

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2010

Petra Blažková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

HPLC analýza léčiv III.
HPLC analýza fenobarbitalu v plazmě

(diplomová práce)

Hradec Králové 2010

Petra Blažková

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001
„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským
dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování
čerpala, řádně cituji.“

21.4.2010

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, Csc. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost po celou dobu vykonávání mé diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, kteří byli vždy ochotni poskytnout důležité informace, poradit a pomoci. A v neposlední řadě také děkuji své rodině za velkou podporu, ať už finanční, či morální.

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 TERAPEUTICKÉ MONITOROVÁNÍ LÉČIV	9
2.1.1 Vývoj terapeutického monitorování léčiv	9
2.1.2 Význam terapeutického monitorování léčiv	10
2.1.3 Hlavní metody terapeutického monitorování léčiv	12
2.2 DĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	13
2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE – HPLC.....	14
2.3.1 Princip chromatografie	15
2.3.2 Termodynamika a kinetika separace.....	16
2.3.3 Instrumentace v HPLC	20
2.4 MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ – SPME	26
2.4.1 Princip SPME	26
2.4.2 Instrumentace SPME	28
2.4.3 Optimalizace SPME	30
2.5 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÉHO LÉČIVA	32
2.6 HPLC ANALÝZA FENOBARBITALU – INFORMACE Z LITERATURY	33
3. CÍL	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 MATERIÁL	39
4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	41
4.3. PRACOVNÍ POSTUP	42
4.3.1. Podmínky pro detekci fenobarbitalu metodou HPLC.....	42
4.3.2 Izolace léčiva z vody pomocí metody SPME.....	42
4.3.3 Izolace léčiva z králičí plazmy pomocí metody SPME.....	43
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	44
5.1 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	45
5.2 IZOLACE FENOBARBITALU Z VODY METODOU SPME	49
5.3 IZOLACE FENOBARBITALU Z KRÁLIČÍ PLAZMY METODOU SPME	56
5.4 KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ	63
6. ZÁVĚR.....	69
7. LITERATURA	71

1. ÚVOD

Terapeutické monitorování léčiv je v současné době neodmyslitelnou součástí výzkumné činnosti v klinických laboratořích. Kapalinová a plynová chromatografie jsou moderní analytické metody a spolu s imunochemickými metodami umožňují terapeutické monitorování léčiv, tedy stanovení léčiv a jejich metabolitů. Součástí moderního terapeutického monitorování jsou v neposlední řadě také toxikologické postupy významné pro situace vzniklé v důsledku předávkování.

Intenzivní rozvoj poznatků a s nimi i přístrojů zapříčinil, že metody vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GS) dnes představují důležité způsoby zajištění detekce látek. V současnosti je více než 80 % léčiv stanovováno metodou HPLC.

Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) patří k moderním technikám úpravy vzorku. Jedná se o metodu rychlou, ekonomickou a univerzální, jež k extrakci využívá křemenné vlákno, potažené stacionární fází. Analyty jsou desorbovány přímo do plynového nebo kapalinového chromatografu.

Využití kombinace metod HPLC a SPME představuje moderní způsob terapeutického monitorování lékových hladin a spojení výhod charakteristických pro jednotlivé metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 TERAPEUTICKÉ MONITOROVÁNÍ LÉČIV¹⁾

Terapeutické monitorování léčiv jako vědecká disciplína zasahuje do řady lékařských oborů, mimo jiné klinické farmakologie, toxikologie a vnitřního lékařství. Zdokonalování moderních analytických metod vedlo k lepšímu postupu dávkování léčiv pomocí sledování korelací mezi plazmatickými, sérovými a tkáňovými koncentracemi a klinickým efektem. Větší požadavky na terapeutické monitorování léčiv vedly k rozvoji tohoto vědního oboru.

2.1.1 Vývoj terapeutického monitorování léčiv¹⁾

Již z roku 1927 pocházejí zprávy o monitorování sérových koncentrací bromidu. Přelom padesátých a šedesátých let pak poskytuje první studie plazmatických koncentrací léčiv v souvislosti s terapeutickým účinkem. Významný pokrok přinesl začátek šedesátých let, kdy byla použita metoda plynové chromatografie pro kvantitativní stanovení léčiv v biologickém materiálu. Tato metoda je dodnes nedílnou součástí laboratoří a její zdokonalování v průběhu let vedlo k zajištění rutinního stanovení řady léčiv z biologického materiálu. Vyžaduje však vysokou kvalifikaci a zručnost obsluhy.

Díky objevení imunoanalýzy bylo umožněno stanovení koncentrace u většího počtu léčiv a byla zajištěna jednoduchost a rychlost metody bez vysokých nároků na přístrojové vybavení či kvalifikaci personálu. Imunotechniky ale s sebou nesou některé nedostatky, jako je nemožnost stanovit odděleně léčivo od metabolitů a v neposlední řadě také větší ekonomické náklady.

Téměř největšího úspěchu dosáhlo poznání metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Již na začátku čtyřicátých let se rozvinula kolonová chromatografie ve své klasické podobě a díky zdokonalování přístrojové techniky v průběhu dalších let se dnes řadí na první místo mezi užívanými chromatografickými postupy. Díky této metodě je možno stanovit léky a jejich metabolity již z velmi malého množství séra či plazmy. Jako jediná umožňuje simultánní kvantitativní stanovení řady léčiv a aktivních metabolitů a tím vytvoření korelací mezi koncentrací léčiva a jeho metabolitů v biologických tekutinách a jejich farmakodynamickým účinkem.

2.1.2 Význam terapeutického monitorování léčiv¹⁾

Terapeutické monitorování léčiv nachází uplatnění především u léčiv s úzkým terapeutickým indexem, kde hrozí nežádoucí účinky z předávkování, nebo naopak selhání terapie kvůli poddávkování. Ve výsledcích klinicko-farmakologických studií bylo prokázáno, že sérová koncentrace léčiva je velmi významná ve vztahu k terapeutickému účinku. Byl sestaven souhrn klinických situací, při nichž je vhodné provést terapeutické monitorování léčiv (*Mirkin 1976, Melmon a spol. 1978, Gilman a spol. 1978, O'Malley a spol. 1980*). Tento přehled je uveden v několika následujících odstavcích:

Rozpoznání nesouhlasu mezi nasazenou terapií a klinickým účinkem

Stanovením sérových či plazmatických koncentrací podávaných léčiv je možno odhalit příčinu zhoršení klinického stavu u nemocí, pro něž typické intermitentní projevy příznaků choroby (např. hypertenze, astma, epilepsie a jiné). Propuknutí symptomů často bývá zapříčiněno vynecháváním předepsaných dávek pacientem v případě, že se nachází v období bez potíží.

Analýza individuální utilizace léčiva

V každé populaci se nachází samostatná individua s individuálním metabolismem a tedy s individuálním zužitkováním podaných léků. Existují takzvaní „pomalí metabolizátoři“, pro něž je možné předávkování a s ním projevy nežádoucích účinků, a naopak pacienti s rychlým metabolismem, kteří vyžadují vyšší dávky léčiva k zajištění stejného terapeutického efektu. Díky terapeutickému monitorování jsme schopni nastavit optimální režim dávkování.

Kompenzace utilizace léčiva při různých patologických stavech

Řada vyskytujících se chorob má vliv na hladinu léčiva v séru a s tím také související dostupnost účinné látky. Velký vliv mají onemocnění, která postihují vylučující a metabolizující orgány, jako jsou játra a ledviny. S takovým postižením dochází ke změně sérových koncentrací léčiva a může nastávat selhávání terapie nebo naopak zvýšení projevů nežádoucích účinků. Řešení těchto klinických situací je možné díky analytickým metodám, schopným

určení sérové koncentrace léčiva a jeho metabolitu a také rozlišení sérové koncentrace volné formy a formy vázané na transportní proteiny.

Optimalizace dávkování během určitých stádií života organismu

V průběhu vývoje jedince dochází k řadě změn nejen fyziologických, ale i ke změnám absorpce a utilizace léčiva. Jedná se o období těhotenství žen, postnatální vývoj člověka, pubertu, dále postpubertální období a v neposlední řadě změny u geriatrických pacientů. Tyto situace, pokud je při nich nutnost určité léčby, jsou však díky terapeutickému monitorování léčiv dobře zvládnuty.

Volba vhodných sérových hladin pro optimalizaci dlouhodobé terapie

Vzhledem k existenci variability klinické odpovědi po podání definované dávky populaci je terapeutická odpověď dána zohledněním individuálních faktorů. Tyto faktory je možné postihnout stanovením sérových koncentrací léčiv. Tak lze optimalizovat dlouhodobý terapeutický režim.

Terapeutické monitorování léčiv sehrává svou roli v oboru klinické farmakologie ve sledování farmakodynamických a farmakokinetických studiích.

V oblasti farmakodynamiky je známo, že intenzita a délka trvání lékového účinku jsou závislé na množství léčiva nacházejícího se v místě receptoru. Jednotlivé organismy se liší ve stupni biologické odpovědi, která je dána např. pohlavím, věkem, nemocí. Kompenzace těchto rozdílů je možná terapeutickým monitorováním. Na základě znalostí rovnovážných stavů mezi celkovou plazmatickou koncentrací léčiva, koncentrací v extracelulární tekutině a koncentrací v místě receptorů a také díky vědění o rovnováze mezi volnou formou léčiva a koncentrací léčiva v extracelulární tekutině je monitorování plazmatických či sérových koncentrací léčiv objektivním zdrojem informací o předpokládaných koncentracích léčiv v oblasti specifických receptorů.

Farmakokinetika se orientuje na zkoumání koncentrací léčiv v tkáních a biologických tekutinách, které jsou důsledkem dějů, jako je absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. Užití terapeutického monitorování léčiv představuje významný přístup k zajištění korelace stanovených koncentrací s podanou dávkou. Pro správné dávkování byly vytvořeny matematické modely, díky nimž je umožněno lépe pochopit a také předvídat osud léčiva v organismu.

2.1.3 Hlavní metody terapeutického monitorování léčiv¹⁾

Vzhledem k hodnotám, v jakých se většinou pohybují terapeutické koncentrace léčiv, je vyhledávána metoda, která má dostatečně nízký detekční limit. Užívají se fyzikálněchemické, imunochemické a mikrobiologické metody.

Fyzikálněchemické metody

Do skupiny klasických fyzikálněchemických metod patří extrakční, precipitační a chromatografické postupy ve spojení se spektrofotometrickou, spektrofluorimetrickou či elektrochemickou detekcí.

Z klasických chromatografických metod je užití tenkovrstvé chromatografie omezeno detekční citlivostí, a také proto se v dnešní době dává přednost vysokoúčinné kapalinové chromatografii, jejíž detekční limit je řádově 10 ng/ml až 1 ng/ml.

Plynová chromatografie bývá využívána pro analýzu těkavých látek, které lze převést na páry, aniž dochází k jejich rozkladu. Termolabilní látky je nutné podrobit reakci s derivatizačními činidly za vzniku těkavých derivátů.²⁾

V současnosti tedy metoda, která je nejčastěji používaná také ve světových analytických laboratořích a která vyhovuje řadě kritérií, je jednoznačně vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Imunochemické metody

Využití imunochemických metod je zaměřeno převážně na rychlou diagnostiku toxických stavů. Přístrojové vybavení nevyžaduje většinou náročné provedení a výhodou je také detekční limit, který je u některých látek dokonce nižší než 1 ng/ml krve. Co je ovšem omezením pro jejich použití, je jejich častá neschopnost odlišit vlastní léčiva od jejich metabolitů.

Mikrobiologické metody

Tyto metody se využívají převážně pro stanovení antibiotik a cytostatik. Nedokážou detekovat koncentrace nižší než 1 µg/ml a nejsou schopny odlišit léčivo od metabolitu. Mikrobiologické metody nejsou vhodné pro terapeutické monitorování léčiv, ale uplatnění nacházejí v mikrobiologických laboratořích a laboratořích tkáňových kultur.

2.2 DĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD²⁾

Chromatografické metody umožňují jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, což je jedna z hlavních předností, kvůli které jsou dnes široce používány. Princip jejich fungování je založen na dělení látek mezi dvěma fázemi. Mezi fází stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) dochází k vytváření rovnovážného stavu dělených částí. Díky vzájemným interakcím mezi dělenými látkami a stacionární a mobilní fází dochází k separaci.

Dělení chromatografických metod je možné podle různých kritérií:

1. Podle charakteru mobilní fáze

- plynová chromatografie – mobilní fáze: inertní plyn
- kapalinová chromatografie – mobilní fáze: kapalina
 - a) plošné uspořádání – tenkovrstvá chromatografie (TLC)
 - b) kolonové uspořádání – vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

2. Podle separačního procesu

- Adsorpční chromatografie – separace díky různé adsorbovatelnosti látek na povrch adsorbentu (nejčastěji silikagel, oxid hlinitý)
- Rozdělovací chromatografie
 - a) kapalinová: separace díky rozdílné rozpustnosti látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách
 - b) plynová: separace díky rozdílné rozpustnosti látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi
- Iontově výměnná chromatografie – látky, které jsou schopny ionizace, jsou separovány na základě různé afinity k iontovýměnným skupinám iontoměniče (katexu nebo anexu)
- Gelová chromatografie – separace na principu průniku různě velkých molekul látek do porézního materiálu (gelu)
- Afinitní chromatografie – oddělování jednoho nebo celé skupiny příbuzných proteinů díky vytvoření silné vazby na použitý ligand

2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE – HPLC^{3, 4)}

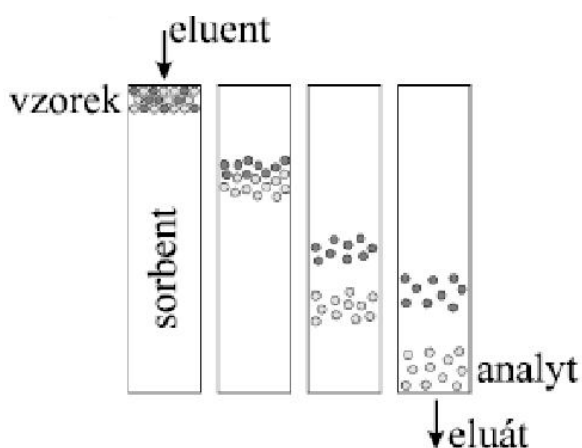
V roce 1903 provedl ruský fyziolog, botanik a biochemik M. S. Cvět experiment, v němž rozdělil chlorofyl na jeho složky - chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Pokus spočíval v principu protékání petroletherového extraktu chlorofylu v kolonce přes sloupec křemeliny. Při průchodu kolonkou se tento extrakt rozdělil na jednotlivá barviva obsažená v chlorofylu a na kolonce byly okem viditelné jednotlivé barevné zóny. Z řečtiny je známo, že „chroma“ znamená barva, česky lze tedy vysvětlit slovo „chromatografie“ jako „barvopis“. Obdobně D. T. Day rozdělil některé složky ropy. Plynová chromatografie, jejíž rozvoj byl velmi bouřlivý oproti chromatografii kapalné, byla překonána teprve počátkem čtyřicátých let, po objevení rozdělovací chromatografie. Vzápětí se kolonová kapalinová chromatografie začala rozvíjet ve své klasické podobě. V roce 1952 byla dokonce udělena Nobelova cena za práci v oboru chromatografie autorům Martin a Syne.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tedy High Performance Liquid Chromatography (HPLC), se dá charakterizovat jako „metoda první volby“. Je jednou z nejprogresivnějších analytických metodik, protože spojuje řadu předností:

- a) umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek
- b) analýza je rychlá, stanovení citlivé
- c) není potřeba velkého množství vzorku
- d) možnost automatizace
- e) větší rozsah použití, není omezena pro určitý typ látek jako např. plynová chromatografie, která je použitelná pouze pro látky těkavé

2.3.1 Princip chromatografie^{5, 6)}

Na chromatografickou kolonu se provádí nástřik skupiny látek, které se projeví v záznamu jako eluční pás nastříknuté směsi. Směs látek je unášena kolonou, na jejíž náplni dochází k separaci na jednotlivé složky. Analyty podléhají různé distribuci (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází a jsou tedy rozdílně zadržovány a zpoždovány (obr. 1). Z kolony vystupují látky již jednotlivě a jsou také jednotlivě detekovány detektorem jako eluční pík. V závislosti na interakcích látky se stacionární fází se mění eluční čas resp. eluční objem.



Obrázek 1: Schéma zadržování analytu na koloně⁶⁾

Izokratická eluce

Izokratickou elucí se označuje dělení látek mobilní fází, která má konstantní složení.

Gradientová eluce

Pro gradientovou eluci je charakteristická rostoucí eluční síla mobilní fáze v jejím průběhu. Je využívána v případech, kde se dělí komplikovanější směsi látek.

