

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE  
A KONTROLY LÉČIV**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Způsoby detekce používané při HPLC analýzách léčiv  
v biologickém materiálu**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Chtěla bych vyjádřit svůj vděk vedoucímu mé bakalářské práce, RNDr. Milanu Mokrému, za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování i sepsání této bakalářské práce. Poděkování dále patří i celému kolektivu Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

<b>Obsah:</b>	
<b>1. Cíl práce</b>	<b>5</b>
<b>2. Úvod</b>	<b>6</b>
<b>3. Biologický materiál</b>	<b>7</b>
3.1 Krev	7
3.2 Krevní sérum	8
3.3 Plazma	8
3.4 Moč	8
3.5 Sliny	9
3.6 Mateřské mléko	9
3.7 Pot	9
3.8 Žaludeční obsah	9
<b>4. Úprava vzorku</b>	<b>10</b>
4.1 Deproteinace	10
4.2 Extrakce rozpouštědly	10
4.3 Extrakce pevnými fázemi	12
4.4 Moderní modifikace extrakčních metod	12
4.5 SPME (Solid phase microextraction)	12
<b>5. Instrumentace v HPLC</b>	<b>14</b>
5.1 Základní části kapalinového chromatografu	14
<b>6. Detektory v HPLC</b>	<b>15</b>
6.1 Dělení detektorů	15
6.2 Požadavky na detektory	16
6.3 Refraktometrická detekce	17
6.4 Spektrofotometrická detekce	19
6.4.1 UV-VIS detektory	19
6.4.2 Infračervené detektory	22
6.5 Fluorescenční detekce	22
6.6 Chemiluminiscenční detekce	25
6.7 Elektrochemická detekce	26
6.8 Hmotnostní spektrometrie	30
6.9 Detektory radioaktivity	37
6.10 Nukleární magnetická rezonance	37
6.11 Moderní univerzální detektory	37

6.11.1 Evaporative Light Scattering Detector	37
6.11.2 Charged Aerosol Detector	38
6.11.3 Nano Quantity Detector	38
<b>7. Nalezení chromatografických podmínek pro stanovení amisulpridu v plazmě</b>	<b>40</b>
7.1 Amisulprid	40
7.2 Experiment	41
7.2.1 Instrumentace	41
7.2.2 Chemikálie	41
7.2.3 Standardní roztoky	42
7.2.4 Mobilní fáze	43
7.2.5 Vnitřní standard	43
7.2.6 Příprava vzorku	43
7.3 Výsledky	44
7.3.1 Mobilní fáze	44
7.3.2 Vnitřní standard	45
7.3.3 Příprava vzorku	45
7.4 Diskuze	47
<b>8. Literatura</b>	<b>48</b>

## **1. Cíl práce**

Cílem práce je vypracovat stručný přehled detekčních metod, které můžeme použít při analýze léčiv v biologických materiálech, jako jsou krev, moč, plazma a sérum, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie („high performance liquid chromatography“ - HPLC). V praktické části jsme našli vhodné chromatografické podmínky pro stanovení atypického antipsychotika amisulpridu v plazmě.

## 2. Úvod

HPLC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je v současné době hojně využívaná separační a analytická technika. Jedná se o kapalinovou chromatografii v kolonovém uspořádání, kde separace probíhá při vysokém tlaku a tedy rychlejším průtoku mobilní fáze.

Za použití různých typů detektorů (např. refraktometrické, ultrafialové, fluorescenční, elektrochemické) nebo tandemového spojení s hmotnostní spektrometrií, různých separačních principů (rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelově permeační chromatografie), různých modů uspořádání (normální fáze, reverzní fáze) a různých kolon (náplňové kolony, monolytické kolony z různých materiálů) se tato technika využívá v analytické chemii, biologickém, biochemickém a biomedicínském výzkumu, kontrole čistoty léčiv, ve farmaceutickém výzkumu při farmakokinetických a toxikologických studiích, potravinářské analýze, monitorování životního prostředí, v klinickobiochemických laboratořích pro terapeutické monitorování hladin léčiv v různých biologických materiálech (plazma, sérum, plná krev, moč, mozkomíšni mok...), ve forenzních toxikologických laboratořích a mnoha dalších oborech.

Máme v úmyslu se soustředit na stanovení léčiv v biologickém materiálu. To je v současné době nutnost jednak pro výzkumníka, který při testování léčiva musí poznat jeho průnik do různých kompartmentů organismu, rychlost eliminace a v neposlední řadě musí také odhalit a identifikovat jednotlivé metabolity a včas odhalit jejich případnou toxicitu. Důležité je to i pro lékaře, který potřebuje po podání léku udržovat jeho hladinu v terapeutickém rozmezí a v případě potřeby upravit dávkování.

Detekčních metod vhodných pro HPLC, které lze k tomuto účelu použít je v současnosti nepřehledné množství, jsou stále vylepšovány a vznikají jejich nové modifikace.

### 3. Biologický materiál

Biologický materiál, biomatrice, je složitý systém obsahující širokou škálu různých látek o různé molekulové hmotnosti. Při volbě biologického materiálu k analytickému vyšetření musíme zohlednit metodické možnosti (snadný a bezpečný odběr dostatečného množství, přístrojové vybavení), a sledovaný cíl (jestli se v daném biologickém materiálu nachází sledované léčivo, jak bude jeho stanovení ovlivněno dalšími složkami biomatrice).<sup>1</sup>

Technika zpracování biologického materiálu je tím snazší, čím více je materiál tekutý a složkově jednoduchý. V tomto směru vhodnost materiálu můžeme seřadit v následujícím pořadí: mozkomíšní mok, slzy, pot, sliny, moč, žluč, plazma, sérum, krev, stolice. Nejzpracovávanějšími materiály jsou však krev a její složky a moč. Jejich výhoda spočívá hlavně zejména v relativně snadném odběru a také v tom, že ve většině případů se v nich může vyskytovat hledaná látka (na rozdíl od např. mozkomíšního moku, do nějž většina léčiv přes hematoencefalickou bariéru vůbec neproniká).<sup>1</sup>

Přímé zpracování vyšetřovaného materiálu je u řady metod možné, avšak u komplikovanějších systémů, jako například u krve je obtížné a v důsledku řady interferenčních vlivů i málo spolehlivé. Často proto musíme použít různé izolační techniky.<sup>1</sup>

#### 3.1 Krev

Krev tvoří nejsložitější soustavu. Obsahuje jednak pevné složky – krevní buňky, a jednak plazmu a v ní rozpuštěné látky – anorganické ionty, plazmatické bílkoviny, xenobiotika a jejich metabolity.

Pevné složky, krvinky, jsou součástí intracelulárního systému, který se nachází v rovnovážném stavu s okolním extracelulárním systémem. Při změnách v okolí může dojít k difúzi složek intracelulárního obsahu krvinek do extracelulárního systému (ionty, plyny apod.). Porušením membrány krvinek v důsledku lýzy nebo ptýzy dochází k totálnímu vyplavení intracelulárního obsahu (především hemoglobinu, iontů, některých bílkovin a enzymů). Abychom zabránili hemolýze, musíme při zpracování nativní krve používat izotonické ředící roztoky. Vliv může mít i teplota a mechanické poškození.

Velký důraz se klade na správný odběr krve, protože už ten podmiňuje spolehlivost a použitelnost analýzy.

Krev můžeme odebírat z vény, kapiláry nebo méně často z arterie. Dále ji můžeme zpracovávat pro získání jejích derivátů – plazmy a séra.<sup>1</sup>

### **3.2 Krevní sérum**

Krev se stáním sráží a dělí se na krevní koláč a sérum. Tento děj probíhá asi 1 až 2 hodiny. Ve skleněných nádobách dochází ke srážení rychleji, v plastových pomaleji. Srážení lze urychlit například ve zkumavce s kuličkami nebo se zdrsňeným vnitřním povrchem.

Vysráženou krev odstředíme, čímž dojde ke zřetelnému oddělení séra od krevního koláče. Po té je nutno sérum odsát tak, aby nedošlo k opětovnému promísení s krevním koláčem.<sup>1</sup>

Sérum bývá čistší než plazma a neobsahuje plazmatické koagulační faktory.

### **3.3 Plazma**

Krev určená k přípravě plazmy se odebírá do nádoby s antikoagulačním činidlem (heparin, soli EDTA, citrát sodný). Přidáním antikoagulačních prostředků nedojde k přeměně fibrinogenu na fibrin a tím ani ke vzniku krevního koláče. Plazma se snadněji oddělí centrifugací od krevních elementů a objemový zisk vzorku je proti séru větší.

Při vlastní analýze si musíme ověřit, jestli antikoagulační přísady nebo jejich kationty neinterferují při dané reakci.<sup>1</sup>

### **3.4 Moč**

Pro monitorování lékové terapie často není moč příliš vhodná, ale má velký význam pro toxikologický screening. Její velkou výhodou je snadná dostupnost. Hodně může vypovídat o metabolismu xenobiotik.

Většina endogenních látek přítomných v moči je dobře rozpustná ve vodě. Léky, pokud nejsou vázány jako konjugáty, patří zpravidla k méně polárním látkám a mohou být snadno extrahovány organickými rozpouštědly. Stejný stav nastane i po hydrolýze polárních lékových konjugátů.

Velkým problémem při analýze moči je její objem, který se může významně lišit v závislosti od množství a způsobu konzumace různých nápojů a běžných přípravků působících diureticky. Prakticky je proto obtížné z analýzy časově nekontrolovaně odebraného vzorku moči provádět kvantitativní přepočty.



Moč má také variabilní pH, rovněž závislé na příjmu potravy a léků. Z těchto důvodů se klade zvláštní důraz na sběr moči.<sup>1</sup>

### **3.5 Sliny**

Většina léčiv přechází difuzí do slin, kde je jejich hladina v určité korelaci s plazmatickou koncentrací především nevázaného podílu. Průnik do slin je značně ovlivněn rozpustností a ionizovatelností léčiva v krvi.

Hlavní předností stanovení látek ve slinách je snadná dostupnost a jednoduchost získání materiálu, na druhé straně lze odebrat vždy jen malý objem. Další nevýhoda spočívá v tom, že korelace mezi koncentrací v plazmě a ve slinách byla prokázána jen u některých léčiv a u některých byla naopak vyvrácena.

Použití sliny lze při sledování lékových hladin u dětí, kde injekční odběr může působit obtíže, a u forenzních vyšetření, kde okamžitý odběr krve nebo moči může narážet na překážky. Sliny by mohly mít své klady při řadě orientačních vyšetření v bioanalytice léků, ale jejich použití dosud příliš rozšířené není.<sup>1</sup>

### **3.6 Mateřské mléko**

Mateřské mléko se stalo předmětem sledování lékových hladin hlavně v současné době, kdy se na kojení klade velký důraz. Je proto nezbytné vědět, do jaké míry je které léčivo přijímáno při kojení. Neméně důležité je i stanovení podílu léčiva volného a biologicky neaktivního, které je vázané na bílkoviny.<sup>1</sup>

### **3.7 Pot**

Využití potu naráží na potíže při odběru materiálu a kvantitativním vyjádření výsledků.<sup>1</sup>

### **3.8 Žaludeční obsah**

Žaludeční obsah patří mezi poměrně složité systémy pro analýzu. Uplatnění nachází ve forenzní toxikologii.<sup>1</sup>

## **4. Úprava vzorku**

Pro některé analytické metody je vhodné vzorek biologického materiálu před vlastní analýzou upravit. V HPLC tím můžeme například předejít poškození kolony nastříknutím vzorku, který obsahuje příliš velké částice, také můžeme vzorek přečistit a zakoncentrovat vlastní analyt.

