné z: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med2&NEWS=N&AN=3156545>
- [10] SWART, Eleonora, Pauline SLORT a Frans PLÖTZ. Growing up with Midazolam in the Neonatal and Pediatric Intensive Care. *Current drug metabolism* [online]. 2012, **13**, 760–6. Dostupné z: doi:10.2174/138920012800840347
- [11] BARTH, Howard. Chromatography Fundamentals, Part I: Thermodynamics of Liquid Chromatography: The Distribution Coefficient. *LCGC North America*. 2018, **36**(3), LCGC North America-03-01-2018, 200–202.
- [12] ÚSTAV ANALYTICKÉ CHEMIE VŠCHT PRAHA. Chromatografie. In: [online]. B.m. 2015 [vid. 2022-02-12]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/4OPPAst.pdf>.

- [13] DENNISON, Clive. *A Guide to Protein Isolation*. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic, 1999. ISBN 9786610043316.
- [14] KATEDRA BIOCHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI. Chromatografické metody. In: [online]. Olomouc. [vid. 2022-02-12]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BAM_07.ppt
- [15] MGR. NIKOLOVA Irina. Chromatografické metody. In: [online]. Ústí nad Labem. [vid. 2022-02-12]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf
- [16] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [17] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrola léčiv I*. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1613-1.
- [18] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [19] *HPLC* [online]. [vid. 2022-02-12]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>
- [20] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. B.m.: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [21] HILLMICH, Ondřej. *Základy vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) – PUMPY A GRADIENT* [online]. 2. únor 2021 [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/1026>
- [22] JANDERA, P a J CHURÁČEK. *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice*. [online]. Burlington: Elsevier Science, 2014. ISBN 978-0-08-085834-0. Dostupné z: <http://qut.eblib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=404378>
- [23] KOUŘIL, Tomáš. *HPLC analýza léčiv*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- [24] CVAČKA, Josef. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. In: [online]. B.m. 2011 2010 [vid. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
- [25] DOLAN, John. Mobile-Phase Degassing: What, Why, and How. *LCGC North America*. 2014, **32**(7), LCGC North America-07-01-2014, 482–487.
- [26] MACHÁT, Pavel. *Studie pístového čerpadla s lineárním motorem*. Brno, 2010. Vysoké učení technické v Brně.
- [27] CVAČKA, Josef. Praxe HPLC. In: [online]. 2010. [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc4.pdf>

- [28] Liquid Chromatography Problem Solving and Troubleshooting. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 1993, **31**(12), 533–533 [vid. 2022-02-14]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/31.12.533
- [29] CABRERA, Karin. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science* [online]. 2004, **27**(10–11), 843–852. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200401827
- [30] MASARYKOVA UNIVERZITA. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. In: [online]. Brno. 2013 [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf
- [31] VOJTA, Jiří, Adéla MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, Martin FRANC, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy*. 2014, (108), 127–134.
- [32] VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. Detektory v HPLC. In: [online]. Praha. [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/8%20HPLC%202019%20detektory.pdf>
- [33] Typy detektorů v HPLC. *HPLC* [online]. [vid. 2022-02-14]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/detectors.html>
- [34] DONG, Michael a JEDRZEJ WYSOCKI. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America* [online]. 2019, **37**(10), LCGC North America-10-01-2019, 750–759 [vid. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/ultraviolet-detectors-perspectives-principles-and-practices>
- [35] DOLAN, John. How Does It Work? Part IV: Ultraviolet Detectors. *LCGC North America* [online]. 2016, **34**(8), LCGC North America-08-01-2016, 534–539 [vid. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-iv-ultraviolet-detectors>
- [36] DOLAN, John. How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors. *LCGC North America* [online]. 2016, **34**(9), LCGC North America-09-01-2016, 710–719 [vid. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-v-fluorescence-detectors>
- [37] FLANAGAN, Robert J., David PERRETT a Robin WHELPTON. *Electrochemical detection in HPLC: analysis of drugs and poisons*. Cambridge: RSC, 2005. RSC chromatography monographs. ISBN 978-0-85404-532-7.
- [38] BARTOŠOVÁ, Zdenka. *Možnosti využití elektrochemických detekčních systémů v separačních technikách*. Olomouc, 2015. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [39] PITT, James J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews* [online]. 2009, **30**(1), 19–34. ISSN 0159-8090. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19224008>

- [40] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Český lékopis 2017 1. Díl*. 2017. vyd. B.m.: Grada, nedatováno. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [41] SNOW, Nicholas. What Chromatograms Can Teach Us About Our Analytes. *LCGC North America* [online]. 2021, **39**(1), January 2021, 22–25 [vid. 2022-03-09]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/what-chromatograms-can-teach-us-about-our-analytes>
- [42] NOVÁKOVÁ, Lucie. Separační metody v analytické chemii II. In: . Hradec Králové. 2021.
- [43] PAPADOYANNIS, Ioannis N. a Victoria F. SAMANIDOU. Validation of HPLC Instrumentation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2004, **27**(5), 753–783 [vid. 2022-03-07]. ISSN 1082-6076, 1520-572X. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-120029697
- [44] KASTNER, Petr. Validace analytických metod. In: . Hradec Králové. 15. prosinec 2021.
- [45] PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 4192, MIDAZOLAM. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2022. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Midazolam>
- [46] PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 124449, 4-HYDROXYMIDAZOLAM. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2022. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxymidazolam>
- [47] PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 107917, 1-HYDROXYMIDAZOLAM. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2022. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Hydroxymidazolam>
- [48] PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 3016, DIAZEPAM. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2022. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diazepam>
- [49] U.S. FOOD AND DRUG a ADMINISTRATION. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* [online]. květen 2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- [50] ELBARBRY, Fawzy, Ahmed ATTIA a Ahmed SHOKER. Validation of a new HPLC method for determination of midazolam and its metabolites: Application to determine its pharmacokinetics in human and measure hepatic CYP3A activity in rabbits. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **50**(5), 987–993 [vid. 2022-04-17]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.07.004