Změna složení mobilní fáze může být:

- *diskontinuální* – vícestupňová eluce
- *kontinuální* – mobilní fáze se s časem mění lineárně nebo nelineárně

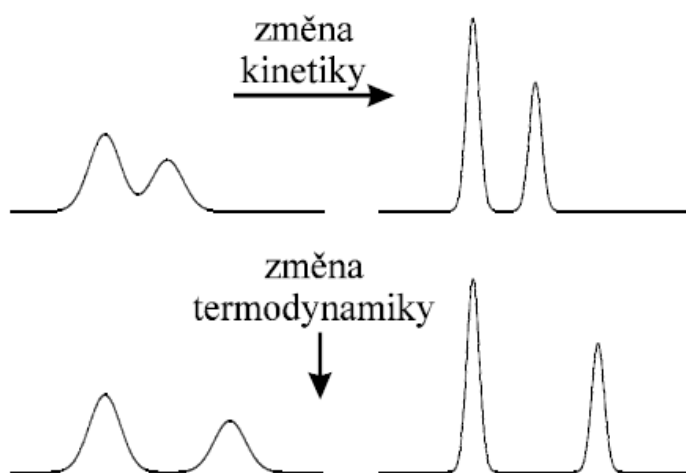
2.3.2 Termodynamika a kinetika separace^{1, 5, 6)}

Důležité pro izolaci látek jsou termodynamika a kinetika separace, které spolu souvisí a obě určují, jak moc se píky v chromatogramu překrývají, resp. jak jsou zóny sousedních analytů odděleny.

Tabulka 1: Jevy, jejichž ovlivňováním se zabývá termodynamika a kinetika⁶⁾

Termodynamika separace	Kinetika separace
<ul style="list-style-type: none">• velikost interakce mezi sorbentem a analytem• zadržování a zpoždování analytů• rychlost migrace analytů kolonou• rozdíl v retenčních časech analytů• dělení analytů od sebe navzájem	<ul style="list-style-type: none">• rozšiřování zón analytů během postupu kolonou• šířky píků v chromatogramu

Termodynamika i kinetika separace ovlivňují rozlišení sousedních píků v chromatogramu (obr. 2).



Obrázek 2: Vliv změny v termodynamice a kinetice na chromatografický záznam⁶⁾

Termodynamika separace

Charakteristickou veličinou pro analyzovanou látku je *retenční čas* t_R , tedy doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky a *retenční objem* V_R , což je objem mobilní fáze, který protekl za tuto dobu. Mezi těmito veličinami existuje následující vztah:

$$V_R = t_R F_m$$

kde F_m je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času.

Eluční objem, neboli *zdánlivý eluční objem* V_R , je součtem dvou objemových veličin:

$$V_R = V_{R'} + V_M,$$

kde $V_{R'}$ je *redukovaný (skutečný) eluční objem*. V_M představuje *mrtvý objem*, tedy celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od nástřiku po detektor.

Kapacitní poměr K jako bezrozměrná veličina udává hodnotu retence separované složky a pro tuto hodnotu platí následující vztahy:

$$K = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

$$K = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

K_D je distribuční konstanta, V_S je objem stacionární fáze a V_M objem mobilní fáze v koloně, tj. mrtvý objem kolony. Díky kapacitnímu poměru lze odhadovat, do jaké míry lze eluovat látky z kolony v přijatelném čase a koncentračním profilu. Čím je hodnota K menší, tím jsou menší i eluční objemy a trvání analýzy. V intervalu od 20 do 1000 jsou eluční objemy příliš velké a píky jsou širší.

Důležitou veličinou z kvantitativního hlediska je *rozlišení* R , které se vyjadřuje jako poměr rozdílu elučních objemů separovaných látek 1 a 2 a průměrné šířky píků Y_V :

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

Tento vztah slouží k vyjadřování účinnosti dělení. Rozlišení souvisí s kapacitním poměrem, distribuční konstantou a účinností.

Separáčnı́ schopnost kolony je znázorněována parametrem účinnosti kolony, který je vyjádřen *počtem teoretických pater* n a tato veličina vychází z retenčního času t_R a ze šířky píku Y_V při jeho bázi:

$$n = 1 \left(\frac{t_R}{Y_V} \right)^2$$

Účinnost kolon lze také srovnat, a to parametrem *výškového ekvivalentu teoretického patra* H , který je vypočítán z délky kolony v metrech L a z počtu teoretických pater n vztahem:

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

Již výše zmíněnou veličinou F_m ($\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$) tedy *objemovou rychlostí toku* se dá vyjádřit rychlost pohybu mobilní fáze kolonou, lze to ale také docílit vyjádřením pomocí *lineární rychlosti toku* u (cm s^{-1}), tato charakteristika je nezávislá na průřezu kolony a lze ji vypočítat z mrtvého času kolony t_M , tedy času nízkomolekulárního inertu a z délky kolony L :

$$u = \frac{L}{t_M}$$

Lineární rychlost toku souvisí s objemovou rychlostí vztahem:

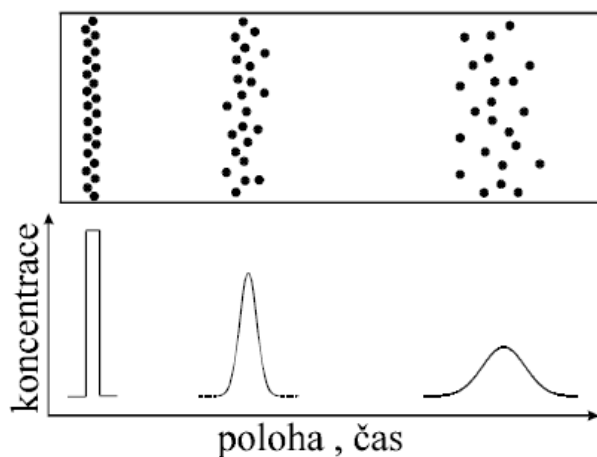
$$u = \frac{F_m}{q}$$

přičemž q je volný průřez kolony, tj. pouze ta část průřezu kolony, která je volná pro tok mobilní fáze.

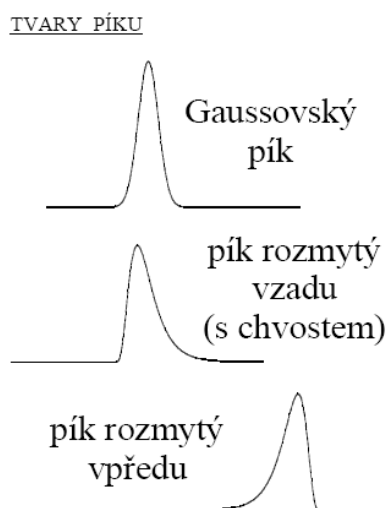
Kinetika separace

Kinetika separace se zabývá jevy, které ovlivňují rozšiřování zón dělených látek (analytů) během postupu kolonou a šířky píků v chromatogramu.

Zóny analytů se během postupu kolonou rozšiřují (obr. 3) a v chromatogramu jsou znázorněny jako píky neboli eluční křivky, které charakterizují koncentrační profil analytu v zóně.



Obrázek 3: Rozšiřování zón analytů během postupu kolonou a píkové vyobrazení těchto zón⁶⁾



Obrázek 4: Vzory tvarů píků⁶⁾

Faktor symetrie píku A_s (nebo faktor chvostování píku) lze vyjádřit pomocí následujícího vztahu:

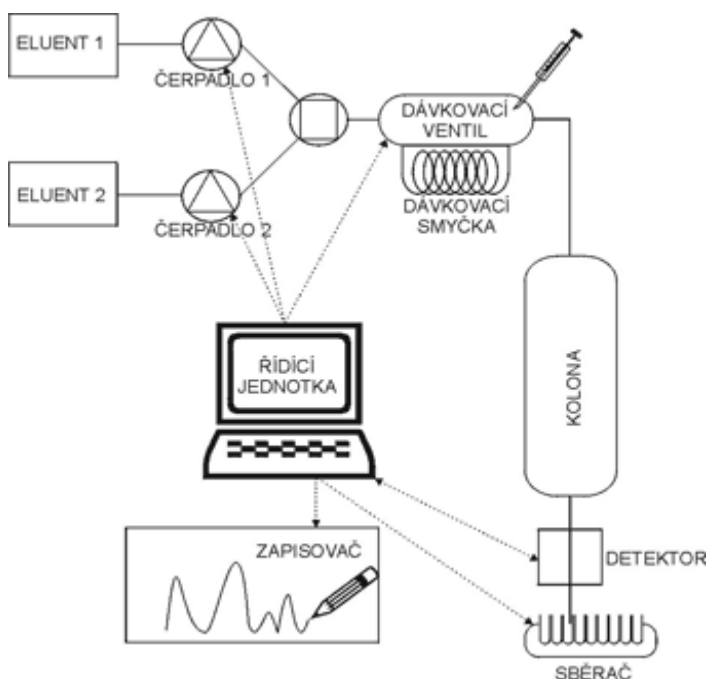
$$A_s \equiv \frac{W_{0,05}}{2_d^5},$$

kde $w_{0,05}$ vyjadřuje šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky, d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Hodnota 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.⁷⁾

2.3.3 Instrumentace v HPLC^{1, 5, 8)}

Kapalinový chromatogram se skládá z částí pro zabezpečení transportu mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Důležité je jednotlivé řazení elementů za sebou.

Mobilní fáze je přiváděna ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla. Zásobníky mobilní fáze jsou samostatně uzavřené v prostoru chráněném před světlem a otevřeným ohněm. V případě gradientové eluce se přiváděné proudy ze zásobníků mísí před nebo za vysokotlakým čerpadlem ve směšovači. Podle typu čerpadla (pulsní nebo bezpulsní) je zařazen tlumič tlakových nárazů, odkud je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování do chromatografické kolony. Kolona je napojena na detektor, z něhož může vést výstup do sběrače frakcí. Z detektoru míří signál do počítačové jednotky, kde je vyhodnocen.



Obrázek 5: Schéma kapalinového chromatografu⁸⁾

Čerpadla

Čerpadla slouží k dopravování mobilní fáze konstantním průtokem, s minimem tlakových pulsů, ale také k zajištění mísení mobilní fáze pro gradientovou eluci. Dokonalým odplyněním mobilní fáze je možné zajistit minimální kolísání tlaku. Odplynění je možno dvěma způsoby, a to buď héliem,

nebo ultrazvukem. Nejnověji je součástí HPLC degasér (odplyňovač). Jednoduchá programovatelnost mikroprocesoru čerpadla je výhodná pro zajištění tlakové reprodukovatelnosti chromatografických cyklů. Čerpadla mohou být poškozována mechanickými nečistotami, tudíž je vhodné chemikálie a rozpouštědla před použitím přefiltrovat a odstranit tak částice větší než 5 μ m.

Dávkovací techniky

Moderní průtokové injektory zajišťují minimální rozdíly v objemech dávkovaných vzorků na kolonu. Hlavní výhodou těchto injektorů je možnost automatizace. Dávkovací ventily jsou konstruovány tak, aby měly minimální mrtvý objem a vydržely tlaky do 50 MPa a teplotu do 200 °C.

Existují zařízení, která umožňují dávkovat vzorek bez přerušení toku mobilní fáze pomocí nízkotlaké stříkačky, pomocí nichž lze pohodlně a se zachováním účinnosti dávkovat objemy 1 až 200 μ l vzorku. Automatické dávkovače (autosamplery)⁹⁾ jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Buď je vzorek dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů, nebo pomocí několika třicestných ventilů. K zamezení kontaminace vzorků se používá oplach jehly a to jak vnitřní, tak i vnější oplach. Prostor pro vzorky je většinou temperován (0-50 °C) a chráněn před světlem. Tento systém je v dnešní době nejpoužívanější.

Kolony a jejich plnění

Rozhodující význam v chromatografii má výběr kolony. Účinnost se odvíjí nejen od kvality sorbentu a délky kolony, ale také od faktorů, jako je tvar kolony, vnitřní povrch, její materiál a další.

- *Materiál pro výrobu kolon*

Nejvíce osvědčené materiály jsou nerezová ocel, sklo a borosilikátové sklo. Výhodné jsou kolony z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla. Tyto typy kolon jsou spojením dobrých vlastností a mechanické odolnosti kovových kolon s chemickou odolností kolon ze skla.

- *Rozměry kolon*

Na délku kolony má vliv její plnivo a počet teoretických pater nutných k separaci směsi látek. Kolona je o to kratší, čím je menší zrnění sorbentu. Délka 10 až 30 cm odpovídá velikosti částic do 10 μm . Od materiálu se také odvíjí vnitřní průměr a tloušťka stěny. U skleněných kolon má být tloušťka stěny 3 až 6 mm. Umístění skleněné kolony do ocelového pláště je vhodné pro tlaky 30 MPa a vyšší. Kvalitu kolony ovlivní i vnitřní povrch. Měl by být před použitím vyleštěn a zbaven nečistot, aby se zamezilo vlivu na analyzované látky.

- *Plnění kolon*

Nejužívanější náplní je reverzní fáze. Zaručuje snadnou použitelnost, snášitelnost a reprodukovatelnost.

Sorbenty v kolonách mohou být buď nepolymerizované, nebo polymerizované. Jsou tvořeny nejčastěji SiO_2 nebo Al_2O_3 , nověji také ZrO_2 . Tyto typy sorbentů užívají částice o průměru 5 μm a méně, což přináší zvýšení separační účinnosti a zkrácení kolony až na 10 cm. Sorbenty polymerizovaných náplní tvoří prostorové sítě styren-divinyl-benzenu.

Kolony s *reverzní fází* jsou tvořeny sorbentem SiO_2 o velikosti částic 5-10 μm a chemicky vázaným C_8 nebo C_{18} alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Analyzovaný vzorek s alkylovým řetězcem interaguje na principu tvorby vodíkových můstků, nebo Van der Waalsových sil.

Při použití *normální fáze*, složené ze silikagelu, je nutná dlouhá stabilizace mobilní fáze. Uplatnění má při dělení molekul s blízkou strukturou. Interakce spočívá v tvorbě silikátových skupin s analyzovaným vzorkem.

Na iontoměničích se využívá buď katexů, nebo anexů a separace je založena na rozdílných disociačních konstantách analyzovaných látek. Při použití pufrů ale dochází často k tvorbě krystalů a hrozí tak poškození čerpadla. Iontoměniče při terapeutickém monitorování léčiv mají omezenou aplikaci.

Gelové náplně kolony umožňují rozdělování látek podle velikosti molekul. Velké molekuly neproniknou do pórů o definované velikosti. Vytékají tedy dříve, než malé molekuly, které prochází celým objemem kolony.

Před první analýzou je nutné promýt kolonu mobilní fází, přefiltrovanou membránovými filtry v celkovém objemu 25 až 30 ml a průtoku 0,5 až 1 ml. Hodnoty pH by neměly překročit hodnoty 3 a 8 a teplotu 65 $^{\circ}\text{C}$.

V současnosti se používají monolitické kolony, které jsou tvořeny jediným kusem pórovitého materiálu zcela zaplňujícím vnitřek separační kolony.

Detektory

Detektory slouží k monitorování eluátu pomocí vhodného snímače a k převádění kvantitativní hodnoty detekované látky na elektrický signál, který je registrován zapisovačem nebo vyhodnocen počítačovým systémem.

Na dobrý detektor se kladou následující požadavky:

- linearita odezvy v širokém rozmezí koncentrací
- dostatečný poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malý příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci

Používané detektory v HPLC a příslušné měřené veličiny zobrazuje tabulka 2.

Tabulka 2: Používané detektory

Typ detektoru	Měřená veličina
spektrofotometrický	absorpce záření
refraktometrický	index lomu
fluorimetrický	fluorescence látek
elektrochemický	elektrochemická reakce
hmotnostní	hmotnost a náboj iontu

- *Spektrofotometrické detektory* pracují v oblasti ultrafialového (UV) záření, nebo v případě barevných látek ve viditelné (VIS) oblasti. Ve VIS ani v UV oblasti světla neabsorbují řada rozpouštědel používaných jako mobilní fáze, což je výhoda.

Ultrafialové detektory jsou vysoce citlivé a lze je využít až v 80 % aplikací. Pro mobilní fázi umožňují výběr celé řady rozpouštědel. Jsou selektivní a hodí se také pro gradientovou eluci. Nejrozšířenějším detektorem je detektor pracující s vlnovou délkou 253,7 nm, popř. 280 nm. Jsou k dispozici také detektory snímající celé UV spektrum za pár sekund a i takové, které detekují látku současně při různých vlnových délkách. Díky těmto detektorům lze dokázat množství látky od 10^{-8} až 10^{-12} g. Uplatňují se detektory diodového pole DAD (diode array detector).