### **4.1 Deproteinace**

Prvním stupněm zpracování biologického vzorku pro další analytický postup je odstranění přítomných bílkovin, které mohou interferovat při vlastním stanovení.

Při deproteinaci musíme přihlídnout k tomu, že část daného léčiva může být ve formě volné a část vázaná na bílkoviny.

Deproteinace biologického materiálu pro potřeby monitorování lékových hladin musí splňovat několik podmínek. Odstraní se všechny proteiny, i o malé molekulové hmotnosti, precipitát nesmí na svůj povrch adsorbovat sledované léčivo a deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo, ovlivňovat další pracovní postupy (extrakce apod.) a ani jinak ovlivňovat analytickou výtěžnost.

Odstranění proteinů lze provádět několika postupy, například precipitací srážecími činidly, denaturací pomocí enzymů nebo ultrafiltrací na membránách.

Precipitaci lze provést solemi (síran amonný), kyselinami (kyselina trichloroctová, metafosforečná, chlorovodíková), sloučeninami těžkých kovů (síran zinečnatý, hydroxid litný, wolframan sodný, chlorid rtuťnatý, chlorid hlinitý), organickými rozpouštědly (ethanol, acetonitril, methanol, aceton).

Při použití ultrafiltrace na polopropustné membráně zůstává vázaná složka léčiva společně s proteiny na stejné straně membrány a membránou prošlý ultrafiltrát obsahuje jen volnou složku. To, jak velké molekuly budou membránou zadržovány, záleží na velikosti pórů semipermeabilní membrány.<sup>1</sup>

### **4.2 Extrakce rozpouštědly**

Extrakce mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami, tzv. liquid-liquid extrakce (LLE) je velmi rozšířený způsob úpravy vzorku biomatrice. Biologické vzorky – např. krev a její deriváty, moč, bývají na bázi vody a většina léků je spíše lipofilní povahy. Proto obvykle snadno přecházejí do lipofilnějšího

organického rozpouštědla.

Extrakční proces závisí na fyzikálně chemických vlastnostech rozpouštědla, pH vodné fáze, vzájemném poměru fází, způsobu a době trvání extrakce a způsobu předchozího zpracování vzorku.

Při volbě rozpouštědla dbáme na již zmiňovanou lipofilitu nebo hydrofilitu analytu, a také na to, aby se rozpouštědlo co nejméně mísilo s vodou a aby s ní nereagovalo. Rozpouštědlo nesmí reagovat ani s extrahovanou látkou a interferovat se zvoleným detekčním systémem (aceton absorbuje v UV oblasti). Pokud se má extrakt odpařovat, což je obvyklé, volíme rozpouštědlo těkavější. Jako nejuniverzálnější pro široké spektrum léků se jeví chloroform nebo diethylether. Obě tato rozpouštědla mají však i své nevýhody (výbušnost, jedovaté výpary) a nelze je proto jednoznačně preferovat. Použitá extrakční činidla by měla být samozřejmě co nečistší.

Úpravou pH vodné fáze dosahujeme vyšší selektivity extrakce. Obecně lze říci, že při nižším pH se méně disocijují a tudíž lépe extrahují látky kyselého charakteru. Naopak při vyšším pH snáze přecházejí do extrakčního činidla látky bazické. Do organické fáze totiž přechází látka v neionizované formě. Vhodné pH lze tudíž vypočítat z disociační konstanty látky pomocí Hendersonovy-Hasselbachovy rovnice.

Správně zvoleným poměrem vodné a organické fáze zlepšujeme extrahovatelnost látky a zpracovatelnost reakční směsi. Větším množstvím organického rozpouštědla dosáhneme vyššího výtěžku extrakce. Zároveň se snižuje možnost tvorby emulzí. Na druhé straně větší objem rozpouštědla přináší někdy problémy, jako je nižší koncentrace extrahované látky v extraktu nebo obtížnější odběr organické fáze ze směsi.

Intenzita extrakce a doba třepání musí být natolik účinná, aby přechod látky do rozpouštědla byl co nejúplnější.

Předchozí zpracování vzorku může výrazně ovlivnit výtěžek extrakce. Především při deproteinaci může působit nepříznivě změna pH vodné fáze vlivem deproteinačního činidla. Extrahovaná látka se také může adsorbovat na precipitované proteiny. Na druhé straně vhodný způsob deproteinace zvýší výtěžnost procesu u těch látek, které mají vyšší vazbu bílkoviny.<sup>1</sup>

### **4.3 Extrakce pevnými fázemi**

Takzvaná solid phase extraction (SPE) je v současnosti častěji používaná alternativa k LLE. Jejími výhodami jsou rychlé a snadné provedení, malá spotřeba rozpouštědel a také menší zátěž pro životní prostředí, protože se při této metodě nepoužívají organická rozpouštědla s jedovatými výpary a nevzniká např. chlorovaný odpad. Další výhodou je předčištění analyzovaného vzorku a možnost automatizace.

V podstatě jde o různé modifikace sloupcové nebo tenkovrstvé chromatografie. Porézní sorbent může mít různé fyzikálně chemické vlastnosti.

K polárním sorbentům patří oxid hlinitý, oxidy hořčíku, silikagel, křemelina. Mezi nepolární sorbenty řadíme živočišné uhlí, celulózy, polystyreny. Asi nejširší použití mají sorbenty s modifikovanými fázemi, jako nepolární C-18 (oktadecyl) nebo C-8 (oktyl).<sup>1</sup>

### **4.4 Moderní modifikace extrakčních metod**

V současnosti se rozvíjí nové extrakční metody, které sice v principu vycházejí z těch klasických, ale mají oproti nim některé výhody.

Jednou takovou metodou je superkritická fluidní extrakce, což je modifikace LLE, při níž se jako rozpouštědlo používá odolný plyn uvedený do superkritického stavu. Tato metoda je použitelná pouze pro látky snášející extrémní podmínky (25 – 200 °C, 7 – 60 MPa). Její výhodou je vysoká účinnost a malá spotřeba rozpouštědel.

Modifikací SPE je metoda molecular imprinting polymers (MIP), při níž si vytváříme speciální kolonu selektivně zachycující analyt.<sup>2</sup>

### **4.5 SPME (Solid phase microextraction)**

SPME vznikla na počátku devadesátých let. Jedná se o extrakci na pevných fázích, která využívá vlákno z taveného křemene obalené stacionární fází, na kterou se adsorbuje analyt, nebo kolonku z taveného křemene.

Rozeznáváme dvě techniky extrakce analytu, při použití první, tzv. Headspace SPME, je vlákno vystaveno parám rozpouštědla, při použití druhé, direct immersion SPME, je vlákno přímo omýváno kapalným vzorkem. Výhodami SPME je relativní jednoduchost, nízká cena, rychlé zakoncentrování a rychlá extrakce analytu ve srovnání s jinými extrakčními metodami. Kromě

toho ji lze přímo napojit na HPLC a proces zautomatizovat. Použití této techniky pro HPLC je limitováno špatnou stabilitou vláken v některých organických rozpouštědlech.

Důležité je zvolit vlákno ze správného materiálu v závislosti na chemické povaze analytu.

Existují dva způsoby vymývání adsorbovaného analytu, jejich použití závisí na interakci mezi analytem a vláknem. Pokud je analyt navázán slabě, můžeme použít dynamickou desorpci, při níž je analyt vymyt proudem mobilní fáze. Pokud je však analyt navázán silně, je vhodnější použít statickou desorpci, při níž je po určitý čas máčeno v rozpouštědle.<sup>5</sup>

## 5. Instrumentace v HPLC

První popisy zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou kolonovou chromatografii se datují z roku 1967. Principy a možnosti kolonové chromatografie byly známy již dříve, ale teprve moderní instrumentace umožnila podstatný rozvoj této chromatografické disciplíny. Když bylo dosaženo reprodukovatelným průtoků mobilní fáze procházející kolonou i pod tlakem několika desítek MPa a když byly vyvinuty citlivé detektory s vnitřním objemem průtokové cely menším než 10 nebo 15  $\mu\text{l}$  a připraveny náplně kolon s definovanými vlastnostmi a velmi malými rozměry částic, bylo teprve možné mluvit o vysokorychlostní či vysokoúčinné kapalinové chromatografii, neboť právě uvedené parametry jsou pro existenci a rozvoj této metody limitující.<sup>3</sup>

### 5.1 Základní části kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci.

Blokové schéma moderního kapalinového chromatografu může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno určité pořadí základních elementů, což jsou zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, zařízení pro dávkování vzorku, kolona, detektor a zapisovací zařízení (v dnešní době obvykle počítač.

Mobilní fáze je (při izokratické eluci) vedena buď z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla, anebo (při gradientové eluci) se přiváděné proudy z více zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném před nebo za čerpadlem. Podle druhu čerpadla (jež může být pulsní nebo bezpulsní) je zařazen do toku mobilní fáze tlumič tlakových rázů, z něhož je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony. Kolona je spojena přímo s detektorem, z něhož může být výstup do sběrače frakcí. Z detektoru jde signál do zapisovacího zařízení nebo počítače.

Vliv mrtvých prostorů musí být omezen na minimum, protože jinak dochází k rozšiřování elučních křivek nad únosnou míru, čímž zanikají výhody vysokotlakých kolon. Proto se i spoje mezi nástřikovým zařízením a kolonou a mezi detektorem a kolonou konstruují tak, aby mrtvé objemy byly co nejmenší.<sup>3</sup>

## 6. Detektory v HPLC

Vyhodnocování výsledků dělení směsi látek v kolonách může probíhat analýzou jednotlivých frakcí. I když nám tento způsob může poskytnout jinak nedostupné specifické informace, je relativně pomalý a používá se jen ve výjimečných případech, ne při běžném monitorování léčiv.

Nejrozšířenější je automatický záznam průběhu separačního procesu pomocí detektorů vyvolávajících elektrický signál, jehož intenzita je úměrná koncentraci sledované látky v roztoku. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu, signál se zesílí a přivede do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. Tímto způsobem lze získat i kvantitativní informace.

K detekci látek lze u kapalinové chromatografie využít všechny vlastnosti sledovaných látek, kterými se liší od vlastní mobilní fáze.<sup>3,4</sup>

### 6.1 Dělení detektorů

Detektory používané v HPLC můžeme rozdělit podle několika kritérií.

Podle selektivity rozlišujeme detektory univerzální a selektivní, které se liší svým použitím podle toho, jestli chceme stanovovat jen určitou látku, nebo řadu látek s různou chemickou strukturou vedle sebe.<sup>3</sup>

K selektivním typům detekce náleží spektrofotometre v ultrafialové, viditelné i infračervené oblasti. Druhá skupina zahrnuje neselektivní detektory založené na měření indexu lomu, elektrolytické vodivosti nebo relativní permitivity.<sup>4</sup>

Rozdělení detektorů na diferenciální a integrální nemá praktický význam poněvadž převážná většina komerčně dodávaných detektorů poskytuje diferenciální záznam, z něhož se lépe určují retenční charakteristiky, a současně elektronický integrátor poskytuje integrální údaje nutné ke kvantitativnímu vyhodnocování chromatogramů.<sup>3</sup>

Naopak z praxe vychází dělení na destrukční a nedestrukční detektory. U destrukčních detektorů se chromatografovaná látka rozloží (např. spálí) a nelze ji izolovat, kdežto nedestrukční detektory umožňují jímání jednotlivých frakcí nebo další analýzu pomocí jiného detektoru. V sestavě několika detektorů tedy řadíme destrukční detektor vždy nakonec. Příkladem destrukčního detekce je v současnosti oblíbená hmotnostní spektrometrie.<sup>2,3</sup>

Dále se detektory rozdělují podle okamžité odezvy, která je buď závislá na

rychlosti přívodu mobilní fáze se separovanou složkou do detektoru (koncentrační typ), nebo nezávisí na rychlosti ani změně toku mobilní fáze (hmotnostní typ).<sup>3</sup>

Nejčastějším kritériem, podle něhož se detektory dělí do skupin, jsou měřené veličiny.

Mezi detektory využívající optické metody patří třeba refraktometrický, pracující na základě měření indexu lomu, spektrofotometrický, pracující na základě měření absorpce záření v ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti nebo fluorimetrický, pracující na základě měření fluorescence.

Mezi detektory využívající elektroanalytické metody řadíme detektory polarografické, potenciometrické nebo konduktometrické.

Na základě měření radioaktivity pracuje detektor radiometrický.

Další využívané veličiny mohou být například sorpční teplo (mikroadsorpční detektor), ionizační proud (transportní plamenoionizační detektor).

K detekci se využívá i řada dalších instrumentálních technik, např. spojení kapalinové chromatografie s atomovým absorpčním spektrometrem nebo spojení s hmotnostním spektrometrem.<sup>3</sup>

V poslední době se ujalo dělit detektory na dvojrozměrné a trojrozměrné. Výstupem z trojrozměrného detektoru je běžný chromatogram, tedy graf závislosti velikosti odezvy na retenčním čase nebo objemu. Graf, který je výstupem z trojrozměrného detektoru má navíc třetí osu odrážející další veličinu (např. vlnovou délku u spektrofotometrického detektoru využívajícího diodové pole).

## **6.2 Požadavky na detektory**

Na dobrý detektor vhodný pro HPLC se kladou zejména tyto požadavky:

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku
- možnost užít gradientovou eluci<sup>3,4</sup>



### Linearita odezvy

linearita odezvy detektoru znamená přímou úměrnost hodnot odezvy detektoru v závislosti na koncentraci separované složky.

Jako oblast linearity označujeme interval, v němž odchylka od linearity nepřesahuje 2 – 3 %.<sup>3,4</sup>

### Citlivost

citlivostí detektoru se rozumí velikost změny odezvy na změnu koncentrace sledované látky.

Citlivost souvisí s detekční mezí, což je minimální detekovatelné množství látky. Je dáno nejmenším množstvím látky, které detektor prokazatelně zaznamená, přesněji řečeno, u něhož se signál rovná alespoň dvojnásobné hodnotě šumu detektoru.<sup>3,4</sup>

### Citlivost ke změnám

Důležitým parametrem. Který sledujeme zejména při kvantitativním vyhodnocování chromatogramů, je reprodukovatelnost odezvy detektoru.<sup>3,4</sup>

### Mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón

Aby nedošlo ke zbytečnému rozšiřování elučních zón a tím k rozmývání chromatografických píků, u všech detektorů se požaduje, aby mrtvý objem mezi koncem kolony a průtokovou celou byl co nejmenší a aby byl co nejmenší i objem detekční cely. Zde je potřeba zvolit kompromis mezi citlivostí přístroje, která s rostoucím objemem detektoru stoupá, a rozlišením, které naopak klesá.<sup>3,4</sup>

## **6.3 Refraktometrická detekce**

V kolonové chromatografii se už desítky let využívá detekce na základě měření indexu lomu eluátu. Pokud jako detektor použijeme diferenciální refraktometr, měříme celkový index lomu analyzované látky i rozpouštědla. Rozdíl mezi indexem lomu analytu a mobilní fáze by měl tudíž být co největší, jinak je záporně ovlivněna citlivost detektoru.<sup>3</sup>

Hlavní výhodou refraktometrického detektoru je jeho univerzálnost, lze jej

tedy použít i například pokud stanovovaná látka neabsorbuje v UV spektru. Naopak nevýhodou je poměrně nízká citlivost (o dva až tři řády menší než u UV detektoru) a velké ovlivnění teplotou (tolerance 0,001 °C), vycházející ze závislosti indexu lomu na teplotě, a také to, že nelze použít gradientovou eluci. Měřící cela refraktometru proto musí být zasazena do termostatu.<sup>3,4</sup>

Rozeznáváme dva konstrukční principy refraktometrických detektorů. Jedním je Fresnelův typ refraktometru, který pracuje na principu Fresnelova zákona. Měříme jím světlo odražené na rozhraní sklo-kapalina v závislosti na úhlu dopadu a indexu lomu. Světlo prochází stejným způsobem měrnou i referenční celou a rozdíl záření dopadajícího na dva fotoelektrické články z obou cel udává koncentraci složek. Objem měřících cel se může pohybovat od 4 do 10  $\mu\text{l}$ . Mez detekce je asi  $4 \cdot 10^{-7}$  jednotek indexu lomu, což by mělo umožňovat detekci látek přítomných v koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Tento typ je o něco méně citlivý než výhylkový detektor.<sup>3,4</sup>

U druhého typu, výhylkového refraktometru, se paprsek vycházející z přístroje odrazí na polopropustném zrcadle ve směru měřící cely. Měrná a referenční cela jsou vedle sebe, odděleny tenkou destičkou z křemenného skla. Obě cely jsou opatřeny přítokem a odtokem mobilní fáze. Po průchodu oběma celami se paprsek odrazí stejnou cestou zpět, což znamená, že se opět lomí. Po průchodu polopropustným zrcadlem se odrazí na hraně zrcadlového hranolu do dvou spárovaných fotočlánků. Pomocí skleněné destičky se nastaví nula tak, aby při stejném složení kapaliny v měrné i srovnávací cela dopadal na oba články stejný zářivý tok. Přítomnost analytu v měrné cele se projeví výhylkou paprsku dopadajícího na zrcadlový hranol a tedy nestejnému osvětlení článků. Citlivost tohoto detektoru je asi o řád vyšší než detektoru Fresnelova typu.<sup>3</sup>

Refraktometrická detekce má ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii spíše historický význam, i v současnosti ji však lze použít pro stanovení koncentrace některých léků v biologických materiálech. Příkladem může být stanovení treosulfanu v plazmě a moči. Treosulfan se podává ve velkých dávkách, nevdí tudíž nižší citlivost detektoru.<sup>6</sup>

## 6.4 Spektrofotometrická detekce

### 6.4.1 UV-VIS detektory

Spektrofotometrický detektor je asi nejpoužívanější v HPLC anýze léčiv v biologickém materiálu a v kapalinové chromatografii obecně. Existují detektory pracující v ultrafialové, viditelné i infračervené oblasti spektra. Nejčastěji se používá UV detektor, pro barevné látky lze použít analogický způsob detekce využívající absorpci viditelného světla. Lze je použít, protože většina rozpouštědel často používaných jako mobilní fáze v kapalinové chromatografii záření v těchto vlnových délkách neabsorbují a neruší tak signál analytu.<sup>3</sup>

Spektrofotometrické metody se vyznačují relativně velkou selektivitou a citlivostí, navíc na ně nemají příliš velký vliv změny teploty a rychlosti toku mobilní fáze. Vzhledem k tomu, že máme k dispozici celou řadu neabsorbujících rozpouštědel různé polarity, velmi dobře se hodí i pro gradientovou eluci. Jejich další výhodou je, že jejich pořizovací cena není v současnosti ve srovnání s jinými typy detektorů příliš vysoká.<sup>3,4</sup>

Fotometrické detektory pracují na principu měření absorbance záření o určité vlnové délce při průchodu zóny obsahující analyt průtokovou měrnou celou. Existují jednodušší detektory s fixní vlnovou délkou například 214, 254 nebo 280 nm (253,7 nm – rtuťová výbojka) nebo složitější spektrofotometrické detektory s proměnnou vlnovou délkou, nastavitelnou pomocí optického filtru (několik různých vlnových délek) nebo pomocí monochromátoru (jakákoliv vlnová délka v UV-VIS oblasti). Výhoda těch druhých spočívá v možnosti nastavení takové vlnové délky, v níž stanovovaná látka maximálně absorbuje.<sup>3,7</sup>

Rozeznáváme dvoupaprskové přístroje, u nichž je světelný tok rozštěpen polopropustným zrcadlem na dva. Jeden prochází referenční kyvetou a druhý měrnou celou s analytem. Světlo, které projde kyvetami je zachyceno fotočlánky a signál z nich je veden do zesilovače. Tímto způsobem lze zvýšit citlivost detekce a vyloučit vliv některých rozpouštědel.<sup>4</sup>

Při konstrukci průtokových cel je třeba dojít ke kompromisu mezi citlivostí a rozlišením přístroje. Citlivost roste s rostoucím objemem cely a také s délkou optické dráhy procházejícího paprsku záření, při velkém mimokolonovém objemu ovšem dochází k rozmývání píků a zhoršuje se rozlišení. Objem průtokových cel pro fotometrické detektory proto obvykle nepřesahuje 10  $\mu$ l a jejich délka bývá kolem 10 mm. Problém s délkou dráhy paprsku je možno řešit

například konstrukcí cely tvaru Z. Při délce optické dráhy 10 mm lze dokázat  $10^8 - 10^{12}$  g látky. Eluční zóna, která obsahuje analyzovanou složku vycházející z kolony nemá mít větší objem než 1000  $\mu$ l. V každém případě platí, že mrtvý objem mezi koncem kolony a průtokovou celou by měl být co nejmenší, na což je třeba brát zřetel i při řazení více detektorů za sebe.<sup>3,4</sup>

Aby látka absorbovala záření ve vlnových délkách odpovídajícím UV nebo viditelné oblasti spektra, musí její molekula obsahovat charakteristickou skupinu atomů – chromofor. Chromofor lze do látky vnést dodatečně derivatizací, tedy reakcí s derivatizačním činidlem, která může proběhnout při zpracování vzorku před nástřikem na kolonu nebo on column. Díky tomu můžeme UV detektor použít při stanovení většiny léků.