- *Fluorimetrické detektory*, taktéž vysoce selektivní, umožňují stanovovat velmi malé koncentrace látek, látek schopných fluorescence. Látkou procházející průtokovou celou detektoru absorbuje UV záření ze zdroje a přitom vydává fluorescenční záření o větší vlnové délce, než jakou má excitační záření. Čidlo (násobič) zachycuje fluorescenční záření vznikající v celé detektoru a toto čidlo je filtry ochráněno před dopadem excitačního záření.

- *Refraktometrické detektory* měří index lomu jak analyzované látky, tak i mobilní fáze. Nelze je použít při gradientové eluci, avšak výhodou je univerzálnost. Nedostatkem je závislost měřeného indexu lomu na teplotě a také citlivost, která je až o tři řády nižší než citlivost UV detektoru.

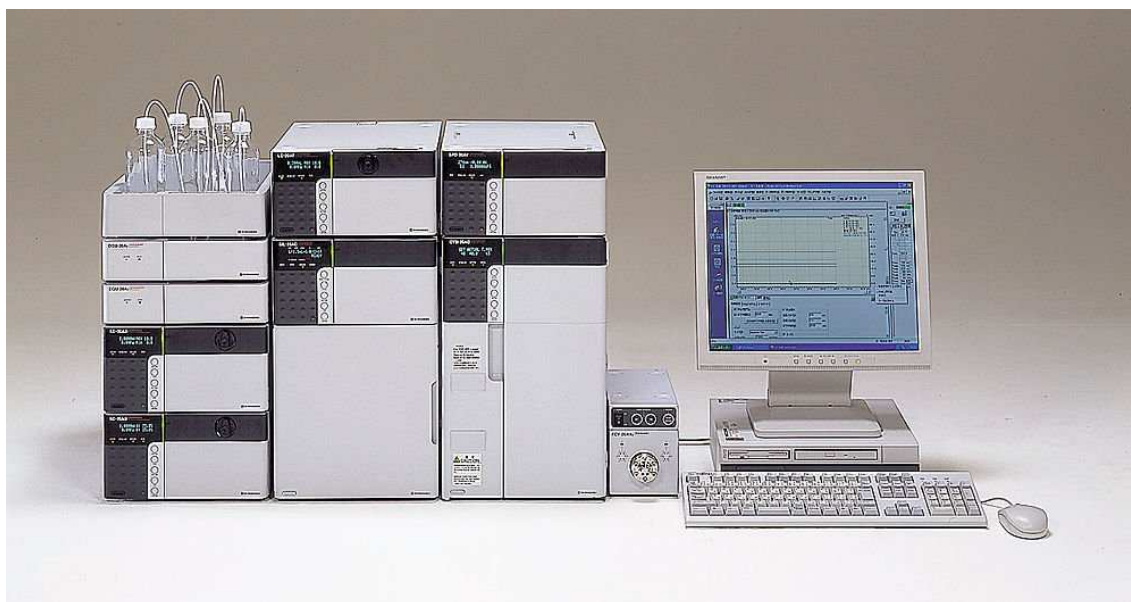
- *Elektrochemické detektory*²⁾ mohou být využívány ke kvalitativní a kvantitativní detekci látek ve velmi nízkých koncentracích 10^{-9} až 10^{-12} g/ml. Podstatou elektrochemických detektorů jsou vztahy mezi elektrickými veličinami a koncentrací sledované látky. Uplatnění nachází u léčiv, kde lze využít dějů, souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda-eluent. Schopnost léčiv podléhat oxidaci nebo redukci využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor.

- *Hmotnostní detektory*²⁾ s citlivostí 1 ng až 10 pg pracují na principu ionizace neutrálního atomu či molekuly za vzniku iontů a jejich fragmentů. Ty jsou separovány a detekovány na základě poměru hmotnosti a náboje iontu.

Zařízení k záznamu a zpracování dat

K vyhodnocování chromatogramů slouží zařízení, která automaticky vyhodnocují a zaznamenávají eluční data a zároveň poskytují kvantitativní údaje, jež lze kontrolovat průběžně na obrazovce a jež jsou posléze zapsány na chromatogram jako přehledná tabulka. Pokrokem jsou mikroprocesory ovládající celý chod přístroje a umožňující uvádění výsledků předem zvoleným nastavením. Uvádí také přesné podmínky separace.

Obrázek 6 je ukázkou dnešní podoby využití přístrojové techniky pro metodu HPLC.



Obrázek 6: Moderní provedení instrumentace HPLC¹⁰⁾

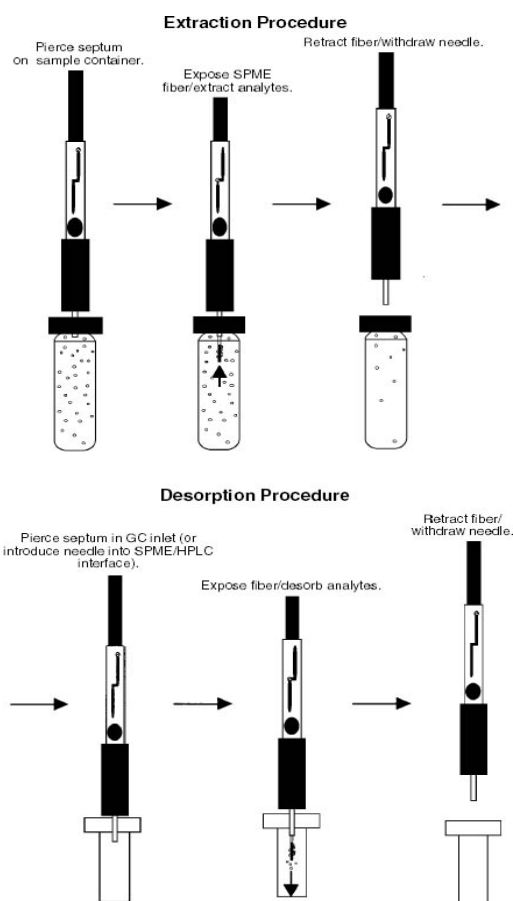
2.4 MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ – SPME^{11, 12)}

Solid phase microextraction (SPME), tedy mikroextrakce tuhou fází představuje jednoduchou, účinnou sorpční i desorpční techniku zakoncentrování vzorku, která přináší lineární výsledky v širokém rozsahu koncentrací. Je použitelná ve spojení s kolonami v plynové chromatografii, ale adaptér SPME-HPLC přináší možnost kombinace také s kapalinovou chromatografií.

Velkými výhodami této metody je urychlení přípravy vzorků (max. do 30 minut), její nenáročnost na práci a skutečnost, že nejsou potřebná velká množství vzorků ani žádná organická rozpouštědla. Metoda je vhodná pro rutinní použití, výsledky jsou reprodukovatelné.

2.4.1 Princip SPME^{11, 12)}

Podstatu fungování metody SPME tvoří 1 cm dlouhé křemenné vlákno pokryté polymerem, které je spojeno s ocelovým pístem a je umístěno v duté ocelové jehle, jako ochraně před mechanickým poškozením. Tato jehla zároveň slouží k propíchnutí septa v zátce vialky, což je umožněno posunutím pístu. Analyt je sorbován do vrstvy pokrývající vlákno a po dosažení rovnováhy (2 - 30 minut) je zasunuto zpět do jehly, se kterou je vytaženo z vialky spolu se vzorkem. Analyt je po zavedení jehly do injektoru plynového chromatografu tepelně desorbován a nanesen na GC kolonu, nebo při využití druhého možného způsobu je eluován rozpouštědlem a nanesen na kolonu kapalinového chromatografu.



Z fyzikálně chemického hlediska je rovnovážný stav SPME techniky závislý na koncentraci analytu a na typu a tloušťce polymeru. Sorbované množství závisí na distribuční konstantě a na tloušťce vrstvy polymeru. Doba extrakce je dána potřebným časem pro extrakci dostatečné koncentrace analytu s nejvyšší distribuční konstantou. Ta vzrůstá s molekulovou hmotností a bodem varu analytu.

Selektivitu extrakce lze ovlivnit typem polymeru. Těkavé látky vyžadují silnější vrstvu polymeru a slabší vrstva je účinnější pro sorpci středně těkavých analytů.

Obrázek 7: Mikroextrakce tuhou fází¹¹⁾

Mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím, které se sorbuje vláknem, existuje lineární vztah:

$$n \equiv \frac{K_f V_f C_0 V_s}{K_f^s V_f + V_s},$$

kde n je *množství adsorbovaného analytu*, C_0 jeho počáteční koncentrace, K_{fs} vyjadřuje rozdělovací koeficient pro analyt (polymer - vzorek), V_f značí objem pokrytí a V_s objem vzorku. Na dosažení co nejvyšší hodnoty K_{fs} , a tedy sorpční schopnosti vlákna se selektivním efektem, má vliv pokrytí vlákna. Z rovnice dále vyplývá, že i když je objem vzorku velký, množství extrahovaného analytu na objemu vzorku nezávisí. Při analýzách se v jednom kroku kombinují operace vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování.

Vzorkování SPME¹¹⁾

Pro dosažení vysoké přesnosti metody je třeba zajistit shodnost v délce doby vzorkování, konstantní velikost vialek i velikost vzorku a stejnou hloubku ponoru vlákna do vzorku. Pro analyty vyskytující se ve formě kapalné je citlivější SPME, která používá ponoření do vzorku. Opak platí pro analyty přítomné v prostoru head-space (plynná fáze nad kapalinou nebo nad pevným materiálem), kdy je využíváno metody ponoru a sorpce z prostoru. V headspace prostoru je dosaženo rovnováhy mnohem rychleji než při ponoření SPME vlákna, protože analyt může difundovat k vláknu rychleji. Tato metoda prodlužuje životnost vláken.

- *Plynná chromatografie* - desorpce analytu závisí na bodu varu analytu, tloušťce polymeru a teplotě dávkovače.
- *Kapalinová chromatografie* – k uvolnění analytu z vlákna se používá dynamická desorpce, nebo statická desorpce v případě pevně vázaných analytů.

2.4.2 Instrumentace SPME¹¹⁾

Vlákna

SPME vlákna jsou určena pro opakované používání v závislosti na typu aplikace, na vlastnostech komponent analyzovaného vzorku a na péči o vlákno. Vlákno se při opakovaném použití před vlastní analýzou aktivuje zahřáním. Princip fungování vlákna při použití metody SPME je popsán v kapitole 2.4.1. Volba správného typu vlákna hraje klíčovou roli při celé analýze. Analyt je zachytáván do vrstvy pokrývající vlákno, je potřeba tedy zohlednit vlastnosti analytu a na tomto podkladě vybírat optimální vlákno. Přehled výběru vlákna podle typu analyzované látky je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Příklady výběru SPME vlákna pro určité analyty¹⁾

Analyzované látky	Charakter vlákna
Těkavé látky	100 µm PDMS ¹
Těkavé látky, aminy, nitroaromáty	65 µm PDMS/DVB (případně s vazbou na 2 cm flexibilní křemenné vlákno) ³
Polární středně těkavé látky	85 µm PA ³
Nepolární vysokomolekulární látky	7 µm PDMS ²
Nepolární středně těkavé látky	30 µm PDMS ¹
Alkoholy a polární látky	65 µm Carbowax/DVB ³
Plyny a nízkomolekulární látky	75 µm Carboxen/PDMS ³
Chuťové (těkavé, středně těkavé) látky	50/30 µm DVB/carboxen/PDMS s vazbou na 1 cm flexibilní křemenné vlákno
Vonné látky	50/30 µm DVB/carboxen/PDMS s vazbou na 1 cm flexibilní křemenné vlákno
Aminy a polární látky (pouze HPLC)	60 µm PDMS/DVB ³
Povrchově aktivní látky (pouze HPLC)	50 µm Carbowax/v syntetické pryskyřici ³

PDMS – polydimethylsiloxan

¹ nevázaná fáze

DVB – divinylbenzene

² vázaná fáze

PA – polyacrylate

³ částečně zesíťovaná fáze

- *Nevázané fáze* jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, ale mohou v nich slabě bobtnat. Nesmí být použity nebo se čistit v nepolárních rozpouštědlech.

- *Vázané fáze* jsou stabilní ve všech organických rozpouštědlech. Při použití s rozpouštědly nepolárními mohou také slabě bobtnat.

- *Částečně zesíťované fáze* jsou stabilní ve většině rozpouštědel mísitelných s vodou i v některých nepolárních rozpouštědlech, kde dochází ke slabému bobtnání.

Držáky SMPE vláken

Držák je neodmyslitelnou součástí vlákna. Nejen že vlákno chrání, ale reguluje také sorpci a desorpci. Lze jej použít opakovaně bez omezení a umožňuje univerzální použití u všech typů vláken. Existují držáky pro automatické, ale i ruční vzorkování, kde pozice vlákna je většinou nastavitelná pro vzorkování, správné umístění do vyhřívaného bloku nástřiku plynového chromatografu a vlákno lze v dané pozici zajistit a pak zatáhnout zpět do jehly. Využívá se také typ ručního držáku, který je přenosný a je určen pro práci v terénu. Tento držák uloží vlákno pro vzorkování a utěsní vnitřním septem.

SPME-HPLC adapter

SPME-HPLC adaptér slouží k umožnění kontaktu vlákna s mobilní fází, uvolnění sorbované látky a její přenesení na kolonu. Proudem mobilní fáze dochází k eluování analytu (dynamická desorpce), ale pokud je vázán na vlákne silněji, pak je vhodné vlákno máčet v mobilní fázi před nástřikem na kolonu (statická desorpce). Součástmi adaptéru jsou šesticečný dávkovací ventil a desorpční komora, jež nahrazuje nástřikovou smyčku HPLC systému.

2.4.3 Optimalizace SPME¹¹⁾

U metody SPME není za potřebí ani úplná extrakce ani úplná rovnováha. Co je důležité, je shodná délka doby vzorkování, teplota vzorku a hloubka ponoru vlákna. Křemenná vlákna jsou dodávána v délkách 1 a 2 cm, kde 2 cm mají vyšší citlivost.

Polarita vlákna

Polární analyty jsou s větší účinností extrahovány vlákny s polárním povrchem a naopak. Toto pravidlo je stejné jako při vlastní analýze na chromatografické koloně, ale s tím rozdílem, že stacionární fáze je u SPME výrazně menší než na chromatografické koloně, a proto také malé rozdíly v polaritě stacionární fáze nemusí vést u SPME ke srovnatelné sorpční selektivitě.

Porozita a specifický povrch

Schopnost zachytit malé těkavé molekuly a molekuly plynů je nízká a koncentrace minimálního deketovatelného množství poměrně vysoká. Pro zachycení většího množství těchto malých molekul je důležitá tloušťka vrstvy a její porozita. Byla vyvinuta vlákna se syntetickým porézním materiálem, který obsahuje carboxenové částice v polydimethylsiloxanu, kde malé póry v carboxenových částicích vytvoří uhlíkové molekulové síto pro extrakci malých molekul. Dalším porézním materiálem je divinylbenzen.

Tloušťka vrstvy

Silnější vrstva je schopna extrahovat větší množství analytu než vrstva tenká. Proto se pro těkavější látky používá vlákno se silnější vrstvou. Tenká vrstva na druhou stranu zajišťuje rychlou difúzi a uvolnění látek s vyšším bodem varu během tepelné desorpce. Silná vrstva účinněji extrahuje výše vroucí složky, ale desorpce je dlouhotrvající proces, jenž může zasahovat až do další extrakce.

Míchání vzorku

Mícháním se extrakce zlepšuje a zkracuje, hlavně u molekul s vyšší molekulovou hmotností a vysokým difuzním koeficientem. Ultrazvuk zvyšuje sorpci a zároveň vede k zahřívání vzorku, což může způsobit odpaření vzorku do prostoru head-space a zlepšit tento způsob extrakce.

Efekt vysolování a pH

Zvýšením iontové síly roztoku po přidání soli do vzorků se také zvýší účinnost extrakce, obzvláště pro látky polární a těkavé. Tento proces se však nedoporučuje pro látky vysokomolekulární, protože zde vzniká možnost vzniku interferujících píků. Extrakční účinnost lze také zvýšit změnou pH.

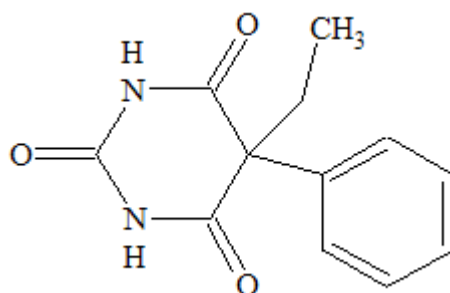
2.5 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÉHO LÉČIVA^{13, 14)}

Název látky: 5-ethyl-5-fenylbarbiturová kyselina

Synonyma: phenobarbital, kyselina ethylfenylbarbiturová, luminal, phenemal, phenobarbiton, phenobarbitural

Sumární vzorec: C₁₂H₁₂N₂O₃

Strukturní vzorec:



Fyzikálně chemické vlastnosti

- *Vzhled:* bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly⁷⁾
- *Molekulová hmotnost:* 232,2
- *pKa:* 7,4 (25⁰C)
- *Rozpustnost:* voda 1 gl⁻¹, ethanol 1:10, chloroform 1:40, ether 1:40

Farmakologické vlastnosti¹⁵⁾

- *Maximální denní dávka p.o.:* 0,4 g
- *Maximální jednotlivá dávka p.o.:* 0,2 g (ČL 2009)
- *Absorpce perorální dávky:* 80 až 100 %
- *Biotransformace* játry a *vylučování* močí

Použití

Fenobarbital se používá jako hypnotikum a v nízkých dávkách jako sedativum a antiepileptikum. U nás jsou známy přípravky s touto látkou jednak jako tablety, ale také v injekční formě. Existují také léčivé přípravky s obsahem fenobarbitalu v kombinaci s jinými léčivy.

2.6 HPLC ANALÝZA FENOBARBITALU – INFORMACE Z LITERATURY¹⁶⁻²⁰⁾

Při výběru podmínek v diplomové práci bylo čerpáno z informačních zdrojů¹⁶⁻²⁰⁾, které poskytly data pro usnadnění vypracování metodiky práce. Stanovením fenobarbitalu metodou HPLC (SPME) se již dříve zabývaly některé studie. Pro rešerši bylo využito národní knihovny MEDLINE (z let 1997 - 2009), jež obsahovala několik záznamů o této problematice. Stručné shrnutí některých z článků, které pro tuto práci byly stěžejní, je uvedeno níže.

- **Moriyama, Yamashita a kol.**¹⁶⁾ vypracovali metodiku pro stanovení fenobarbitalu (PB) z plazmy mláďat potkanů pomocí HPLC. Nasycený roztok PB byl ředěn 50 % methanolem na koncentrace 10, 15 a 30 µg/ml a byl uzavřen v kapiláře. Množství léčiva bylo počítáno z podílu ploch píků PB a vnitřního standardu (IS). Pro experiment byla použita analytická kolona o rozměrech 4 x 125 mm, plněná sorbentem C₁₈ (4µm). Mobilní fáze byla směs acetonitrilu a KH₂PO₄ (0,01M) v poměru 25:75, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a vlnová délka detektoru 210 nm. Kapilární plazma, která byla vložena na SPE předkolonu Bond Elut za použití 1 ml KH₂PO₄ (0,01 M), byla aplikována na kolonu s 50 µl acetonitrilu o koncentraci 2 µg/ml jako IS. Po dvojím promytí kolony s 1ml KH₂PO₄ (0,01 M) byl PB a IS extrahován 250 µl methanolu. Do HPLC systému bylo dávkováno 30 µl.
- **García-Borregón, Lores a Cela**¹⁷⁾ ve své studii zkombinovali výhody mikro-HPLC techniky s fotochemickou derivatizací. Aparatura zahrnovala mimo jiné analytickou kolonu s parametry 15 cm x 320 µm I.D., plněnou grafitovým uhlíkem a fotochemické produkty byly získány tradičním HPLC systémem detekce diodovým polem s použitím fotoreaktoru (křemenná kapilára 375 µm x 75 µm I.D.). Standard fenobarbitalu byl připraven rozpuštěním v methanolu (1000 µg/ml) a na příslušné koncentrace dále ředěn směsí methanol-voda (1:1). Mobilní fázi představovala směs methanolu a 10 mM fosfátového pufru (pH 7) v poměru 50:50. Pufry byl získán kombinací KH₂PO₄ a K₂HPO₄ · 3H₂O.

Průtok mobilní fáze byl 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. UV-detekce probíhala při 220 nm (nederivované barbituráty) a 270 nm (po derivatizaci).

- **Iwai, Hattori a kol.**¹⁸⁾ se zabývali problematikou detekce fenobarbitalu z lidské krve a moči s využitím mikroextrakce na pevné fázi (SPME) v kombinaci s plynovou chromatografií - hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Standard byl připraven jako methanolický roztok léčiva a vlastní vzorek obsahoval 0,5 ml plné krve nebo moči a 10 μg fenobarbitalu a ostatních léčiv, která byla analyzována (pro naše účely nepodstatná). Připravené směsi byly upraveny na pH 6-7 hydroxidem sodným a jako vhodná se osvědčila solná přísada, a to 0,5 g síranu sodného. Výťažnost zvýšilo zahřátí na teplotu 60 $^{\circ}\text{C}$ a za těchto podmínek byla potřebná doba pro ponoření vlákna 60 minut. Desorpce probíhala 10 minut a vlákno bylo mezi jednotlivými extrakcemi vymýváno destilovanou vodou. Pro GC-MS analýzu byla použita HP-1 kolona o rozměrech 30 m x 0,25 mm I.D.
- **Cantú, Toso a kol.**¹⁹⁾ analyzovali dvě skupiny léčiv, a sice tricyklická antidepresiva a antikonvulziva a mezi nimi tedy i fenobarbital. Pro determinaci zvolili metodu SPME a kapalnou chromatografii (SPME/LC). Jako nejvhodnější vlákno bylo určeno carbowax/pryskyřice (CW/TPR, 50 μm). Analýza byla prováděna na koloně RP-18 o parametrech 125 mm x 4 mm x 5 μm s protékající mobilní fází, která měla složení fosfátový pufr (0,01 M, pH 7)/ acetonitril/methanol (65:18:17) při průtoku 1 ml/min. Po 7 minutách byla mobilní fáze vyměněna na poměr (55:24:21). Detekce antikonvulziv probíhala při vlnové délce 210 nm. Zásobní roztoky fenobarbitalu a vnitřního standardu byly připraveny rozpuštěním jednotlivých látek v methanolu. Vzorek plazmy byl potom doplněn o 50 μl připraveného roztoku standardu o příslušné koncentraci a o vnitřní standard 4-methylprimidon (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 1ml vzorku plazmy byl upraven 30 % NaCl a fosfátovým puforem (pH 5) a byl podroben extrakci na 30 minut, při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. Následovala fáze desorpce do 50 μl mobilní fáze po dobu 10 minut. Retenční čas fenobarbitalu byl 2,5 minut.

- **Hall a Brodbelt**²⁰⁾ zvolili pro determinace osmi barbiturátů včetně fenobarbitalu metodu SPME a GC-MS s analyzátozem na principu iontové pasti. Pro mikroextrakci byla testována vlákna polyakrylát, polydimethylsiloxan a carbowax-divinylbenzen (DVB), přičemž poslední jmenované vykazovalo nejvyšší extrakční efektivitu. SPME extrakce byla uskutečněna ve 4 ml vzorku připraveném ředěním methanolického nebo acetonového roztoku barbiturátů deionizovanou vodou. SPME zařízení bylo přeneseno na GC injektor k tepelné desorpci při 250 °C. 12-min desorpční čas byl vybrán jako nejlepší a po této desorpční době bylo vlákno přesunuto z injektoru do ledu, aby se zamezilo ztrátám analytu do ovzduší. Pro vyšší výtěžek bylo provedeno vysolování chloridem sodným, avšak solný obsah nad 50 % nasyceného roztoku zapříčinil u fenobarbitalu spíše negativní efekt, tudíž byla zvolena hodnota 25 % nasyceného NaCl. K separaci byla použita analytická kolona PTE-5 (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm d_f).

3. CÍL

Cílem této diplomové práce je nalézt optimální podmínky pro izolaci fenobarbitalu ze vzorku plazmy králíka za použití metody mikroextrakce tuhou fází (SPME) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Problematika je rozdělena na tyto dílčí části:

- Stanovení vhodných podmínek HPLC analýzy fenobarbitalu
- Výběr podmínek pro metodu SPME pro hodnocení fenobarbitalu ve vzorku vody
- Výběr podmínek pro metodu SPME pro hodnocení fenobarbitalu ve vzorku plazmy
- Vypracování kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení fenobarbitalu z králičí plazmy

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL

Biologický materiál

- králičí plazma (Eldoret s.r.o., Praha, ČR)

Léčiva a chemikálie

- phenobarbitalum (RNDr. Jan Kulich, Praha, ČR)
- methanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- ethanol ČL 2002 (RNDr. Jan Kulich, Praha, ČR)
- acetonitril gradient grade LC (Merck, Darmstadt, Germany)
- voda pro HPLC
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)
- kyselina fosforečná 85 % p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)

Materiál pro metodiku

a) chromatografický materiál

- analytická skleněná kolona Separon CGC, SGX C₁₈, 150 x 3,0 mm I.D. (5 μm), (Tessek Ltd, Praha, ČR)
- analytická skleněná kolona Separon CGC, SGX C₁₈, 150 x 3,0 mm I.D. (7 μm), (Tessek Ltd, Praha, ČR)

b) materiál pro mikroextrakci

- extrakční vlákno PDMS/DVB 60μm Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- extrakční vlákno carbowax/templated Resin (CW/TPR) 50μm Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- držák pro SPME vlákno Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Přístroje

- analytické váhy HR-120 (A&D Company Ltd, Japonsko)
- pH metr Acidimetr 333 (Druopta, Praha, ČR)

- ultrazvuk K10 (Krainek s.r.o., Nové Zámky, SR)
- magnetická míchačka MM2A (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
- spektrofotometr UV-2401 PC (Shimadzu, Columbia, USA)
- čerpadlo Consta Metric 3500 (Thermo Separation Products, USA)
- čerpadlo Spectra System P 1000 (Thermo Separation Products, USA)
- autosampler Spectra System AS 1000 (Thermo Separation Products, USA)
- UV detektor Spectra System UV 3000 HR (Thermo Separation Products, USA)
- PC program ChromQuest 4.2.34 (Thermo Electron 2003, USA)

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Fosfátový pufr

0,680 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo rozpuštěno v 500 ml vody a 0,895 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno ve 250 ml vody. Roztoky se smíchaly v poměru 89:11. Takto připravený pufr byl ředěn s vodou v poměru 1:1.

Mobilní fáze

K 50 ml methanolu bylo přidáno 50 ml fosfátového pufru a po promíchání byla směs odplyněna v ultrazvukové lázni.

Roztok standardu fenobarbitalu

Roztok o koncentraci 0,1 mg/ml: Bylo připraveno 20 ml rozpouštědla smícháním 18 ml methanolu a 2 ml pufru. 10 mg fenobarbitalu bylo naváženo do odměrné baňky na 10 ml a doplněno připravenou směsí po značku. 1 ml byl poté odebrán do čisté odměrné baňky na 10 ml a doplněn rozpouštědlem po značku.

Roztok o koncentraci 1 mg/ml (použití pro analýzu metodou SPME): 25 mg fenobarbitalu bylo rozpuštěno ve 25 ml methanolu.

Roztok o koncentraci 10 mg/ml (použití pro kvantitativní hodnocení): 50 mg fenobarbitalu bylo rozpuštěno v 5 ml methanolu.

Kyselina fosforečná 8 %, 0,6 %

Kyselina fosforečná 8 %: 9,4 ml kyseliny fosforečné 85 % bylo doplněno vodou na objem 100 ml.

Kyselina fosforečná 0,6 %: 0,7 ml kyseliny fosforečné 85 % bylo doplněno vodou na objem 100 ml.

4.3. PRACOVNÍ POSTUP

4.3.1. Podmínky pro detekci fenobarbitalu metodou HPLC

Prvním cílem v této experimentální práci bylo vyhledat optimální podmínky, za kterých bude následně prováděna analýza fenobarbitalu pomocí metody HPLC.

K dispozici byla skleněná kolona Separon SGX C₁₈, (5 μm) a skleněná kolona Separon SGX C₁₈, (7 μm).

Jako optimální mobilní fáze protékající kolonou byla vybrána směs methanolu a fosfátového pufru, v poměru 50:50, kde byl pufr ředěn vodou 2x, pH této směsi bylo 7,4 a jevílo se pro analýzu jako vhodné. Před analýzou byla směs určená k průtoku kolonou odplyněna v ultrazvukové lázni a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min (tlak 15 MPa).

Detekce byla realizována v UV oblasti při vlnové délce 218 nm.

Pro rozpouštědlo standardu fenobarbitalu byla zvolena směs methanolu a fosfátového pufru, v poměru 80:20. Pro získání požadovaných koncentrací vzorku se tedy příslušné množství fenobarbitalu rozpouštělo v této stanovené směsi. Roztok standardu fenobarbitalu byl dávkován na kolonu v koncentraci 0,1 mg/ml dávkovacím ventilem v množství 20 μl.

4.3.2 Izolace léčiva z vody pomocí metody SPME

Izolaci léčiva z biologického materiálu předcházelo stanovení podmínek pro izolaci léčiva z vody. Experiment byl prováděn za pomoci techniky SPME, při které byla zkoušena extrakční vlákna dvojího typu: polydimethylsiloxan v kombinaci s divinylbenzenem (PDMS/DVB) a vlákno carbowax. Izolace probíhala následujícím způsobem:

Sorpce byla realizována po dobu 20 minut, kdy bylo vlákno ponořeno do 5 ml roztoku vzorku.

Vzorek pro sorpci byl připraven následovně: K 0,5 ml vody bylo přidáno 0,5 ml roztoku standardu fenobarbitalu o koncentraci 1 mg/ml. Po promíchání byla směs doplněna vodou na objem 5 ml.

Léčivo se poté desorbovalo 20 minut do 1,6 ml čistého methanolu, ze kterého bylo po desorpci odebráno 0,8 ml, a toto množství bylo doplněno o 0,2 ml pufru, aby byl zachován poměr rozpouštědla, ve kterém je fenobarbital nejlépe hodnotitelný za zvolených chromatografických podmínek. Takto upravené desorpční medium bylo analyzováno.

4.3.3 Izolace léčiva z králičí plazmy pomocí metody SPME

Náplní třetí části práce byla izolace fenobarbitalu ze vzorku králičí plazmy.

Pro izolaci bylo využito dvou typů vláken: vlákno carbowax a vlákno polydimethylsiloxan v kombinaci s divinylbenzenem (PDMS/DVB). Pro vlákno carbowax byla užitá kolona Separon SGX C₁₈, (5 µm) a pro vlákno PDMS/DVB kolona Separon SGX C₁₈, (7 µm).

Obě fáze extrakce (sorpce i desorpce) byly uskutečňovány po dobu 20 minut stejně jako v případě izolace léčiva z vody.

Vzorek pro sorpci byl připraven následovně: K 0,5 ml plasmy bylo přidáno 0,5 ml roztoku standardu fenobarbitalu o koncentraci 1 mg/ml. Po promíchání byla směs naředěna vodou na objem 5 ml.

Postup desorpce se nelišil od postupu desorpce léčiva z vody, tudíž se desorbovalo do 1,6 ml methanolu, ze kterého bylo odebráno 0,8 ml a doplněno pufrům do celkového objemu 1 ml.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

Při hledání chromatografických podmínek se vycházelo z chemických vlastností analyzovaného léčiva a z informací nalezených v pracích¹⁶⁻²⁰), které již tuto problematiku dříve řešily. Jako první proběhl výběr vhodné mobilní fáze protékající kolonou a výběr optimálního rozpouštědla standardu fenobarbitalu.

Před vlastním experimentem bylo změřeno absorpční spektrum fenobarbitalu v oblasti UV. Hodnota vlnové délky, která byla zvolena jako vhodná pro detekci, byla $\lambda = 218 \text{ nm}$.

Pro analýzu byla zvolena analytická kolona Separon CGC, SGX C₁₈, parametry 3,0 x 150 mm, (částice o velikosti 5 μm). Tento typ kolony vyhovoval pro podmínky v této části práce.

Následovalo zvolení mobilní fáze (MF), která měla protékat kolonou. Při studiu rešerší (kapitola 2.6) se zjistilo, jaké MF byly již dříve zkoušeny. Jednalo se převážně o látky charakteru organických rozpouštědel nebo jejich směsi.

Na konci každého měření se vždy kolona nechala promývat směsí methanolu s vodou v poměru 50:50 po dobu 20 minut a následně stejnou směsí v poměru 90:10 po dobu 10 minut. Roztok k proplachování byl stejně jako MF vždy před samotným použitím odvzdušněn.

Prvním krokem bylo namíchání fosfátového pufru, který obsahoval dihydrogenfosforečnan draselný a dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného v poměru 89:11. Takto získaný pufr byl přidáván k methanolu ve výsledných poměrech směsi 50:50 a 60:40, přičemž lepší (štíhlejší) tvar píků byl zaznamenán při průtoku MF 50:50 (pufr:methanol). Jelikož se pufr často srážel a ucpával kolonu, bylo vyzkoušeno jeho naředění vodou 10x. Pík byl široký. Nejlepší tvar píku se jevil, když byl pufr naředěn vodou 2x a s tímto ředěním se tedy pokračovalo i nadále.

Po úvaze, že skupina barbiturátů, kam je také řazen fenobarbital, vykazuje vlastnosti slabých kyselin, byly prováděny pokusy o úpravu pH.