Kromě běžně používaných monochromatických spektrofotometrických detektorů existují i tří dimenzionální spektrofotometrické detektory, které snímají absorbanci v celém spektru. Výstupem je potom trojrozměrný graf, na jehož třetí osu (kromě retenčního času a absorbance) se vynáší vlnová délka. Tyto detektory jsou mnohem méně selektivní než klasické monochromatické. Kvalitativní informaci o analytu nám zde poskytuje kromě retenčního času ještě absorpční spektrum látky. Jedná se o UV-VIS detektory využívající diodového pole (photodiode-array, PDA) a rychle skenující UV-VIS detektory (high-speed scanning UV-VIS detector).<sup>2</sup>

PDA detektor obsahuje kromě zdroje světla (deuteriová lampa pro UV spektrum a wolframová lampa pro viditelné světlo) disperzní zařízení. Paprsek obsahující všechny vlnové délky prochází vzorkem a každá vlnová délka se absorbuje v závislosti na analytu. Zeslabené záření prochází přes holografickou mřížku a dopadá na diodové pole. Každá fotodioda registruje jen záření o určité vlnové délce.<sup>2</sup>

Rychle skenující detektor postupně vrhá všechny vlnové délky na jednu fotodiodu.<sup>2</sup>

Jen od začátku roku 2008 byla publikována řada prací, v nichž se využívá HPLC s UV detekcí k monitorování hladin léků v biologických materiálech. Lze ji použít například ke kvantitativní analýze daptomycinu, nového cyklického lipopeptidového antibiotika, v lidské plazmě. Vzorek byl upraven pouze deproteinací a byla použita vlnová délka 224 nm.<sup>8</sup> Z antibiotik lze fotometrickou detekci použít také při monitorování plazmatických hladin  $\beta$ -laktamů, konkrétně

třeba cefepimu, ceftazidimu, cefuroximu, meropenemu, piperacilinu, detekovatelných mezi 200 a 400 nm.<sup>9</sup> Jiná studie uvádí stanovení imipenemu, meropenemu a ertapenemu (všechno karbapenemy, řadíme tedy mezi  $\beta$ -laktamy) při 298 nm s využitím gradientové eluce.<sup>10</sup> Balofloxacin v plazmě lze stanovit kapalinovou chromatografií s UV detekcí při 295 nm.<sup>11</sup>

Další publikované použití je stanovení antiepileptika nové generace levetiracetamu v deproteinované plazmě při 205 nm.<sup>12</sup> Jiné antiepileptikum, lamotrigin, bylo stanoveno společně s primidonem, fenobarbitalem, fenytoinem, karbamazepinem a dvěma aktivními metabolity 2-fenyl-2-ethylmalonamidem (PEMA) a 10,11-dihydro-10,11-epoxykarbamazepinem při 220 nm.<sup>13</sup>

Kvantitativní analýzu lamotriginu v plné krvi lze provést pomocí on line SPE extrakce a analyt detekovat při 260 nm.<sup>14</sup>

V Číně vypracovali metodu stanovení antipsychotik amitryptilinu, clomipraminu a thioridazinu v moči pomocí HPLC s UV detekcí při 238 nm.<sup>15</sup> Nové antipsychotikum stanovitelné pomocí kapalinové chromatografie s fotometrickou detekcí je aripiprazol.<sup>16</sup>

Diazepam a jeho hlavní metabolit *N*-desmethyldiazepam lze stanovit například rychlou metodou SPE extrakce a následnou HPLC analýzou s UV detekcí. Detekční mez se pohybuje kolem 1  $\mu\text{g/l}$ .<sup>17</sup> Jiná studie hovoří o stanovení benzodiazepinů v plazmě po SPE extrakci a s detekcí při 220 nm.<sup>18</sup>

Plazmatickou hladinu antidepresiva trazodonu a jeho hlavního metabolitu 3-(1-chlorfenyl)piperazinu je možné monitorovat za užití UV detektoru při 255 nm.<sup>19</sup>

Spektrofotometrický detektor lze použít také při HPLC analýze nesteroidních antirevmatik flurbiprofenu a ketoprofenu v plazmě. Jedná se o chirální analýzu za použití předkolumnové derivatizace.<sup>20</sup>

UV detekcí je možné detekovat i analgetika tramadol a paracetamol.<sup>21</sup>

Rovněž oseltamivir-karboxylovou kyselinu, která je účinnou složkou léku proti chřipce, v lidském séru, lze stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. Analyt byl extrahován na SPE kolonce a detekován při 215 nm.<sup>22</sup>

Dalším léčivem, které je možné stanovit v plazmě pomocí HPLC s UV detekcí je amilorid.<sup>23</sup>

V Egyptě byla dokonce vyvinuta metoda stanovení metronidazolu a

spiramycinu ve svalech ryb, založená na kapalinové chromatografii s UV detekcí.<sup>24</sup>

#### **6.4.2 Infračervené detektory**

Při využití infračervené části spektra nastává úplně jiná situace, protože v této oblasti absorbuje většina rozpouštědel. Lze ovšem snímat spektrum v celém rozsahu a využít ho k identifikaci jednotlivých eluovaných zón. Tento typ detekce je relativně málo citlivý.<sup>3</sup>

Ve větší míře lze infračervenou spektrofotometrii použít ke studiu vodných roztoků. Při použití techniky, která proměřuje celé spektrum můžeme někdy přímo identifikovat neznámou látku.<sup>4</sup>

Pro monitorování hladin léků v biologických materiálech není tedy infračervená spektrofotometrie příliš vhodná, používá se v kontrole čistoty lékových přípravků jako jeden z možných způsobů identifikace neznámé znečišťující látky. Toto využití se v současnosti v publikovaných člancích objevuje třeba jako identifikace nečistot v solích klindamycinu (antibiotikum)<sup>25</sup>, lékových formách olanzapinu<sup>26</sup>, hydrobromidu citalopramu<sup>27</sup>, lopinaviru, což je inhibitor HIV proteázy<sup>28</sup>, bicalutamidu, léčiva užívaného v terapii rakoviny prostaty.<sup>29</sup>

#### **6.5 Fluorescenční detekce**

Dostatečnou citlivost pro zachycení léčiva v biologickém materiálu v jeho terapeutické koncentraci mají často detektory využívající luminiscenci látek.

O luminiscenci mluvíme, když je látka schopná po předchozí absorpci energie emitovat záření o energii o něco nižší. Pokud emitované záření vzniklo z chemické energie při určité chemické reakci, proces se nazývá chemiluminiscence. Pokud je budící energie absorbována z primárního záření, hovoříme o fotoluminiscenci. Sekundární (emitované) záření má nižší energii a tedy větší vlnovou délku než záření primární. Rozeznáváme fluorescenci, což je emise sekundárního záření po dobu  $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  sekundy, a fosforescenci, což je emise sekundárního záření trvající  $10^{-2}$  sekundy až několik dnů. Sloučeniny, které jsou schopny fluoreskovat (obsahují skupinu atomů zvanou luminofor) lze tedy detekovat fluorescenčními detektory. Spodní mez detekce může být až  $10^{-9}$  g/ml. Léčiva s přirozenou fluorescencí lze pomocí fluorimetrie detekovat při

mnohem nižších koncentracích, než je potřeba ke spektrofotometrické detekci. Fluorimetrie byla jednou z prvních metod umožňujících monitorování terapeutické koncentrace léků.<sup>4,7</sup>

Fluorescenční, nebo též fluorimetrický detektor je velmi selektivní. Příliš nezávisí na kolísání teploty a vyznačuje se dobrou linearitou. Z těchto důvodů patří v současnosti mezi velmi často používané detektory.<sup>3</sup>

Eluovaná látka prochází průtokovou celou detektoru, absorbuje UV záření ze zdroje a emituje sekundární záření, které dopadá na fotonásobič a mění se na elektrický signál. Násobičem by mělo být zachyceno co největší množství emitovaného záření, ale při tom by čidlo mělo být chráněno před primární zářením. Toho můžeme docílit například vhodnou kombinací filtrů a také tím, že sekundární záření snímáme ve směru kolmém na směr primárního.<sup>3</sup>

Existují různé konfigurační typy fluorimetrických detektorů. Jeden z možných systémů je, že je excitační i emisní část osazena filtry. Ve druhém typu jsou v excitační i emisní části použity monochromátory a ve třetím typu je excitační část tvořena monochromátorem a emisní osazena filtry. V HPLC se dosáhne kompromisu mezi selektivitou a citlivostí, když se použije třetí typ detektoru. Kombinace dvou monochromátorů umožňuje proměření celého emisního i excitačního spektra. Zdroje světla lze použít zinkové, rtuťové nebo kadmiové, které produkují záření o úzkém rozmezí vlnových délek, anebo xenonové a deuteriové výbojky a wolframové žárovky, vyzařující široké spektrum. Volba vhodného zdroje záření a nastavení optimální excitační i emisní vlnové délky je pro fluorescenční detekci klíčová.<sup>7</sup>

Moderní modifikace fluorescenčních detektorů jsou tzv. LIF (laser-induced fluorescence), kde se jako budící záření používá laserový paprsek.

Pro stanovení léčiv, jejichž terapeutická koncentrace leží mimo detekční rozmezí spektrofotometrické detekce, avšak nemají ve své molekule luminofor je vhodné použít derivatizaci, která povede ke spojení s fluorescenční látkou. Derivatizace může být předkolonová nebo postkolonová. Při použití předkolonové derivatizace mohou vzniknout arteficiální derivatizační produkty, rušící chromatografický záznam. U postkolonové derivatizace je méně ovlivňována hodnota fluorescence pozadí. Užívané postkolonové reaktory pracují na principu průtokových zařízení. K potížím může dojít, pokud je potřebné reakční činidlo nekompatibilní s nevhodnější mobilní fází. Obvykle

nemůžeme použít gradientovou eluci, protože složení mobilní fáze má vliv na reakční kinetiku derivatizační reakce. Vhodným reaktorem pro postkolonovou derivatizaci může být fotolytický reaktor, pracující s látkami, které účinkem světla přecházejí ve fluorescenční (např. transformace cannabinolu na fenantren). Pro ostatní derivatizace lze použít řadu derivatizačních činidel. Například dansylchlorid se využívá k reakci se sekundárními aminy a aromatickými a heterocyklickými jádry, což slouží např. k detekci barbiturátů. Dealkylační reakce s 2-naftyl-chloroformatem umožňuje detekci látek s terciární aminoskupinou. Esterifikační reakce s fenacylem nebo naftacylem se používá k derivatizaci karboxylových skupin.<sup>7</sup>

V současnosti je publikována řada článků hovořících o využití fluorescenční detekce v HPLC stanovení koncentrací léků v biologických materiálech. Jedním z nich je třeba stereoselektivní analýza carvedilolu, antagonisty  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\alpha_1$  adrenergických receptorů, v plazmě a moči po chirální derivatizaci. Byl použit fluorescenční detektor nastavený na excitační vlnovou délku 285 nm a emisní vlnovou délku 680 nm. Kvantifikační limity byly 0,25 ng/ml pro S-carvedilol v plazmě a 0,05 ng/ml pro R-carvedilol v plazmě a oba enantiomery v moči.<sup>30</sup>

Další publikované použití HPLC s fluorescenční detekcí je stanovení doxorubicinu v jádrech nádorových buněk.<sup>31</sup> Jiné léčivo užívané v terapii nádorů detekovatelné pomocí fluorescenčního detektoru je CZ48 a jeho aktivní metabolit, což je inhibitor topoizomeráz účinkující proti řadě zhoubných nádorů. Byla vypracována HPLC metoda jeho stanovení v myší plazmě. Excitační a emisní vlnová délka detekce byla 380 a 418 nm.<sup>32</sup>

Fluorescenčně lze detekovat i heparin a heparansulfát,<sup>33</sup> dále například vitamin K<sub>1</sub> v plazmě.<sup>34</sup>

RP-HPLC s fluorescenční detekcí byla použita pro zjištění intracelulární koncentrace emodinu v lidských intestinálních Caco-2 buňkách (studie vlivu antrachinonů na vstřebávání emodinu)<sup>35</sup>.

Jiné popsané použití kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem je stanovení mofetil mycofenolátu, léčiva podávaného pacientům se systémovým lupus erythematosus. Protože farmakokinetika léku u těchto pacientů může být odlišná od zdravých, je nutné terapeutické monitorování.<sup>36</sup>

HPLC metoda s fluorescenční detekcí při 299 nm (excitační vlnová délka) a



396 nm (emisní vlnová délka) s dolním limitem kvantifikace 2,5 ng/ml byla vyvinuta pro stanovení inhibitoru HIV integrázy, raltegraviru, v plazmě.<sup>37</sup>

Pomocí fluorescenční detekce lze dále sledovat plazmatické hladiny léčiv užívaných v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Taková léčiva, stanovitelná vedle sebe, jsou například chlortalidon, valsartan a fluvastatin. Obdobně lze k jejich stanovení použít i UV detekci.<sup>38</sup>

Stejně jako UV detektor i fluorescenční detektor se používá při chromatografickém stanovení plazmatických koncentrací některých antibiotik. Patří mezi ně širokospektré antibiotikum ofloxacin, které lze detekovat při excitační vlnové délce 532 nm a emisní 533 nm.<sup>39</sup> Širokospektré antimykotikum vorikonazol lze za použití HPLC s fluorescenční detekcí stanovit v plazmě a ve slinách při excitační a emisní vlnové délce 254 a 372 nm.<sup>40</sup>

Bylo popsáno i stanovení H<sub>2</sub> antagonisty ranitidinu v králičí plazmě pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.<sup>41</sup>

## 6.6 Chemiluminiscenční detekce

Pro potřeby stanovení nízkých koncentrací léčiv v tělních tekutinách lze využít i fosforescenci a chemiluminiscenci. Hlavní potíž spočívala v získání fosforescence při pokojové teplotě, existují však postupy, které tento problém řeší.<sup>7</sup>

Vzhledem k potřebě stále citlivějších, ale přitom relativně levných detektorů, vzrůstá důležitost chemiluminiscenční detekce ve forenzní, farmaceutické a biomedicínské analýze.

Jako jedna z nejefektivnějších metod pro stanovení velmi malých množství analytů se ukázala peroxyoxalátová chemiluminiscence. V peroxyoxalátovém chemiluminiscenčním systému reagují oxaláty nebo oxamidy s peroxidem vodíku za přítomnosti luminoforu a emitují záření.<sup>42</sup> Za použití tohoto systému byla vypracována metoda kvantitativní analýzy doxorubicinu a jeho metabolitu doxorubicinolu v krysí plazmě. Metoda je založena na fotosenzitivní reakci, při níž vzniká peroxid vodíku. Ten byl detekován po smísení s aryloxalátem.<sup>43</sup>

Chemiluminiscenční metoda byla vypracována například pro stanovení amidaronu a desetylamidaronu v séru. Metoda je založena na postkolonové fotolýze analytů na produkty, které jsou aktivní v tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(III) [Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>] chemiluminiscenčním systému. Detekční limity analytů v séru byly

0,02 a 0,11  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>44</sup>

S komplexem tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) reaguje chemiluminiscencí atypické antipsychotikum quetiapin. Lze jej tedy stanovit za použití HPLC s chemiluminiscenční detekcí v moči a séru.<sup>45</sup>

Pro antibiotikum ofloxacin lze použít chemiluminiscenční detekci na základě jeho schopnosti emitovat záření v prostředí dusičnanu sodného po zavedení stálého elektrického proudu. Díky tomu mohla být vyvinuta metoda stanovení ofloxacinu v séru pomocí HPLC s přímou chemiluminiscenční detekcí.<sup>46</sup>

Pro detekci některých léčiv se také často používá fluorescenční a chemiluminiscenční značení molekuly. Důležitým krokem je v těchto případech volba vhodného reakčního činidla. Žádoucí vlastnosti mají benzodiazolové deriváty, protože samotné činidlo nevykazuje fluorescenci a značená molekula pak silně fluoreskuje. 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole reaguje s aminokyselinami a biogenními aminy. Produkty jsou citlivě detekovatelné peroxyoxalátovým chemiluminiscenčním systémem.<sup>42</sup>

## 6.7 Elektrochemická detekce

Elektrochemické detektory žívané ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou průtokové detektory, které měří množství protékajících nábojů buď na principu změny vodivosti nebo změny náboje.<sup>7</sup>

Elektrochemické principy lze využít ke kvantitativní i kvalitativní detekci řady látek, i v malých koncentracích  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  mol/l.<sup>3</sup>

Nevýhodou omezující použití elektrochemických detektorů pro terapeutické monitorování léků je horší stabilita elektrod a tedy zhoršená reprodukovatelnost výsledků při rutinním stanovení. Proto nachází elektrochemická detekce uplatnění spíše ve výzkumných laboratořích při provádění speciálních aplikací daných studií snadno elektrochemicky detekovatelných léků.<sup>7</sup>

Elektrochemické detektory pracují na základě dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na fázovém rozhraní mezi elektrodou a roztokem. Jejich podstatou jsou vztahy mezi elektrickými veličinami a koncentrací sledované složky. Vliv ostatních závislých veličin se eliminuje např. udržováním na konstantní nebo nulové hodnotě.

Nejčastěji se využívá elektrochemická reakce redoxního systému a při měření je elektrochemický článek buď v termodynamicky rovnovážném stavu

(potenciometrie), nebo v kinetickém stavu, při němž probíhá článkem proud a jedním směrem probíhá elektrolýza.

Podmínky při měření se upravují tak, že se příslušná veličina měří za konstantního proudu nebo konstantního potenciálu pracovní elektrody. U některých detektorů se koncentrace detekované složky uvnitř měřicí cely nemění (polarografie, voltametrie), u jiných se veškeré množství látky v měrném prostoru změní v jinou formu (např. do vyššího oxidačního stupně), jak je tomu třeba u coulometrického detektoru. Pro zvýšení citlivosti detekce lze použít i princip pulsní polarografie.

Úprava známých elektrochemických principů pro podmínky kapalinové chromatografie není jednoduchá. Hlavní pozornost musíme věnovat konstrukci průtokových cel detektoru, umístění elektrod v průtočném systému, jejich tvaru a materiálu, z něhož jsou vyrobeny.<sup>3</sup>

Objem eluátu zobrazených chromatografických píků při HPLC separaci je zřídka menší než 100  $\mu\text{l}$ . Chromatografický detektor by měl mít co nejmenší objem cely, abychom dosáhli co nejvěrnějšího zobrazení koncentrací eluovaných látek. Vhodné řešení může být geometrie cel na principu tenké vrstvy roztoku. Výhodou těchto elektrod je kromě možnosti sledovat i píky s malým objemem i jejich snadné čištění a případná výměna. Elektrody mohou být ke směru proudící mobilní fáze umístěny paralelně nebo v sérii.<sup>7</sup>

Dobrou funkci elektrochemického detektoru určuje především konstrukce elektrod. Povrch elektrod by měl být chemicky a fyzikálně inertní k protékající mobilní fázi při zvoleném napěťovém zatížení.

Jsou využívány tři druhy elektrod – elektrody z uhlíkatého skla, uhlíkové elektrody a rtuťové elektrody.

Elektrody z uhlíkatého skla jsou nejodolnější. Jsou odolné ke všem běžně užívaným mobilním fázím a snesou široký rozsah napěťového zatížení.

Grafitové elektrody jsou s výhodou užívány ke stanovení oxidovatelných látek.

Rtuťové elektrody jsou odolné při vysoké hodnotě negativního potenciálu, ale jejich použití při kladném napětí je omezené. Slouží ke stanovení těžko redukovatelných látek.

Látky stanovené pomocí elektrochemického detektoru můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin a to na látky, které se stanovují oxidací a které se

stanovují redukci. Mezi látky, které se stanovují oxidací patří fenolické substance (hydrochinony, katecholy,  $\alpha$ -metyldopa), aromatické aminy, sulfhydrylové a merkaptonové sloučeniny, nikotinamidnukleotid a heterocyklická léčiva (např. antidepresiva typu fenothiazinů a imipraminu). Redukci můžeme stanovit velké množství přírodních a syntetických látek – vitamin K<sub>1</sub>, chinony, řada klinicky užívaných antibiotik a cytostatik, léčiva obsahující nitro- a nitroso-skupiny.

Z léčiv, stanovitelných pomocí elektrochemického detektoru jsou vypracovány metody pro stanovení analgetik, antibiotik, cytostatik,  $\beta$ -blokátorů, levodopy a jejích derivátů, tricyklických antidepresiv, neuroleptik a dalších.

Cesta, jak vyřešit aplikační spektrum látek vhodných pro elektrochemické stanovení, je jejich derivatizace. Elektrochemicky neutrální látky lze chemicky spojit s látkami oxidovatelnými nebo redukovatelnými. Byly vypracovány metody, ve kterých bylo použito buď předkoloňové, nebo postkoloňové derivatizační techniky.

Při vývoji metod umožňujících elektrochemickou detekci mohou být využity enzymatické, esterázové a oxigenázové systémy. Elektrochemicky je např. snadno stanovitelný volný fenol, který se enzymatickou cestou uvolňuje z konjugovaných léčiv.<sup>7</sup>

V současnosti se rozvíjí výroba a použití elektrod s aktivními povrchy z nanomateriálů. Příklad takových elektrod, které mohou být součástí detekčních systémů pro HPLC jsou elektrody s modifikovaným povrchem z uhlíkových "nanotub". Jednou z hlavních vlastností, díky které je tento materiál vhodný pro elektroanalytické metody, je jeho schopnost poskytovat elektron pro elektrochemickou reakci. Jednoduchý způsob výroby takové elektrody spočívá v navázání malého množství této látky na skleněnou elektrodu.<sup>47</sup>

### Coulometrie

Coulometrický detektor pracuje na principu měření náboje při konstantních podmínkách v nádobce, kterou protéká eluát. Umožňuje detekovat látky schopné oxidace nebo redukce. Z organických látek je tedy možné stanovit především ty, které ve své struktuře obsahují halogeny, fenoly, karboxylové, aminové a aldehydové skupiny.<sup>7</sup>

Coulometrický detektor existuje i v uspořádání Coul-Array, v němž je jeho

výstupem trojrozměrný chromatogram.

### Amperometrie

Detektory pracující na principu kontrolované potenciální amperometrie mají poměrně dobrou detekční citlivost. Umožňují stanovit  $5 \cdot 10^{-9}$  až  $5 \cdot 10^{-13}$  g/l látky. Účinnost tohoto elektrochemického děje se blíží jedné, takže není nutné detektor pro kvantitativní měření kalibrovat a výsledky analýzy nejsou ovlivněny změnami rychlosti průtoku a změnami teploty.<sup>7</sup>

### Potenciometrie a polarografie

Potenciometrické detektory měří rozdíly potenciálů elektrod. Vyvinula se i technika iontově selektivních elektrod. Citlivá sulfidová elektroda umožňuje zachytit ionty v koncentracích až  $10^{-17}$  mol/l a není citlivá na řadu jiných iontů. Pro průtokové mikrokyvety byla rovněž miniaturizována a přizpůsobena přístrojová technika polarografických detektorů.<sup>4</sup>

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) je možné použít pro paralelní stanovení artesunatu a amodiachinu. Tato kombinace účinných látek se doporučuje pro léčbu infekce, kterou způsobilo *falciparum malariae*. Pro stanovení těchto látek v lidské plazmě byla vypracována metoda využívající HPLC s detekcí na základě redukce analytů. Jako měrná byla použita skleněná uhlíková elektroda a jako referenční elektroda argentochloridová.<sup>48</sup> Pro detekci antimalarik na základě přírodních látek artemisininů jako je artesunat se v současnosti prosazuje spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS), elektrometrická detekce se však ve většině parametrů MS vyrovná. Její jedinou nevýhodou je asi desetkrát vyšší spotřeba biologického materiálu.<sup>49</sup>