MF měla bez úpravy pH 7,4 a tato hodnota byla upravována pomocí kyseliny fosforečné 8 % na hodnoty nižší. Při nižších hodnotách pH měly však píky pozvolný nástup, byly široké a asymetrické, proto bylo rozhodnuto pH MF ponechat bez úpravy.

Průtok MF byl 0,4 ml/min (tlak 15 MPa). Při průtoku 0,5 ml/min již vznikala na koloně přetlak. Na kolonu bylo dávkováno 20 µl vzorku.

Pro další postupy byla tedy zvolena jako vyhovující MF směs fosfátového pufru a methanolu v poměru 50:50, bez úpravy pH. Retenční čas za těchto podmínek byl 4 minuty.

Dalším krokem bylo zoptimalizování podmínek směsi, ve které měl být rozpouštěn analyzovaný fenobarbital.

Jako rozpouštědlo fenobarbitalu byl testován methanol, ethanol a acetonitril. Opět byly vodítkem rešeršní práce (kapitola 2.6). Ani v jednom ze tří případů nebylo dosaženo vhodného výsledku. Píky byly příliš široké s dlouhým nástupem.

Proběhl pokus o rozpuštění fenobarbitalu v MF. Výsledky byly uspokojivé, tudíž tato myšlenka zůstala stěžejní a byl upravován poměr složek směsi MF. Nejdříve byl pufr ve směsi ředěn vodou 10x (1 díl pufru, 9 dílů vody), ale píky byly s pozvolným nástupem a příliš široké. Pufr v rozpouštědle standardu byl tedy naředěn vodou v poměru 50:50 a poté smíchán s methanolem v poměrech 60:40 (60 dílů methanolu), dále pak 70:30, 80:20 a 90:10. Tyto úpravy měly jednak vliv na retenční čas, ale i na samotný tvar píku. Nakonec byl nalezen poměr rozpouštědla, a sice 80:20, kdy pík byl štíhlý, bez chvostování, symetrický a u základny nerozšířený. Retenční čas byl 4 minuty. Dále byl tedy standard fenobarbitalu rozpouštěn ve zvolené směsi methanolu a pufru v poměru 80:20.

Přehled úprav, které byly odzkoušeny při výběru základních chromatografických podmínek, je sumarizován v tabulkách 4 a 5. Tučně jsou vyznačeny výsledky, jež byly zvoleny jako optimální a byly proto zachovány v dalších částech práce.

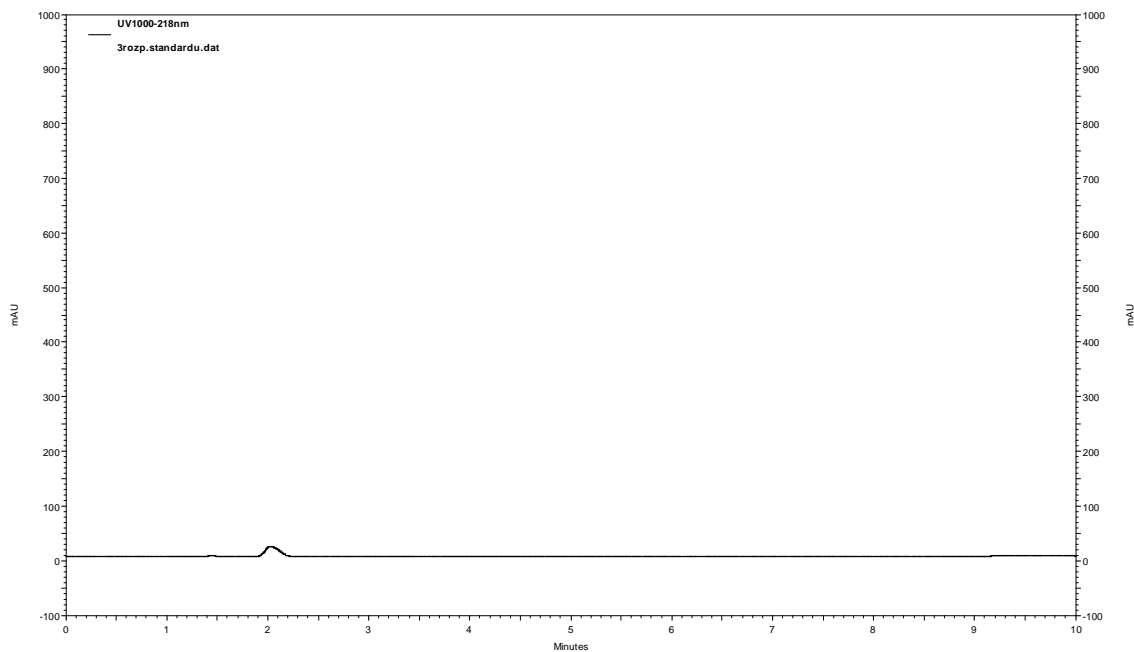
Tabulka 4: Úprava směsi MF

poměr složení MF (methanol:pufř)	40:60	50:50	
ředění pufřu (pufř:voda)	10:90	50:50	
úprava pH MF (methanol:pufř = 50:50, pufř:voda = 50:50)	6,9	5	7,4

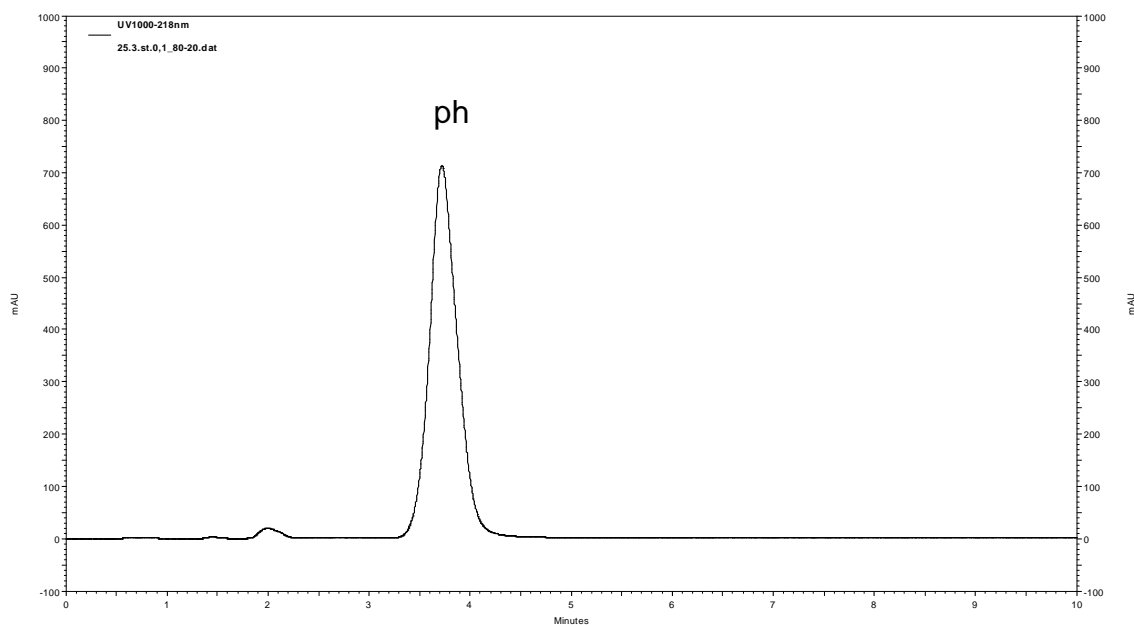
Tabulka 5: Úprava rozpouštědla standardu fenobarbitalu

typ rozpouštědla	methanol	ethanol	acetonitril	směs methanol, pufř	
poměr složení rozpouštědla (methanol:pufř)	90:10	70:30	60:40	50:50	80:20
ředění pufřu (pufř:voda)	10:90		50:50		

Obrázky 8 - 9 na dalších stranách znázorňují ukázky chromatogramů, které byly získány v této části práce.



Obrázek 8: HPLC chromatogram rozpouštědla fenobarbitalu o složení methanol a pufr v poměru 80:20. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.



Obrázek 9: HPLC chromatogram standardu fenobarbitalu v rozpouštědle (c = 0,1 mg/ml). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.

5.2 IZOLACE FENOBARBITALU Z VODY METODOU SPME

Pro extrakci byla k dispozici 2 vlákna, polydimethylsiloxan v kombinaci s divinylbenzenem (PDMS/DVB) a vlákno carbowax s pryskyřicí (CW/TPR), v práci označováno pouze carbowax. Jako první bylo testováno PDMS/DVB a extrahovalo se 10 minut za stálého míchání na magnetické míchačce. Doba však byla příliš krátká, a proto píky nebyly znatelné, pro práci nevýznamné. Doba sorpce i desorpce byla tedy zvýšena na 20 minut.

Pro extrakci byl připraven roztok tak, že 0,5 ml vody se smíchalo s 0,5 ml fenobarbitalu o koncentraci 1 mg/ml a po promíchání byl vzorek doplněn vodou na výsledný objem 5 ml, čímž byla docílena koncentrace 0,1 mg/ml. Z této směsi byla provedena sorpce na vlákno. Poté následovala desorpce z vlákna do vialky, ve které bylo připraveno 250 μ l rozpouštědla pro fenobarbital, tedy směs methanolu a pufru v poměru 80:20. Po 20 minutách desorpce následoval nástřik na kolonu. Chromatogram nezobrazoval žádný pík léčiva. Celý krok byl zopakován s rozdílem, že do vialky bylo nadávkováno jen 200 μ l methanolu a 50 μ l pufru bylo přidáno až po resorpci. Ani tento krok nevedl k lepším výsledkům.

Tak se dospělo k závěru, že objem methanolu, do kterého se vymývá léčivo z vlákna, je příliš malý. Podmínky byly tedy upraveny tak, že se desorbovalo do 1,6 ml methanolu, z něho byla odebrána polovina, tedy 0,8 ml a tento objem byl doplněn o 0,2 ml pufru a 20 μ l dávkováno na kolonu. Záznam chromatogramu přinesl uspokojivé výsledky. Při porovnání chromatogramu čistého rozpouštědla s chromatogramem desorpčního media bylo detekováno léčivo při retenčním čase 5 minut.

Stejný princip extrakce byl využit pro testování vlákna carbowax.

Ve kvantitativním porovnání se větší množství léčiva extrahovalo na vlákno PDMS/DVB a sice 3,8 % ze standardu, u carbowaxu to bylo 1,5 %. Pro ilustraci je popsán postup, pomocí kterého byla počítána výtěžnost.

Postup při výpočtu výtěžnosti:

Koncentrace standardu fenobarbitalu byla 0,1 mg/ml. Na kolonu bylo dávkováno desorpční medium o objemu 20 μ l, což odpovídá 2 μ g léčiva. Výsledkem HPLC analýzy byla plocha píku standardu a plocha píku testovaného vzorku po mikroextrakci. Pomocí přímé úměry bylo zjištěno množství léčiva, které bylo dávkováno na kolonu po mikroextrakci (hodnota X), a toto množství bylo přepočítáno na objem vialky, ze které přístroj odebíral 20 μ l, tedy na objem 1 ml (hodnota Y).

Množství odpovídající dávkovanému množství na kolonu 20 μ l (2 μ g léčiva):

Plocha standardu 2 μ g
Plocha vzorku X μ g

Množství odpovídající objemu vialky, ze které bylo dávkováno na kolonu (1 ml):

20 μ lX μ g
1 mlY μ g

Hodnota Y odpovídá množství 0,8 ml, tedy objemu, který byl odebrán po mikroextrakci a doplněn puřrem na 1 ml. Jelikoř sorpce byla prováděna do 1,6 ml, tedy do dvojnásobného množství, je potřeba hodnotu Y zdvojnásobit (hodnota 2Y). Tato hodnota, odpovídající 1,6 ml, je poté přepočítána na 1 ml vzorku (hodnota Z) a přímou úměrou porovnána s koncentrací standardu 0,1 mg/ml, která představuje 100%.

0,1 mg/ml 100%
Hodnota Z ?%

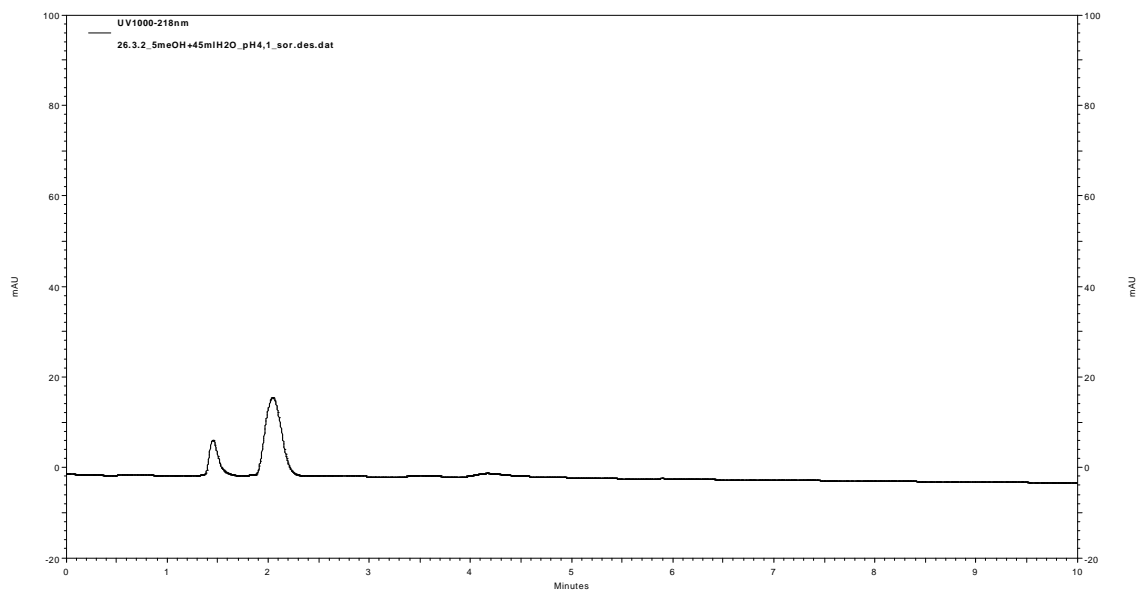
Stanovení času pro vymývání vlákna mezi jednotlivými extrakcemi

Jak bylo výše popsáno, desorpce z vlákna do 1,6 ml metanolu byla uskutečňována 20 minut. K definici času, potřebného k úplnému vymytí léčiva z vlákna, byla zvýšena doba jeho promývání. Pro tento účel bylo použito vlákno PDMS/DVB. Na kolonu byl proveden nástřik vzorku methanolu, ve kterém vlákno bylo ponořeno dalších 20 minut, celkem tedy po 40 minutách od sorpce (obrázek 12), přičemž desorpční medium po prvních 20 minutách bylo použito pro detekci léčiva zvlášť.

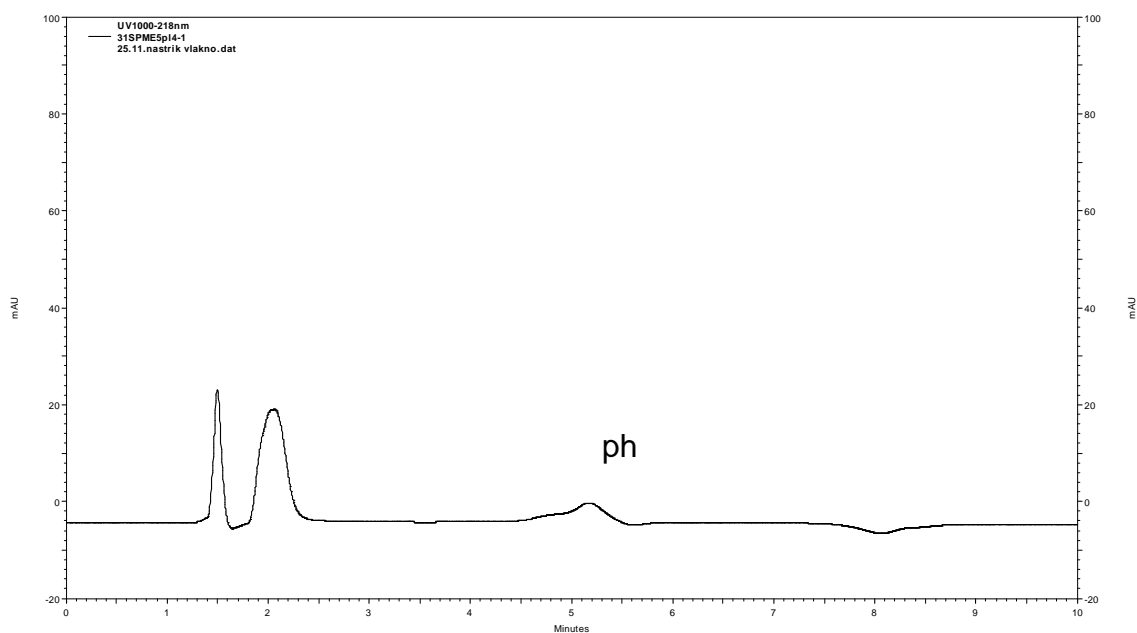
Závěrem bylo zjištění, že těchto 40 minut k promývání vlákna v methanolu je dostačující pro to, aby nebyly detekovatelné žádné stopy léčiva. Postup tedy vypadal tak, že po standardním provedení extrakce, tedy po 20 minutách zpětné resorpce do 1,6 ml methanolu byla 5 ml zkumavka naplněna methanolem a promývání vlákna pokračovalo dalších 20 minut, než mohlo být znovu využito k další extrakci.