Z antibiotik můžeme pomocí HPLC-ECD stanovit azitromycin,<sup>50</sup> či klaritromycin v plazmě<sup>51</sup> nebo linkomycin v různých biologických materiálech – moč, mléko, med. Pro detekci linkomycinu byla použita „preanodized screen-printed carbon electrode“ (SPCE), která spojuje výhodu jednoduchého použití s nízkou cenou.<sup>52</sup>

Při výrobě elektrod pro elektrochemické detektory je možné použít i moderní materiály s vysokou vodivostí jako jsou fullereny. Pyrolytická uhlíková elektroda

modifikovaná fullerenem C<sub>60</sub> byla úspěšně testovaná pro stanovení syntetického steroidu dexamethasonu v komerčně dostupných farmaceutických přípravcích a v plazmě.<sup>53</sup> Triazolový fungicid flutriafol byl stanovován za použití HPLC-ECD po izolaci z mozku krysy mikrodialýzou.<sup>54</sup>

Další látkou, pro jejíž stanovení v biologickém materiálu je vhodné použít elektrochemickou detekci je morfin.<sup>55,56</sup>

BNP7787 (2,2-dithio-bis-etan sulfonát sodný; Tavocept<sup>TM</sup>) je nové léčivo procházející klinickým výzkumem pro prevenci nefrotoxicity vzniklé při terapii cis-platinou. Rovněž tuto látku lze v plazmě stanovit pomocí HPLC-ECD.<sup>57</sup>

Při výzkumu Parkinsonovy choroby a vývoji léků pro terapii této nemoci se používá kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí pro stanovení hladiny dopaminu a jeho metabolitů v buňkách striata.<sup>58</sup>

HPLC-ECD můžeme také použít pro zjištění plazmatické koncentrace hydromorfonu, sedativa používaného ve veterinární medicíně. Pro jeho stanovení byla vypracována metoda využívající coulometrickou detekci.<sup>59</sup>

HPLC metoda s coulometrickou a amperometrickou detekcí byla vyvinuta také pro stanovení SZ1677, což je nový steroidní nedepolarizující neuromuskulární blokátor, u něhož probíhají klinické zkoušky. Pro amperometrickou detekci byla použita skleněná elektroda jako pracovní a argentochloridová jako srovnávací. Pro coulometrickou detekci byl použit systém pracovních porézních grafitových elektrod a jako referenční elektroda paladiová.<sup>60</sup>

## 6.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda pro určování hmot volných molekul a jejich částí, jež je třeba k tomuto účelu převést na kladné nebo záporné ionty.

Hmotnostní spektrometr je pak iontově optické zařízení, které ionty vytvoří nebo je emituje do plynného stavu a z plynné směsi molekul, jejich nenabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmot, což je poměr hmotnosti a náboje. Dále umožňuje stanovit hodnotu této hmoty, udat relativní zastoupení iontů jedné hmoty z celkového množství iontů a molekul obsažených ve směsi a zjistit relace mezi jednotlivými ionty.

Během převádění molekul na ionty vznikají nejen ionty celých molekul, ale

rovněž četné fragmenty molekul, a to jak s nábojem, tak bez něho. Podle způsobu ionizace a typu látky mohou vznikat i ionty s více náboji a také tzv. quasi-molekulární ionty, což jsou ionty molekul s určitými adukty nebo ionty molekul bez jednoho vodíkového atomu. Ionty vznikající v iontovém zdroji lze rozdělit na stabilní, nestabilní a metastabilní podle toho, zda a kde se fragmentují během své existence ve spektrometru. Stabilní jsou ty, jejichž doba života je dostatečně dlouhá na to, aby prošly celým přístrojem až do detektoru. Nestabilní jsou ionty, které se rozpadají ještě v iontovém zdroji. Metastabilní jsou ionty, které disociují až po výstupu ze zdroje na dráze mezi iontovým zdrojem a detektorem. Lze zaznamenat fragmenty jejich rozpadu.

Registrací molekulárních, quasi-molekulárních a fragmentových iontů se získá záznam zvaný hmotové spektrum, který je charakteristický pro danou látku, podle typu ionizace a způsobu měření podává informace o její struktuře a na jeho základě lze zpravidla strukturu měřené látky odvodit nebo potvrdit. Podle typu experimentu je možné každou látku charakterizovat několika různými typy spekter, z nichž každé vypovídá o specifických vlastnostech studované látky.

Velkou výhodou hmotnostní spektrometrie je její citlivost, protože umožňuje identifikovat látky v množství kolem  $10^{-9}$  g a detekovat v množství kolem  $10^{-15}$  g. Základní tři funkční složky hmotnostního spektrometru tvoří iontový zdroj, analyzátor a registrační zařízení, k nimž přistupují systém zavádění vzorků, vakuový systém a řídicí stanice (počítač).<sup>61</sup>

### Iontové zdroje

Iontový zdroj, někdy za spoluúčasti vstupního systému, vytváří ionty, jež se v iontově optickém systému fokusují na úzký svazek, urychlují a „injikují“ do analyzátoru. Jeho typ se volí podle typu analyzované látky a požadavku na analýzu. Iontových zdrojů a jejich modifikací je řada.

Elektronová ionizace (EI) je jeden z nejstarších a nejvíce prostudovaných způsobů ionizace. Ionizace je vyvolána proudem elektronů emitovaných katodou, které po přiblížení k plynným molekulám polarizují natolik jejich magnetické pole, že dojde buď k odstranění nebo zachycení elektronu. EI se používá při měření látek do molekulové hmotnosti cca 800 Da. Větší molekuly se při zahřívání snadno rozkládají.

Při chemické ionizaci (CI) se nejprve elektronovou ionizací ionizuje reakční plyn a kombinací elektronové ionizace a iontově-molekulárních reakcí vzniká směs iontů reakčního plynu, která se potom účastní přenosu náboje na molekulu studované látky. CI je jemnější způsob ionizace než EI a vznikají především quasi-molekulární ionty, které eliminují malé neutrální molekuly.

Vyvinula se i chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

Ionizace pole (FI) je ionizace těkavých látek v plynném stavu kvantem mechanického tunelování a jsou při ní produkovány především molekulární ionty. Na špičce aktivovaného ostrého břitu nebo tenkého drátku, jež tvoří anodu, je vloženým napětím vytvořen vysoký potenciálový gradient, který deformuje potenciál stěny molekuly natolik, že při přiblížení molekuly k anodě protuneluje elektron potenciálovou stěnou a je anodou přitážen. Při ionizaci je molekulou odpuzen jenom nejméně vázaný elektron a vytvoří se ion v základním stavu s malým přebytkem vibrační energie. Tím, že je ion urychlen vysokým potenciálem dopadne rychle na kolektor a nestihne se rozpadnout.

Desorpce polem (FD) je stejně jako ionizace polem založena na tunelovém efektu, kdy elektron najde potenciálovou stěnu konečné tloušťky a protuneluje. U FD je molekula ionizována v pevném stavu a do plynného se desorbuje až jako ion. FD byla první metoda, která umožnila měření velkých peptidů a oligosacharidů bez derivatizace.

Ionizace rychlými atomy (FAB) a ionty (SIMS) patří k velmi používaným ionizačním technikám, které v posledních dvou desetiletích výrazným způsobem ovlivnily využití a vývoj hmotnostní spektrometrie, protože umožnily relativně snadno získat hmotová spektra a především informace o velikosti molekuly i u nederivatizovaných, tepelně labilních a vysokomolekulárních sloučenin. Vzorek se umístí spolu s maticí a případnou příměsí na vzorkovací terčík, ze kterého se uvolní ionty bombardováním rychlými atomy nebo primárními ionty.

Elektrosprej (ES, ESI) je technika spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, přičemž současně při odstraňování rozpouštědla dochází i k ionizaci měřené látky. Kapičky roztoku jsou vystřikovány při atmosférickém tlaku proti proudu ohřátého dusíku, který pomáhá odpařování rozpouštědla, přičemž je vloženo napětí 3 – 5 kV mezi výstupní jehlu chromatografu a vnější plášť elektrospreje. Vlivem vzájemného působení tlaku



kapaliny, povrchové tenze a vysokého pole vytvořeného na povrchu roztoku vznikají malé nabitě kapičky. Z nich se kromě rozpouštědla odpařují i plynné ionty studované látky.

Dalším vývojem elektrospreje vznikl iontový sprej (ISP), který se liší tím, že místo volného vytékání byl na výstupu z chromatografické kolony použit rozprašovač. V současné době se nerozlišuje iontový sprej od elektrospreje a označení elektrosprej se používá i pro systémy s rozprašovačem.

Název další techniky, ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), vyjadřuje skutečnost, že matrice se účastní ionizačního procesu aktivně. Matrice totiž absorbuje UV nebo IR záření, transformuje je na excitační energii, kterou předává molekulám analyzované látky, čímž dochází k jejich ionizaci.

Současně s vývojem MALDI probíhal vývoj ionizace laserem za účasti povrchu pevných částic (SALDI). V tomto případě se k absorpci UV nebo IR záření používají nano- nebo mikročástice kobaltu, grafitu, oxidu křemičitého nebo nitridu titanu suspendované v kapalině. Citlivost SALDI je asi padesátkrát nižší než MALDI a používá se méně.<sup>61</sup>

### Analyzátory iontů

Z iontového zdroje vystupuje směs obsahující ionty různých hmot  $m$  nesoucích jeden i více nábojů  $z$  a je třeba je před detekcí rozlišit. K rozlišení iontů podle jejich účinných hmot  $m/z$  slouží hmotové analyzátory.

Analyzátory je možno v zásadě rozdělit na sektorové, kvadrupolové, průletové a založené na uchovávání iontů.

Sektorové analyzátory jsou magnet a elektrostatický analyzátor. Název sektorový je odvozený ze skutečnosti, že oba mají tvar části jakoby vyříznuté z kruhového bloku.

Magnet pracuje na základě skutečnosti, že poloměr dráhy iontu v magnetickém poli je úměrný účinné hmotě  $m/z$  ( $m/z = B^2 r^2 / 2V$ ). Elektrostatický analyzátor si lze představit jako kondenzátor se zakřivenými plochami, mezi kterými vede dráha iontů.

Kvadrupol (správněji kvadrupolový hmotový filtr) je dynamický analyzátor, u něhož je separace iontů dosaženo jejich průchodem mezi čtyřmi kovovými tyčemi (filtrem), na něž je vloženo stejnosměrné napětí (cca 400 V), vždy u dvou protilehlých tyčí stejná znaménka, a na ně je superponováno střídavé

radiofrekvenční napětí (cca 2000 V). K tomu, aby ionty prošly, musí se podrobit oscilaci, která se udržuje konstantní. Šířka průchodného pásma je určena hlavně podle poměru stejnosměrného a střídavého napětí  $V/U$ . Stabilita iontů závisí na poměru  $m/z$ . Částice s jinou hodnotou  $m/z$  jsou z elektrického pole vyneseny ven a zadrženy elektrodami.

Iontová past také patří do dynamických hmotových spektrometrů. Je to v podstatě trojrozměrný kvadrupol. Skládá se z prstencové střední elektrody s hyperbolickým průřezem a dvou kruhových elektrod rovněž s hyperbolickým průřezem. Do pasti v jedné z kruhových elektrod se injikuje puls elektronů, které ionizují plyný vzorek a nebo ionizace probíhá mimo past a do pasti jsou injikovány přímo ionty. Všechny ionty nad určitou hodnotu  $m/z$  mají trajektorie, které je udržují uvnitř elektrody.

Průletový analyzátor (TOF – Time-Of-Flight) rozděluje ionty na základě doby letu. V iontovém zdroji se periodicky vytvářejí krátké pulsy iontů, které po urychlení vstupují do „letové trubice“ a měří se čas jejich dopadu na detektor. Čím je lehčí ion, tím dříve dosáhne kolektoru. V posledních letech dosáhly průletové analyzátory velkého rozšíření ve spojení s MALDI.

U techniky zvané cyklotronová rezonance iontů (ICR) opisují ionty pod vlivem protínajícího se magnetického a elektrického pole cykloidální trajektorie s frekvencí  $\omega = zV/m$  a mají rychlost orientovaného pohybu  $v = V/H$ , kde  $V$  je napětí elektrického pole,  $H$  intenzita magnetického pole,  $m$  hmota iontu a  $z$  jeho náboj.

Tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) se označuje spektrometrie s více analyzátory, které pracují více méně nezávisle a umožňují tak sledovat reakce probíhající ve spektrometru. Tímto způsobem se například detekují produktové ionty ze zvoleného prekurzoru nebo naopak lze ke zvolenému produktovému iontu nalézt jeho prekurzory.<sup>61</sup>

### Registrační zařízení

Registrace iontů je v dnešní době výhradně elektrická. Starší přístroje jsou vybaveny elektronovými násobiči, novější fotonásobiči nebo mnohokanálovými detektory. Při elektrické detekci se měří počet nábojů (iontů). Získané spektrum může být spojité, podobné záznamu z plynové chromatografie, nebo čárové. Profil svazku jednotlivých iontů je gaussovský, proto je každý snímaný záznam

původně spojitý a čárové spektrum je z něho vytvořeno počítačem. Čáry spektra se nazývají centroidy, protože jsou generovány ve středu píku spojitého spektra nebo jeho v maximu. V závislosti na rozlišovací schopnosti a hmotové oblasti, kde se spojitě píky nacházejí, tvoří centroid střed jednoho spojitého píku nebo střed celého klastru píků.<sup>61</sup>

### Spojení s kapalinovou chromatografií (LC/MS)

V současné době lze spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie považovat za běžnou techniku dostupnou i v řadě laboratoří v České republice. Popularita a rozšíření této techniky je způsobena množstvím analytických informací, které můžeme získat, zejména pokud je k dispozici hmotnostní analyzátor s možností MS/MS analýzy.

Historický vývoj HPLC/MS nebyl tak jednoduchý jako v případě spojení s plynovou chromatografií. Hlavními problémy spojení jsou překonání obrovského rozdílu tlaků mezi HPLC a MS (8 – 10 řádů), převedení analyzovaných látek do plynné fáze a odstranění nadbytku mobilní fáze. Během vývoje byla popsána řada úspěšných řešení.

V současné době se jako standardní techniky pro spojení HPLC/MS používá kombinace ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (ESI a APCI), které umožňují práci v širokém rozmezí chromatografických podmínek a lze je použít prakticky pro všechny organické a bioorganické molekuly. Jediným omezením hmotnostní spektrometrie pro volbu chromatografických podmínek je použití netěkavých přísad do mobilní fáze, avšak i toto omezení lze do jisté míry překonat speciální konstrukcí iontového zdroje. Současný vývoj HPLC/MS směřuje spíše ke zlepšení parametrů hmotnostních analyzátorů než k vývoji nových ionizačních technik.<sup>62</sup>

Za poslední rok je jedno z nejčastěji publikovaných použití spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií v analýze léčiv v biologických materiálech stanovení antivirotik používaných pro léčbu infekcí virem HIV. Byla vypracována metoda současného stanovení nových antiretrovirálních léčiv raltegraviru, maraviroku, darunaviru a etravirinu v plazmě pomocí spojení kapalinové chromatografie s MS/MS. Analyty byly stanoveny pomocí spektrometru s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólem.<sup>63</sup>

Jiná metoda stanovení antiretrovirálních léčiv, konkrétně inhibitorů proteáz a

inhibitorů nenukleosidových reverzních transkriptáz, hovoří o jejich stanovení pomocí HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií ne v plazmě, jak je obvyklé, ale v lyzátu krevních mononukleárních buněk, což lépe vypovídá o jejich koncentraci přímo v místě účinku.<sup>64</sup>

Aktinomycin D a vinkristin, což jsou látky aktivně působící proti Wilmsově tumoru, byly rovněž stanoveny pomocí HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Lze použít ionizaci elektrosprejem nebo ionizaci za atmosférického tlaku.<sup>65</sup>

Experimentální cytotoxické léčivo cykloptenyl cytosin je analog citidinu. Právě se nachází ve fázi ranných klinických testů. K jeho stanovení v plazmě můžeme použít HPLC-MS s ESI.<sup>66</sup> Z látek určených k léčbě malignit můžeme pomocí HPLC-MS stanovit ještě například jeden z analogů platiny, oxaliplatin.<sup>67</sup>

HPLC-MS bylo také užito ke stanovení oxovanadiových sloučenin v séru a ke studiu jejich interakce se sérovými proteiny. Tyto sloučeniny mohou být používány k léčbě diabetu.<sup>68</sup>

V Číně vypracovali metodu kvantitativní analýzy proléčiva enalaprilu a jeho aktivního metabolitu enalaprilátu, který má antihypertenzní účinek. Použili techniku HPLC-MS-MS s trojitým kvadrupólem a ESI.<sup>69</sup> Jiná látka s antihypertenzním účinkem, pro jejíž stanovení v plazmě lze použít LC-MS-MS je isradipin.<sup>70</sup>

Další léčivo stanovitelné pomocí HPLC-MS-MS je fluoxetin, který se používá např. pro prevenci depresivních stavů u pacientů s chronickou hepatitidou C,<sup>71</sup> antiepileptikum levetiracetam,<sup>72</sup> antagonistu vodíkových receptorů roxatidin,<sup>73</sup> nebo analgetikum tramadol a jeho hlavní metabolity v plazmě koní.<sup>74</sup>

Velmi zajímavá je LC-MS metoda stanovení everolimu. Everolimus se užívá pro prevenci akutní a chronické rejekce transplantovaných orgánů. Analýza může být provedena po zaschnutí vzorku krve na testovacím papírku.<sup>75</sup>

Byla vypracována i LC-MS metoda rychlého stanovení alkaloidů kofeinu a teofylinu v lidském séru. Pro tuto metodu byla použita ionizace za atmosférického tlaku (APCI).<sup>76</sup>

Z dalších léků, které můžeme stanovit v biologických materiálech technikou LC-MS vybíráme například mifepriston, což je antagonistu progesteronových receptorů,<sup>77</sup> či paracetamol.<sup>78</sup>

Hmotnostní spektrometrii můžeme použít i ve spojení s UHPLC ( ultra-high

performance chromatography), což je moderní modifikace, při níž se používají velmi malé a velmi odolné kolony a analýza probíhá za několikanásobně vyššího tlaku. Využití této techniky by mohlo být v budoucnu velmi vhodné pro analýzu léčiv v biologickém materiálu.<sup>79</sup>

## **6.9 Detektory radioaktivity**

Látky obsahující <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C a <sup>3</sup>H můžeme sledovat pomocí různých typů scintilačních počítačů.<sup>4</sup>

Citlivé detektory radioaktivity se používají při metabolických studiích s radioaktivně značenými sloučeninami. V současnosti se používají on-line detektory radioaktivity, stop-flow technologie a off-line scintilační počítače.<sup>80</sup>

## **6.10 Nukleární magnetická rezonance**

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda založená na měření absorpce radiofrekvenčního záření molekulami analytů, které obsahují jádra s nenulovým spinem, v silném magnetickém poli. NMR lze tandemově správnout s HPLC a získat tím trojrozměrný detektor.<sup>2</sup>

## **6.11 Moderní univerzální detektory**

### **6.11.1 Evaporative light scattering detector (ELSD)**

ELSD slouží především k detekci látek, které nemají ve své molekule žádný chromofor nebo luminofor a jsou méně těžké než mobilní fáze.

Činnost tohoto detektoru lze rozdělit na tři fáze.

V první fázi, zvané zmlžení či nebulizace, dojde v nebulizéru k rozprášení kapaliny vytékající z kolony v proudu inertního plynu (dusík) na jednotlivé kapénky. Velikost a uniformita kapiček má velký vliv na citlivost detekce a její reprodukovatelnost. Kapénky vstupující do temperované evaporační trubice by se měli odpařit co nejrychleji. Větší kapénky se zachytávají na skleněných stěnách nebulizéru, kondenzují a jsou sbírány do odpadu.

Ve druhé fázi jsou kapičky z nebulizéru vytlačeny do vyhřívané odpařovací trubice, kde dojde k odpaření mobilní fáze. Detektory jsou konstruovány tak, aby se za relativně nízké teploty odpařily i výše vroucí komponenty mobilní fáze (voda). Tím se snižuje riziko tepelné degradace analytů. Výsledkem je mlha tvořená částicemi suchého analytu a parami rozpouštědel.

Ve třetí fázi jsou částice vzorku vneseny do detekční cely, kde se střetnou s paprskem emitovaným laserovou diodou. Na shluku molekul dochází k difrakci záření a částicemi rozptýlené světlo je detekováno křemíkovou fotodiodou generující elektrický signál, jež je po zesílení dále elektronicky zpracován a zaznamenán. Velikost výsledného rozptýleného světla odpovídá koncentraci látky ve vzorku.

Velkou výhodou ELSD je jeho univerzalita naopak nevýhodou nižší citlivost než má například spektrofotometrický nebo fluorescenční detektor.<sup>2, 81</sup>

### **6.11.2 Charged Aerosol Detector (CAD)**

CAD je nový typ univerzálního detektoru vhodnější pro kvantifikaci než ELSD.

V tomto detektoru je nejprve mobilní fáze převedena do formy aerosolu proudem dusíku. Kapénky jsou následně vysušeny až do odstranění mobilní fáze a získu suchých částic analytu. S aerosolem se smísí sekundární proud dusíku a získává při průchodu vysokonapěťovým koronárním výbojem na platinovém drátku kladný náboj úměrný velikosti částic. Vzniká nabitý aerosol. Náboj je přenesen do kolektoru, kde je změřen, a generuje signál přímo úměrný množství analytu.

Citlivost detektoru se pohybuje kolem  $10^{-9}$  g/ml. Má široký lineární rozsah a poskytuje stálou a dobře reprodukovatelnou odpověď. Pomocí CAD detektoru mohou být analyzovány látky různé chemické struktury kromě nízkomolekulárních těkavých látek.<sup>81</sup>

### **6.11.3 Nano Quantity Analyte Detector (NQAD)**

NQAD je detektor na bázi aerosolů, který se však způsobem detekce liší od ELSD a CAD i od ostatních detektorů hlavně tím, že měří počet částic analytu, ne objem nebo hmotnost. Jedná se o univerzální detektor pro netěkavé látky. Využívá technologii Water Condensation Particle Counter (WCPC). Kromě univerzality je jeho velkou výhodou značná citlivost.