Následující obrázek (10) je chromatogram rozpouštědla fenobarbitalu, který byl pořízen nástřikem vzorku na kolonu po mikroextrakci, bez přídavku analyzovaného léčiva.

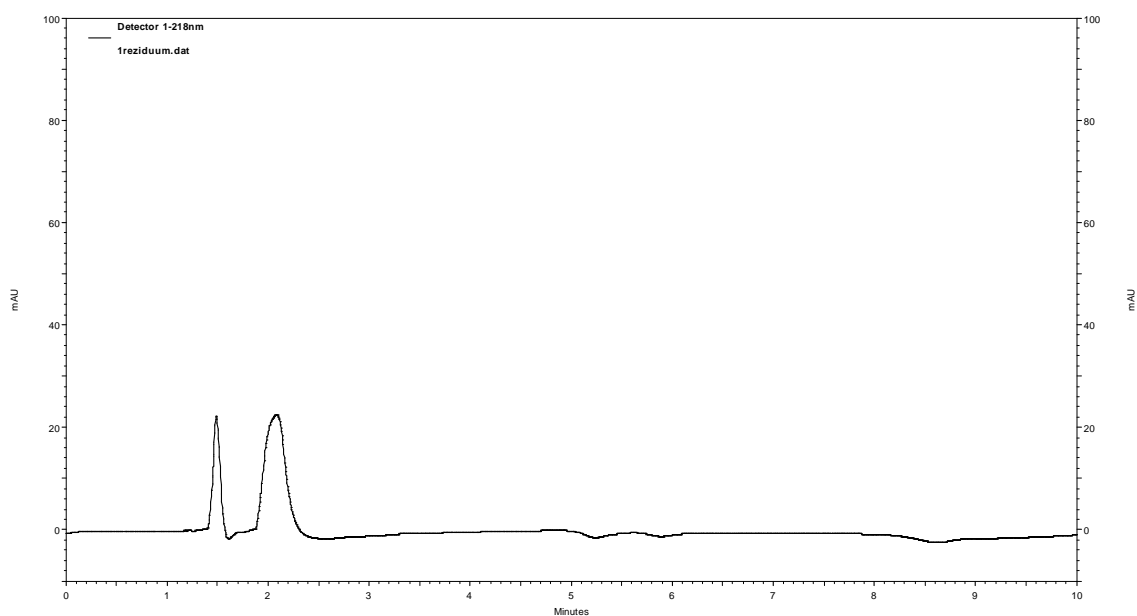
Obrázky 11, 12 jsou záznamy nástřiku roztoku po 20 a po 40 minutách vymývání vlákna PDMS/DVB v methanolu, resp. zobrazují zbylá rezidua, která po těchto časech byla desorbována z vlákna.



Obrázek 10: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku vody bez přídavku fenobarbitalu. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.

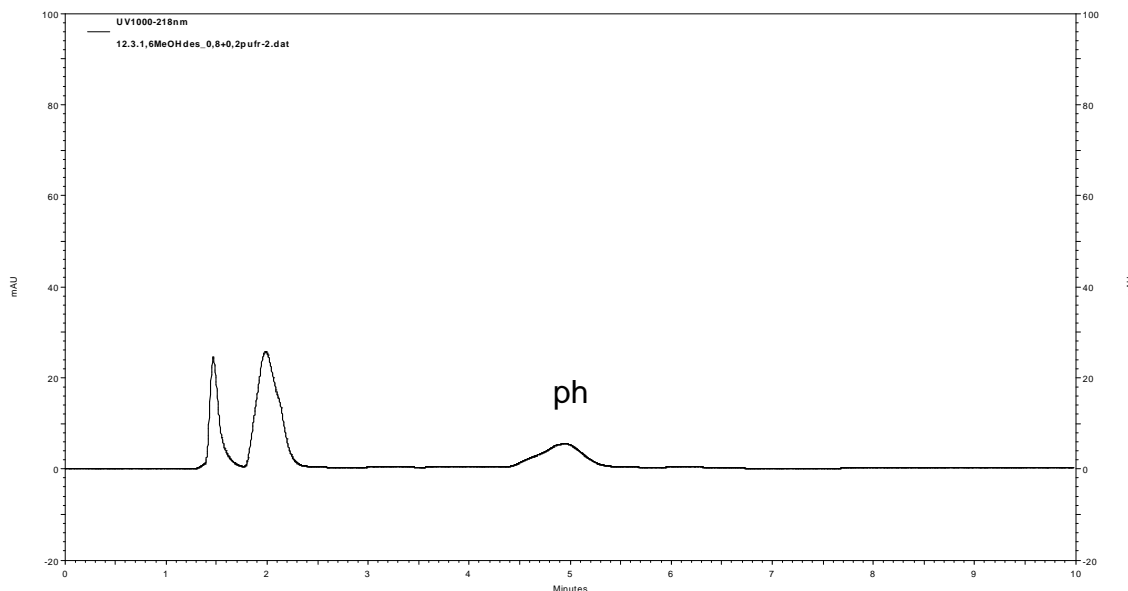


Obrázek 11: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku vody s přidavkem fenobarbitalu za užití vlákna PDMS/DVB. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.



Obrázek 12: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku vody s přidavkem léčiva za užití vlákna PDMS/DVB po 40 minutách vymývání vlákna. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.

Obrázek 13 zobrazuje HPLC chromatogram po nástřiku vzorku izolovaného fenobarbitalu. Tento vzorek byl získán po mikroextrakci na vlákno carbowax.



Obrázek 13: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku vody s přidavkem léčiva s užitím vlákna carbowax. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C₁₈, 5 μm.

Úprava pH vzorku a její vliv na výtěžnost

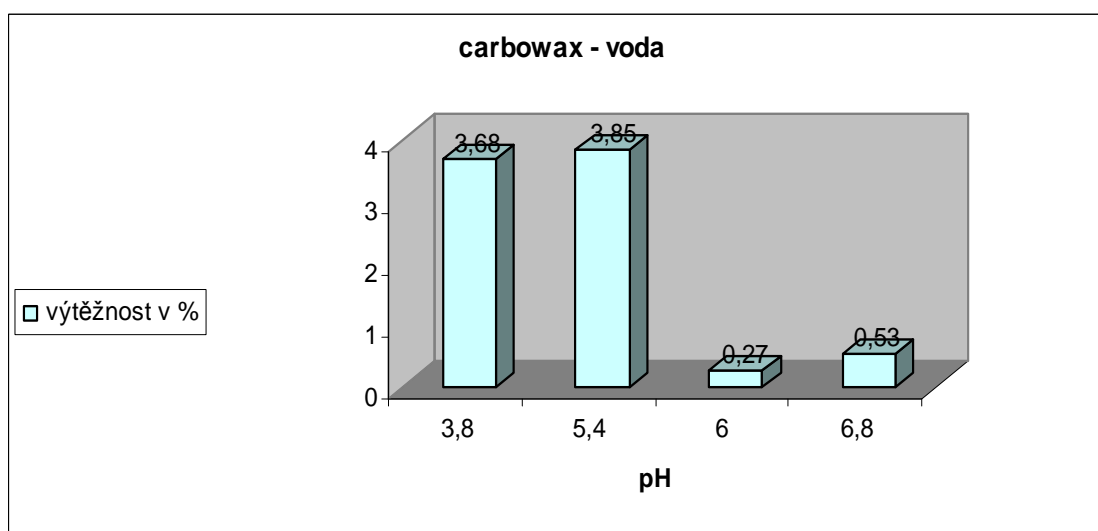
Pomocí 0,6% kyseliny fosforečné bylo upravováno pH vodného vzorku fenobarbitalu. Byl sledován vliv těchto změn na výtěžnost extrakce s využitím vlákna carbowax. Bez úpravy měl roztok hodnotu pH 6,8. Po kapkách byla přidávána kyselina fosforečná, až bylo dosaženo hodnot pH 6,0, pH 5,4 a pH 3,8. Nejvíce látky se extrahovalo při úpravě na pH 5,4, výtěžnost činila 3,85 %. Kromě pH zůstaly všechny ostatní podmínky zachovány tak, jak byly určeny výše za optimální. Tlak při průtoku MF 0,4 ml/min byl 16 MPa.

Graf 1 uvádí procentuální výtěžnost extrakcí na vlákno carbowax při různých hodnotách pH roztoku standardu fenobarbitalu pomocí 0,6 % kyseliny fosforečné. Tabulka 6 zahrnuje data, potřebná k vytvoření grafu 1.

Tabulka 6: Plochy píků pro jednotlivé hodnoty testovaného pH získané ze dvou analytických stanovení (SPME z vody, vlákno carbowax).

pH vzorku	plocha píku			výťažnost [%]
	1. měření	2. měření	průměr	
3,8	409 309	403 883	406 596	3,68
5,4	423 449	428 457	425 953	3,85
6,0	30 649	29 989	30 319	0,27
6,8	60 365	57 635	59 000	0,53
<i>standard</i>	<i>13 821 511</i>	<i>13 828 219</i>	<i>13 824 865</i>	

Graf 1: Procentuální výťažnost léčiva po mikroextrakci z vody na vlákne carbowax při různých hodnotách pH.



V této části práce byly tedy stanoveny optimální podmínky pro mikroextrakci z vody následovně. Do vodného roztoku fenobarbitalu o koncentraci 0,1 mg/ml, upraveného pomocí 0,6 % kyseliny fosforečné na pH 5,4 má být za stálého míchání na magnetické míchačce ponořeno vlákno carbowax na 20 minut a po uplynutí této doby se po stejnou dobu má z vlákna resorbovat léčivo do 1,6 ml methanolu. Z něj je poté odebrána polovina, tedy 0,8 ml, která je doplněna puřem na objem 1 ml. Na kolonu je dávkováno 20 μ l. Léčivo je detekováno při retenčním čase 5 minut.

5.3 IZOLACE FENOBARBITALU Z KRÁLIČÍ PLAZMY METODOU SPME

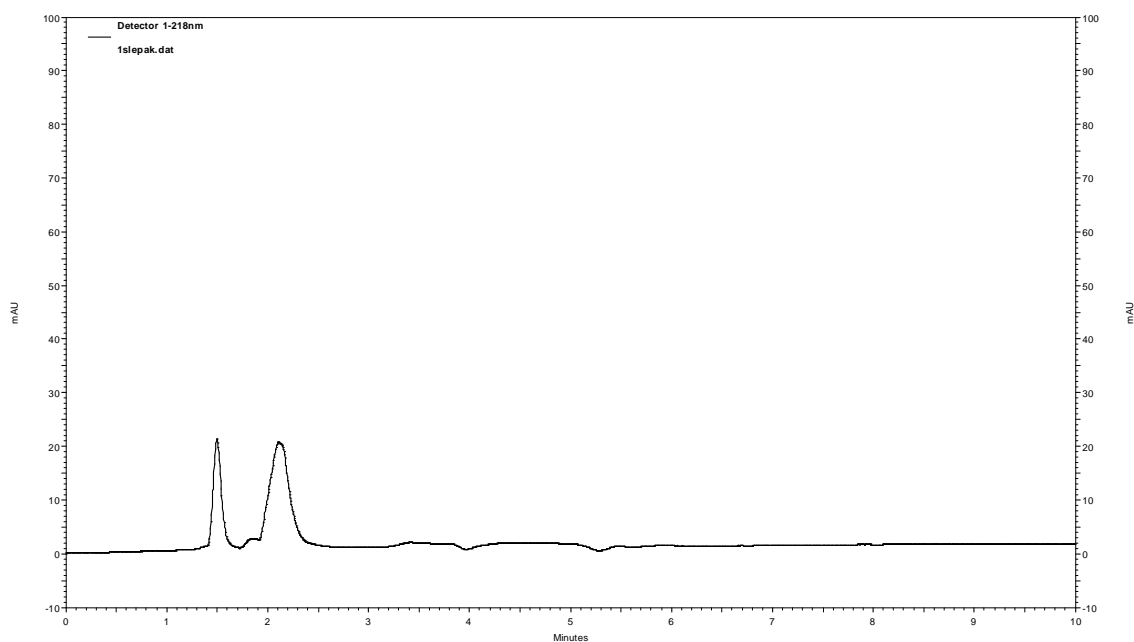
Pro třetí část diplomové práce byla k dispozici králičí plazma. Také zde byla při analýze k dispozici obě vlákna, carbowax i PDMS/DVB. Zůstaly zachovány podmínky pro dobu extrakce, tedy 20 minut.

Základní vzorek pro mikroextrakci byl připraven následovně: K 0,5 ml plazmy bylo přidáno 0,5 ml fenobarbitalu (standard 1 mg/ml methanolu) a po promíchání se vzorek naředil 10x vodou (tj. bylo přidáno 4,0 ml vody), tak byla docílena požadovaná koncentrace 0,1 mg/ml. Tento roztok měl naměřeno pH 7,5. Dále se již postup shodoval s postupem praktikovaným ve druhé části práce. Tudíž z připravené směsi bylo sorbováno na vlákno a poté byla provedena 20 minutová desorpce do zkumavky, ve které bylo 1,6 ml metanolu. Odebraných 0,8 ml bylo doplněno 0,2 ml ředěného pufru. Na kolonu bylo dávkováno opět 20 μ l desorpčního media.

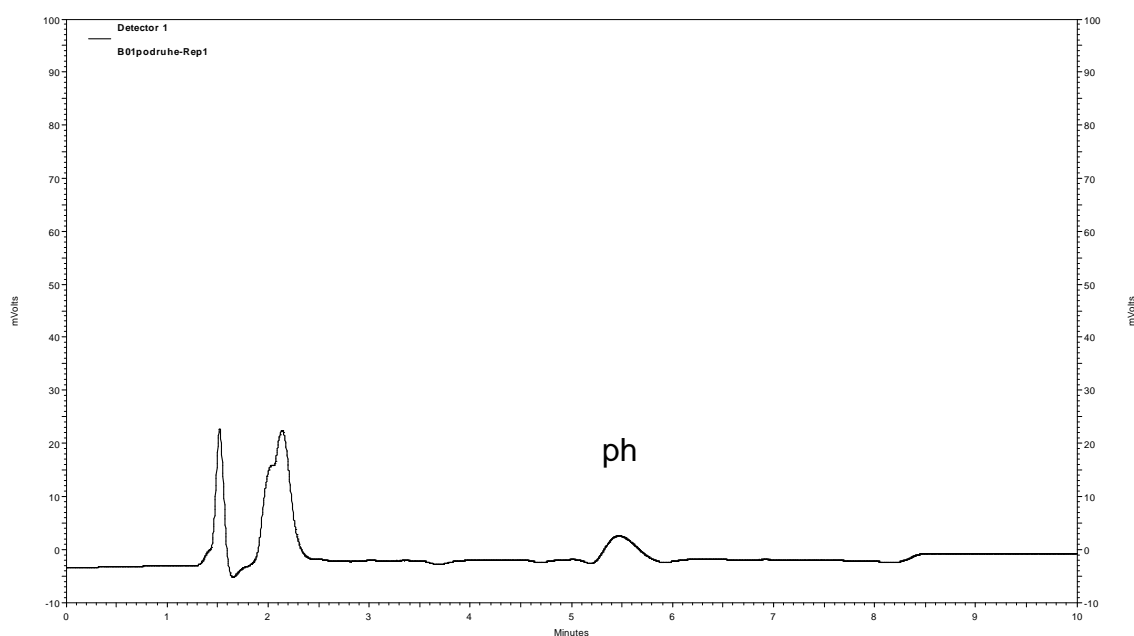
Nejdříve byla mikroextrakce léčiva provedena za použití vlákna carbowax. Analyzováno bylo stejně jako při mikroextrakci fenobarbitalu ze vzorku vody, na koloně Separon SCX C₁₈ (5 μ m). Retenční čas fenobarbitalu byl 5,5 minut a výtěžnost činila 0,72 %.

Ve druhém případě, tedy při mikroextrakci s využitím vlákna PDMS/DVB, se vyskytly problémy s kolonou a byla nutná její výměna. Byla použita kolona stejného typu, ale o jiné velikosti částic sorbentu, tedy skleněná kolona Separon SCX C₁₈ o velikosti částic 7 μ m. Po čase se ustálil retenční čas fenobarbitalu při 2,7 minutách. Výtěžnost mikroextrakce na vlákno PDMS/DVB činila 0,52 %.

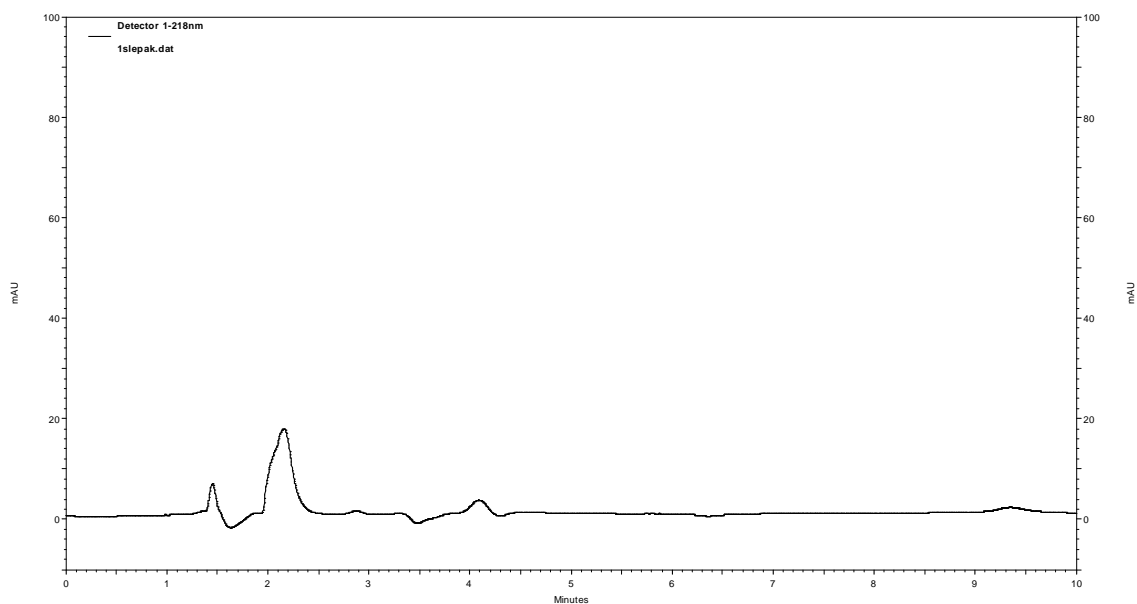
Dále uvedené obrázky 14-17 jsou záznamy chromatogramů pro porovnání rozdílů mezi vlákny carbowax a PDMS/DVB, včetně slepého vzorku pro oba typy vlákna.



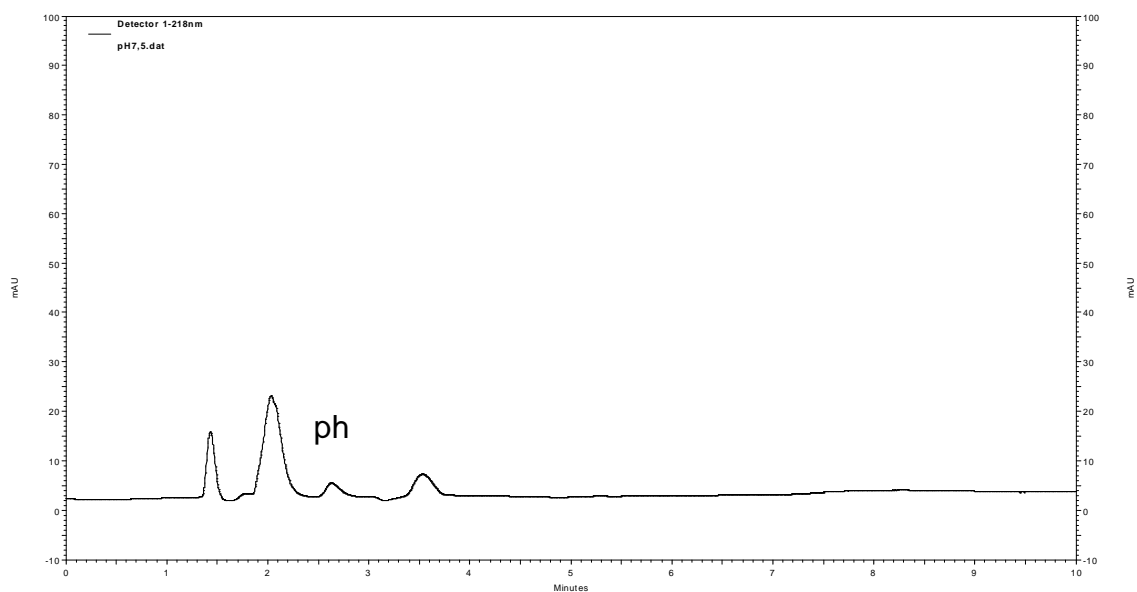
Obrázek 14: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku plazmy bez přidavku fenobarbitalu za užití vlákna carbowax. Chromatografické podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.1, kolona C₁₈, 5 μm.



Obrázek 15: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku plazmy s přidavkem fenobarbitalu za užití vlákna carbowax. Chromatografické podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.1, kolona C₁₈, 5 μm.



Obrázek 16: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku plazmy bez přídavku fenobarbitalu za užití vlákna PDMS/DVB. Chromatografické podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.1, kolona C₁₈, 7 μm.



Obrázek 17: HPLC záznam desorpčního media po mikroextrakci ze vzorku plazmy s přídavkem fenobarbitalu za užití vlákna PDMS/DVB. Chromatografické podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.1, kolona C₁₈, 7 μm.

Úprava pH vzorku a její vliv na výtěžnost

Opět byly zaznamenávány změny ve výsledcích při různých hodnotách pH. Jak již bylo výše uvedeno, bez úpravy byla u roztoku, ze kterého se extrahovalo léčivo, hodnota pH 7,5. Pro zvýšení kyselosti byla využita 0,6 % kyselina fosforečná a po kapkách byla přidávána k vzorku plazmy s fenobarbitalem, až bylo docíleno hodnot pH 7,0, pH 6,0, pH 5,0 a pH 4,0. SPME analýza probíhala na obou vláknech a srovnávala se výtěžnost.

U vlákna carbowax se sice s postupným snižováním pH výtěžek zvyšoval, ale nikdy nedosáhl vyšší hodnoty, než u roztoku bez úpravy pH, kdy byl sorbován znatelně největší podíl léčiva.

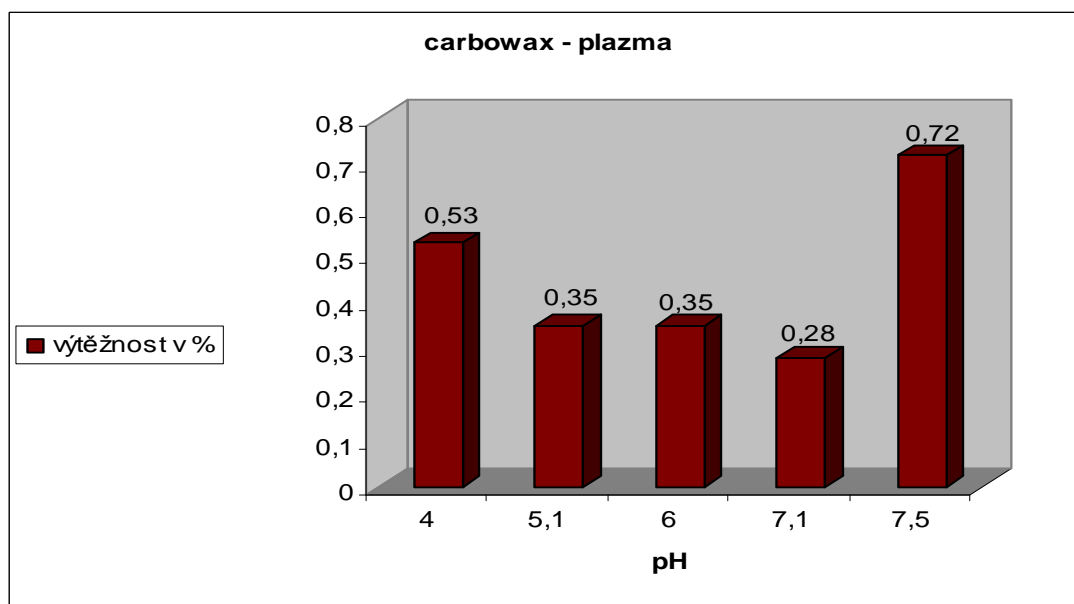
Naproti tomu výsledky při využití vlákna PDMS/DVB přinesly zjištění, že při okyselení na pH 6 byl výtěžek největší a sice 0,7 %, tedy více než při pH bez úpravy. Bohužel tvar píku fenobarbitalu, získaný ze vzorku po jeho okyselení, nebyl příliš uspokojivý. Vznikaly zde určité nesouměrnosti a dlouhé nástupy.

Grafy 2-3 na následujících stranách zobrazují procentuální výtěžnost při extrakci léčiva z králičí plazmy na vlákno carbowax a na vlákno PDMS/DVB při různých hodnotách pH po úpravách 0,6 % kyselinou fosforečnou. Pro vytvoření grafů potřebná data jsou uvedena v tabulkách 7-8.

Tabulka 7: Plochy píků pro jednotlivé hodnoty testovaného pH získané ze dvou analytických stanovení (SPME z plazmy, vlákno carbowax). Viz graf 2.

pH vzorku	plocha píku			výtěžnost [%]
	1. měření	2. měření	průměr	
4,0	57 001	56 927	56 964	0,53
5,1	39 933	35 811	37 872	0,35
6,0	39 391	35 040	37 216	0,35
7,1	31 738	28 564	30 151	0,28
7,5	76 989	76 499	76 744	0,72
<i>standard</i>	<i>14 284 766</i>	<i>12 470 416</i>	<i>13 377 591</i>	

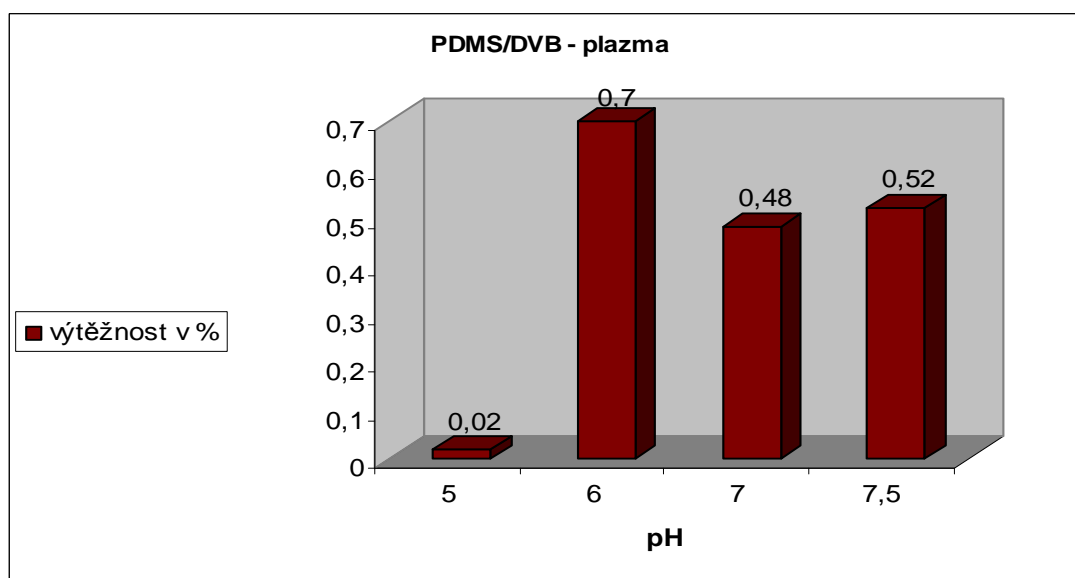
Graf 2: Procentuální výtěžnost léčiva metodou mikroextrakce z plazmy za použití vlákna carbowax při různých hodnotách pH. Viz tabulka 7.



Tabulka 8: Plochy píků pro jednotlivé hodnoty testovaného pH získané ze dvou analytických stanovení (SPME z plazmy, vlákno PDMS/DVB). Viz graf 3.

pH vzorku	plocha píku			výtěžnost [%]
	1. měření	2. měření	průměr	
5,0	2 583	2 465	2 524	0,02
6,0	66 512	85 235	75 873	0,7
7,0	46 562	59 633	53 098	0,48
7,5	79 586	35 142	57 364	0,52
<i>standard</i>	<i>13 735 311</i>	<i>13 828 279</i>	<i>13 735 295</i>	

Graf 3: Procentuální výtěžnost léčiva metodou mikroextrakce z plazmy za použití vlákna PDMS/DVB při různých hodnotách pH. Viz tabulka 8.



Při experimentech, které sledovaly optimální podmínky mikroextrakce léčiva z plazmy králíka, bylo docíleno těchto závěrů. Základní roztok se připraví smícháním 0,5 ml plazmy s 0,5 ml standardu fenobarbitalu o koncentraci 1,0 mg/ml a po důkladném protřepání se vzorek naředí vodou na objem 5,0 ml. Vzhledem k neostrým tvarům píků při nižších hodnotách pH je lepší ponechat pH bez úpravy, kde je pík souměrný a léčivo má poměrně vysokou výtěžnost, i když ne nejvyšší. V takto připraveném vzorku je provedena mikroextrakce na vlákno PDMS/DVB po dobu 20 minut a léčivo je z vlákna desorbováno stejně dlouho do zkumavky s 1,6 ml methanolu. Z něj je následně použita polovina, tedy 0,8 ml, která je doplněna pufrům na celkový objem 1ml. Pro analýzu je dávkováno na kolonu (C₁₈, 3,0 x 150 mm, velikost částic 7 μm) 20 μl desorpčního media.

5.4 KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ

Cílem této části práce bylo kvantifikovat fenobarbital obsažený ve vzorku králičí plazmy. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky.

Postup vypracování kalibrační křivky spočíval v tom, že ke vzorku 0,5 ml králičí plazmy byla přidávána různá množství standardu fenobarbitalu rozpuštěného v methanolu (dále SF) o koncentraci 10 mg/ml a směs byla doplňována vodou na objem 5 ml:

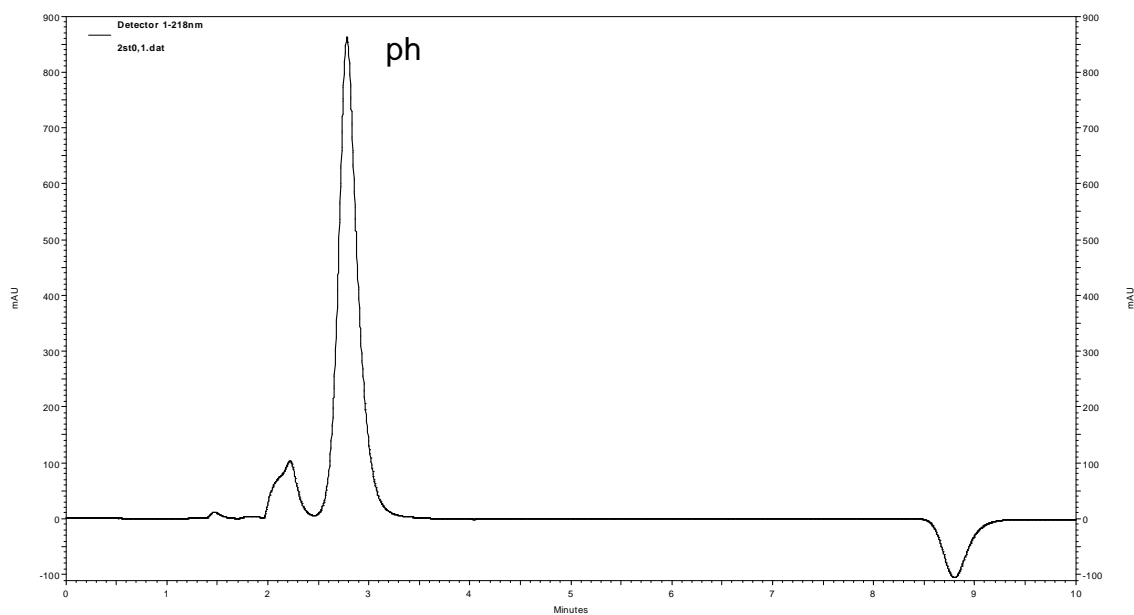
- 1) 0,5 ml plazmy + 25 μ l SF + 4,475 ml vody
- 2) 0,5 ml plazmy + 50 μ l SF + 4,45 ml vody
- 3) 0,5 ml plazmy + 100 μ l SF + 4,4 ml vody
- 4) 0,5 ml plazmy + 200 μ l SF + 4,3 ml vody

Takto připravené vzorky byly podrobeny procesu mikroextrakce. Složení vzorků včetně jejich výsledných koncentrací je uvedeno v tabulce 9. Parametry dalšího postupu jsou uvedeny v kapitole 5.3. Pro mikroextrakci bylo použito vlákno PDMS/DVB. Pro HPLC analýzu byla použita kolona Separon CGC, SCX C₁₈, parametry 3,0 x 150 mm, (částice o velikosti 7 μ m).

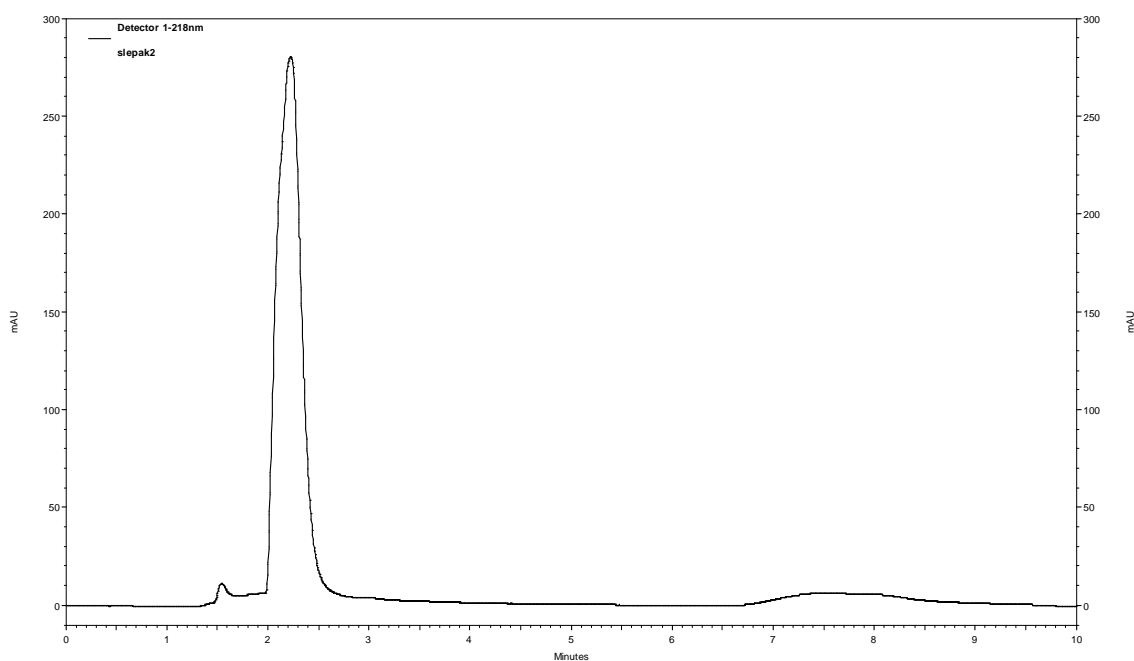
Tabulka 9: Složení a koncentrace vzorků pro sestavení kalibrační křivky

Obsah plazmy [ml]	Množství přidaného SF [μ l]	Obsah vody [ml]	Výsledná koncentrace léčiva [mg/ml]
0,5	25	4,475	0,05
0,5	50	4,45	0,1
0,5	100	4,4	0,2
0,5	200	4,3	0,4

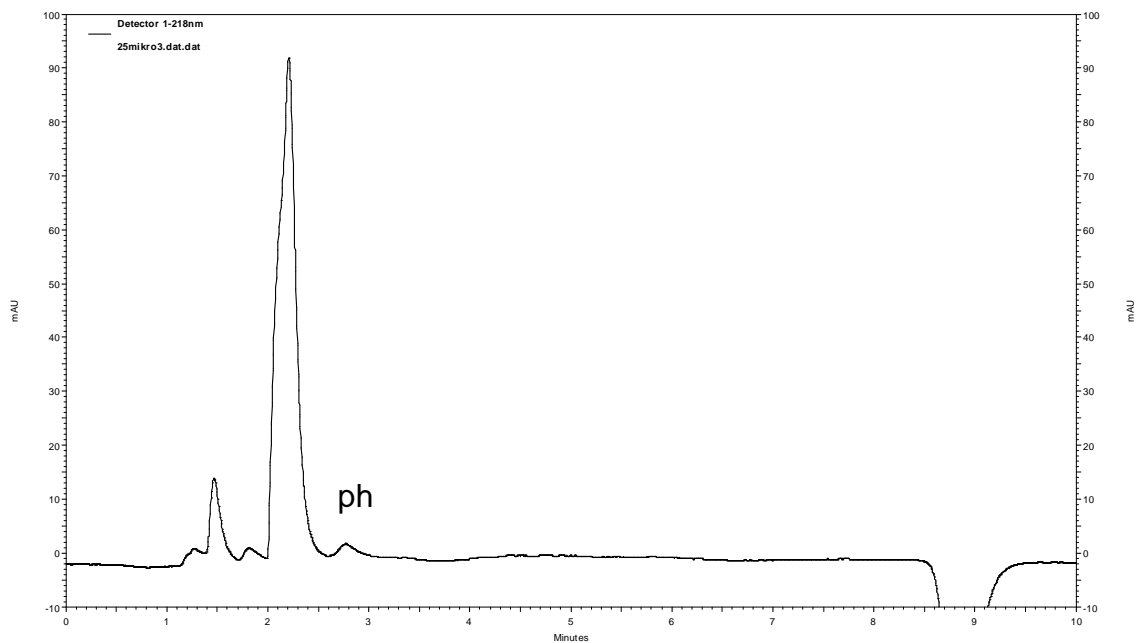
Obrázky 18-21 jsou ukázky získaných chromatogramů vzorků, které byly vyhodnocovány jako součást sestavení kalibrační křivky.



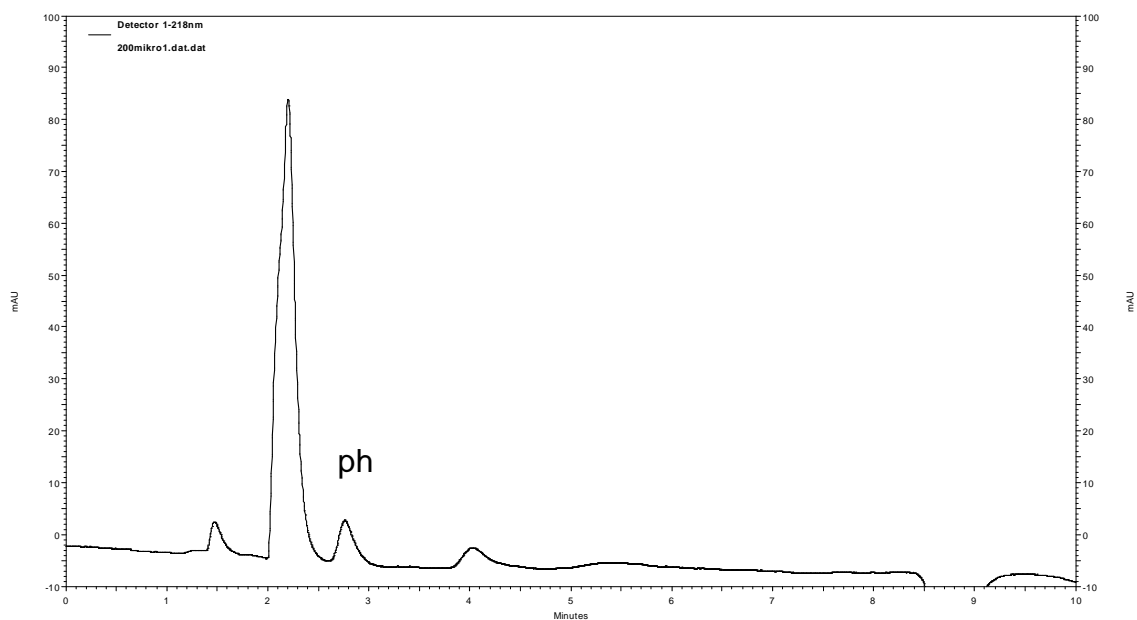
Obrázek 18: HPLC záznam standardu fenobarbitalu v rozpouštědle
($c = 0,1 \text{ mg/ml}$). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole
4.3.1., kolona C_{18} , $7 \mu\text{m}$.



Obrázek 19: HPLC chromatogram rozpouštědla standardu fenobarbitalu.
Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona
 C_{18} , $7 \mu\text{m}$.
(Obrázek je v porovnání s předchozími obrázky zvětšen).



Obrázek 20: HPLC záznam vzorku fenobarbitalu získaný po mikroextrakci z králičí plazmy s přidavkem fenobarbitalu za použití vlákna PDMS/DVB ($c = 0,05$ mg/ml). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C_{18} , $7 \mu\text{m}$.



Obrázek 21: HPLC záznam vzorku fenobarbitalu získaný po mikroextrakci z králičí plazmy s přidavkem fenobarbitalu za použití vlákna PDMS/DVB ($c = 0,4$ mg/ml). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.1., kolona C_{18} , $7 \mu\text{m}$.

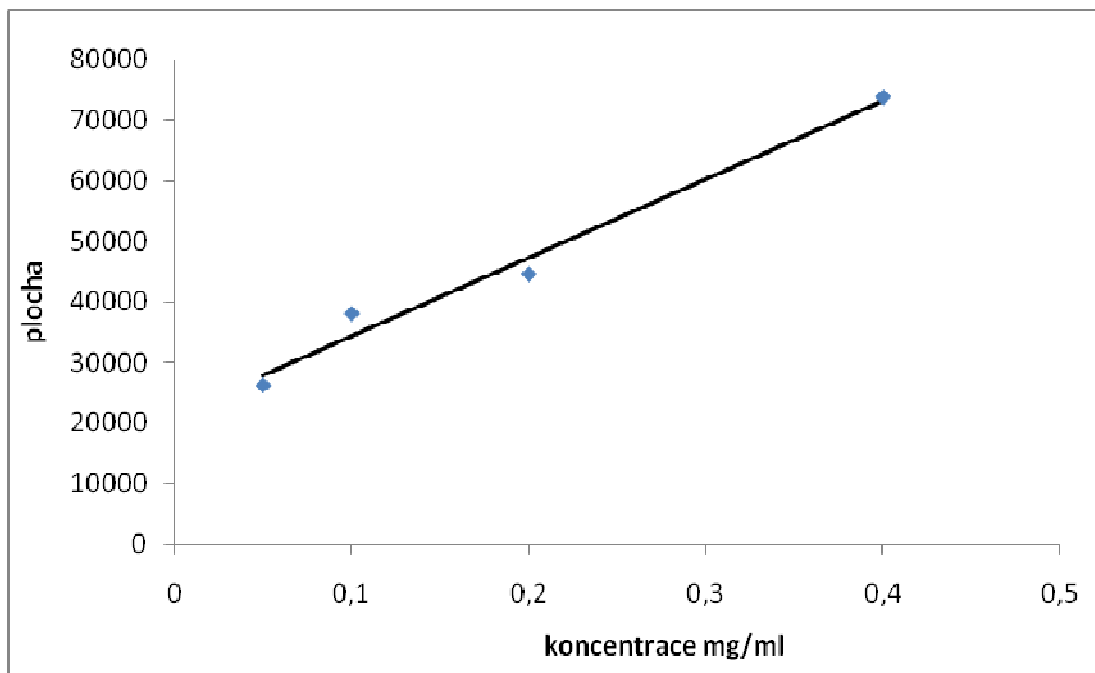
Kalibrační křivka (obrázek 22) je znázorněním grafu závislosti plochy píku izolovaného fenobarbitalu na koncentraci fenobarbitalu ve vzorku králičí plazmy. Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce 11, jde o průměrné hodnoty ze tří stanovení, které zobrazuje tabulka 10.

Tabulka 10: Plochy píků fenobarbitalu pro příslušné koncentrace

koncentrace fenobarbitalu [mg/ml]	0,05	0,1	0,2	0,4
plocha píku – 1. měření	27 571	35 770	40 136	77 172
plocha píku – 2. měření	24 366	36 810	47 604	70 460
plocha píku – 3. měření	26 573	41 589	45 985	73 900
průměrná plocha píku	26 170	38 056	44 575	73 844

Tabulka 11: Údaje k sestrojení kalibrační křivky

koncentrace fenobarbitalu [mg/ml]	0,05	0,1	0,2	0,4
průměrná plocha píku fenobarbitalu	26 170	38 056	44 575	73 844
směrodatná odchylka	±941	±2168	±1573	±314



Obrázek 22: Kalibrační křivka fenobarbitalu.

název osy x	název osy y
0,5	26170
1	38056
2	44575
4	73844

Regresní funkce : $y = kx + q$	
počet: bodů	n = 4
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek	
směrnice	k = 1,30E+4 ± 1,3E+3
absolutní člen	q = 2,13E+4 ± 3,0E+3
koeficient korelace	R = 0,990
reziduální odchylka	S _{rez} = 3,50E+3
Závislost y na x byla prokázána na hladině významnosti 0,01	

Tato kalibrační křivka má lineární průběh v rozsahu koncentrací 0,05 – 0,4 mg/ml plazmy. Rovnice přímky vzniklé regresní analýzou je:

$$y = 1300x + 2130$$

$$\text{koeficient korelace } r = 0,990$$

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala problematikou analytického hodnocení fenobarbitalu metodou mikroextrakce tuhými fázemi (SPME) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Byly nalezeny chromatografické podmínky pro hodnocení na reverzní fázi C₁₈. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 218 nm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs methanolu a fosfátového pufru, v poměru 50:50, pH mobilní fáze bylo 7,4. Průtok mobilní fáze kolonou byl 0,4 ml/min, množství dávkované látky 20 µl. Rozpouštědlo fenobarbitalu představovala směs methanolu a pufru v poměru 80:20.

Pro izolaci léčiva byla užitá metoda SPME, testována byla vlákna carbowax/TPR a PDMS/DVB. Stanovení podmínek proběhlo ve vodném roztoku léčiva. Pro postup bylo zvoleno vlákno carbowax/TPR. Doba extrakce byla 20 minut, zpětná desorpce probíhala do 1,6 ml methanolu. Výtěžnost činila 3,85 %.

Stejně podmínky byly aplikovány také pro izolaci fenobarbitalu z králičí plazmy. Byly využity oba typy vláken a sledován vliv úpravy pH vzorku plazmy na výtěžnost mikroextrakce. Jako vhodnější vlákno bylo zvoleno PDMS/DVB a extrahovaný fenobarbital byl analyzován na koloně Separon SCX C₁₈ (7 µm). Celková výtěžnost léčiva byla 0,52 %. Pro kvantitativní hodnocení fenobarbitalu v králičí plazmě byla vypracována kalibrační křivka.

7. LITERATURA

LITERATURA

- 1) Klíma J., Grafnetterová J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum Praha 1987
- 2) Klimeš J. a kol.: Kontrola chemických léčiv I, Karolinum Praha 2006
- 3) http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
(staženo: leden/2010)
- 4) <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>
(staženo: leden/2010)
- 5) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL Praha 1985
- 6) <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplcA.pdf>
(staženo: leden/2010)
- 7) Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada Praha 2009
- 8) Kodíček M., Chromatografie kapalinová vysoceúčinná, Biochemické pojmy: výkladový slovník [online], Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-01-04]
- 9) <http://www.hplc.cz/Teorie/autosamplers.html>
(staženo: únor/2010)
- 10) <http://www.directindustry.com/prod/shimadzu-europe/high-performance-liquid-chromatograph-hplc-system-25210-56987.html>
(staženo únor 2010)
- 11) SPME. Sigma Aldrich, Praha 1998
- 12) Ulrich S.: Solid-phase microextraction in biomedical analysis, J. Chromatogr. A, **902**, 167-194, 2000
- 13) Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie II, Karolinum Praha 1994
- 14) Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalýtika léků, Avicenum Praha 1990
- 15) Katzung B.G.: Základní a klinická farmakologie, H a H Praha 1994
- 16) Moriyama M., Yamashita S., Domoto H., Furuno K., Araki H., Gomita Y.: Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring, J. Chromatogr. B, **723**, 301-305, 1999
- 17) García-Borregón P. Fernández, Lores M., Cela R.: Analysis of barbiturates by micro-high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization, J. Chromatogr. A, **870**, 39-44, 2000

- 18) Iwai M., Hattori H., Arrinobu T., Ishii A., Kamazawa T., Noguchi H., Noguchi H., Suzuki O., Seno H.: Simultaneous determination of barbiturates in human biological fluids by direct immersion solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **806**, 65-73, 2004
- 19) Cantu M.D., Toso D.R., Lacerda C.A., Lancas F.M., Carrilho E., Queiroz M.E.: Optimization of solid-phase microextraction procedures for the determination of tricyclic antidepressants and anticonvulsants in plasma samples by liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem*, **386**, 256-263, 2006
- 20) Hall B.J., Brodbelt J.S.: Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **777**, 275-282, 1997