Eluent z kolony je rozstříkván do odpařovací trubice za vzniku velmi jemného aerosolu. Mobilní fáze se odpaří za vzniku malých zbytkových částic. V systému WCPC dojde ke kondenzaci přesycené vodní páry na částicích za vzniku kapiček. Detektor následně počítá množství aerosolu a jeho signál je

přímo úměrný počtu částic v závislosti na čase.<sup>81</sup>

## 7. Nalezení chromatografických podmínek pro stanovení amisulpridu v plazmě

### 7.1 Amisulprid

Amisulprid, 4-amino-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-5-ethylsulfonyl-2-metoxy-benzamid (obr. 1), je derivát benzamidu chemicky příbuzný sulpiridu. Jedná se o atypické antipsychotikum působící jako antagonist D2 a D3 dopaminových receptorů převážně v limbickém systému. Klinicky se používá vzhledem k nízkému riziku extrapyramidálních nežádoucích účinků a protože je relativně lépe tolerován než konvenční antipsychotika. Je široce často používán při léčbě různých typů schizofrenie.<sup>82, 83</sup> Dále je občas využíván lékaři pro zmírnění některých projevů autismu<sup>84</sup> při terapii některých dalších psychiatrických onemocnění, má i antidepresivní účinek.

Účinek amisulpridu závisí na dávce. Ve vysokých dávkách blokuje postsynaptické receptory, což má podobný efekt jako konvenční antipsychotika, zatímco v nízkých dávkách blokuje převážně presynaptické receptory, a tak usnadňuje přenos dopaminu.<sup>85</sup>

Dosud publikované metody stanovení plazmatických koncentrací jsou založeny nejčastěji na SPE nebo LLE extrakci spojené s HPLC na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí. Extrahován byl amisulprid do směsi diethyletheru a chloroformu (95:5, v/v) po zalkalizování 1M NaOH<sup>86</sup> nebo do směsi hexanu-isoamylalkoholu po zalkalizování 2M NaOH.<sup>87</sup>

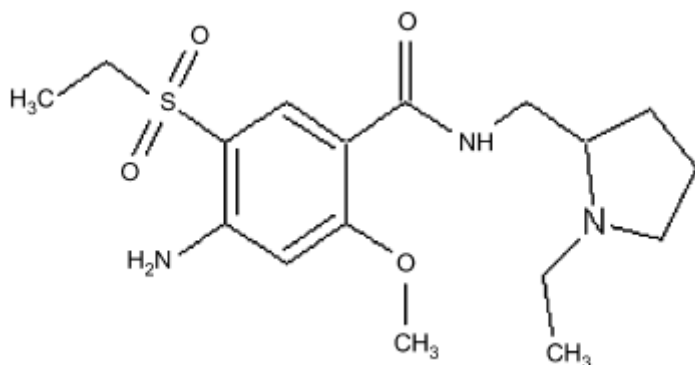
Jako mobilní fáze byly použity směs acetonitril-fosfátový pufr ( $6,2 \cdot 10^{-2}$  M) okyselená na pH 6,4,<sup>87</sup> směs acetonitrilu a dihydrogenfosforečnanu draselného,<sup>86</sup> směs acetonitril – fosforečnan draselný (0,008M; pH 6,4) 50:50,<sup>85</sup> acetonitril–methanol–fosforečnan pH 4.50 (15:5:80, v/v/v).<sup>82</sup>

Amisulprid absorbuje v UV oblasti, spektrofotometrickým detektorem byl detekován při vlnové délce 280 nm,<sup>87</sup> 254 nm,<sup>85</sup> 225 nm.<sup>82</sup> K detekci amisulpridu může být také využita jeho schopnost fluoreskovat. Fluorescenčním detektorem byl detekován při excitační vlnové délce 280 nm a emisní 370 nm.<sup>86</sup>

Jako vnitřní standart pro stanovení amisulpridu byl v publikovaných metodikách použit 4-amino-*N*-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-5-(cyklopropyl)methylsulfonyl-2-metoxybenzamid,<sup>86</sup> viloxazin,<sup>87</sup> moclobemid.<sup>82</sup>



Plazmatické koncentrace amisulpridu u pacientů léčených pro schizofrenii nebo schizoidní poruchy se pohybují okolo 420 ng/ml, ale s velkými interindividuálními rozdíly.<sup>88</sup>



obr.1 chemická struktura amisulpridu<sup>82</sup>

## 7.2 Experiment

Dali jsme si za úkol vypracovat podmínky pro RP-HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích) stanovení amisulpridu v plazmě izokratickou elucí, metodou vnitřního standardu.

### 7.2.1 Instrumentace

Pracovali jsme na kapalinovém chromatografické sestavě SPECTRA-PHYSICS s UV spektrofotometrickým detektorem nastaveným na vlnovou délku 235 nm. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min. Nechali jsme nastříkat 20  $\mu$ l vzorku na jeden nástřik.

Pracovali jsme v modu reverzních fází, použili jsme chromatografickou kolonu o rozměru 150 mm x 4 mm (i.d.) s náplní Separon SGX C18 o velikosti částic 7  $\mu$ m.

Pro izolaci analytu z plazmy jsme použili SPE kolonky Supelco s náplní Discovery DSC18.

### 7.2.2 Chemikálie

acetonitril pro HPLC, Merck

methanol pro HPLC, Penta

dichlormethan, Penta

diethylether, Penta

ethylacetát, Penta  
kyselina octová p.a., Penta  
octan amonný p.a., Balex Pardubice  
fosforečnan draselný, p.a., Lachema Brno  
voda pro HPLC čištěná reverzní osmózou

### Příprava pufrů

0,1 M, 1M a koncentrovaný hydroxid sodný byly připraveny v naší laboratoři.

0,1 M fosforečnanový pufr jsme připravili rozpuštěním 2,80 g ve 200 ml vody.

0,1M Octanový pufr použitý do mobilní fáze jsme získali rozpuštěním 1,54 g octanu amonného ve 200 ml vody. Na výsledné pH 5,6 jsme ho okyselili několika kapkami koncentrované kyseliny octové. 0,1 M Octanový pufr pro promytí SPE kolonky vznikl rozpuštěním 0,77 g octanu amonného ve 100 ml vody.

### **7.2.3 Standardní roztoky**

Standardní roztok pro volbu mobilní fáze jsme připravili rozpuštěním 0,0113 g amisulpridu v methanolu ve 100 ml odměrné baňce.

Standardní roztok obsahující společně amisulpid a ambroxol, který sloužil pro potvrzení ambroxolu jako vnitřního standardu jsme připravili tak, že jsme rozpustili 0,0120 g amisulpridu a 0,201 g ambroxolu v mobilní fázi ve 25 ml odměrné baňky. 1 ml tohoto zásobního roztoku jsme přepipetovali do 50 ml odměrné baňky a doplnili mobilní fází. 10 ml vzniklého roztoku jsme přenesli pipetou do 100 ml odměrné baňky a opět doplnili mobilní fází. Výsledný roztok měl koncentraci 0,96 µg/ml amisulpridu a 1,608 µg/ml ambroxolu.

Standardní roztok pro LLE izolaci z vody jsme získali rozpuštěním 0,0102g amisulpridu a 0,0198g ambroxolu v mobilní fázi ve 25 ml odměrné baňce. Koncentrace tohoto standardního roztoku byla 0,408 mg/ml amisulpridu a 0,792 mg/ml ambroxolu.

Standardní roztok o přibližné koncentraci 1mg/ml, který jsme použili při izolaci léčiva z plazmy pomocí SPE vznikl rozpuštěním 0,0982 g amisulpridu a 0,2003 g ambroxolu v methanolu ve 100 ml odměrné baňce.

### **7.2.4 Mobilní fáze**

Při přípravě mobilní fáze jsme složky nejprve pečlivě promísili a po té promíchanou mobilní fázi nechali 10 minut odplynit v ultrazvukové lázni. Každou novou zkoušenou mobilní fází jsme nejprve 10 – 30 minut proplachovali kolonu a po té jsme nastříkli methanolický roztok amisulpridu o koncentraci 0,1 mg/ml.

Zkoušeli jsme mobilní fázi voda – methanol 50:50 (v/v),

0,1 M fosforečnan draselný – methanol 40:60 (v/v),

0,1 M fosforečnan draselný – acetonitril 40:60 (v/v),

0,1 M fosforečnan draselný (pH 4,7) – acetonitril 50:50 (v/v)

fosforečnan draselný (pH 3,6) – acetonitril 40:60 (v/v)

0,1 M octan amonný (pH 6,1) – acetonitril 50:50 (v/v)

0,1 M octan amonný (pH 5,6) – acetonitril 40:60 (v/v).

Do každé zkoušené mobilní fáze jsme standard nastříkli nejméně dvakrát.

### **7.2.5 Vnitřní standard**

Několik miligramů léčiva, které jsme zamýšleli použít jako vnitřní standard jsme rozpustili v několika mililitrech mobilní fáze a nastříkli do chromatografu. Po řadě jsme vyzkoušeli fenacetin, diclofenak, 4-chloroacetanilid, acetanilid, klotrimazol, bromhexin a ambroxol. Každou látku jsme nastříkli dvakrát.

Po té jsme nastříkli roztok amisulpridu o koncentraci 48,40 µg/ml a stejné koncentraci ambroxolu.

Nakonec jsme, stále za stejných podmínek, nastříkli roztok o koncentraci amisulpridu 0,96 µg/ml a koncentraci ambroxolu 1,61 µg/ml.

### **7.2.6 Příprava vzorku**

#### **LLE**

K 0,2 ml plazmy a k 0,2 ml vody jsme přidali po 20 µl standardního roztoku obsahujícího 0,408 mg/ml amisulpridu a 0,792 mg/ml vnitřního standardu ambroxolu. Směs jsme důkladně protřepali.

Směs jsme zalkalizovali. Extrakci do každého rozpouštědla jsme zkoušeli třikrát, při zalkalizování 0,2 ml 0,1M NaOH, 2 kapkami 1M NaOH a 2 kapkami koncentrovaného NaOH. Po zalkalizování jsme opět protřepali.

Přidali jsme 1 ml organického rozpouštědla. Zkoušeli jsme použít diethylether, dichlormethan, a směs dichlormethanu a ethylacetátu 1:5 (v/v).

Nechali jsme důkladně protřepat, a po té několik minut ustát, aby se oddělily

vrstvy.

Organickou fází jsme odsáli stříkačkou do čisté zkumavky a nechali odpařit v dusíkové atmosféře.

Odparek jsme rozpustili v 0,2 ml mobilní fáze a nechali proběhnout analýzu. Toto množství vystačilo na dva nástřiky.

Celý postup jsme pokaždé zároveň prováděli s čistou plazmou bez přidání standardního roztoku a nastříkovali rovněž blank.

## SPE

Z plazmy jsme léčivo izolovali pomocí extrakce na pevných fázích (SPE).

Do 0,2 ml rozmražené králičí plazmy jsme přidali 10 $\mu$ l standardního roztoku o koncentraci amisulpridu 1 mg/ml a vnitřního standardu 2 mg/ml.

SPE kolonku jsme nejprve aktivovali promytím methanolem, po té propláchli octanovým pufrem.

Na kolonku jsme nalili vzorek a nechali neadsorbovat.

Balasty jsme vypláchli octanovým pufrem a analyt vymyli do čisté zkumavky methanolem.

Methanol jsme nechali odpařit, odparek jsme rozpustili v 0,2 ml mobilní fáze, přenesli do vialky s inzertem a nechali proběhnout analýzu. Toto množství vystačilo na dva nástřiky.

Celý postup jsme zároveň prováděli s blankovou plazmou bez přidání standardu.

## **7.3 Výsledky**

### **7.3.1 Mobilní fáze**

Při použití mobilních fází obsahujících methanol se pík léčiva vůbec neobjevoval.

Při použití mobilních fází obsahujících fosforečnanový pufr a acetonitril se amisulprid vymýval z kolony s krátkým retenčním časem, 5,4 minuty s mobilní fází fosforečnan – acetonitril 40:60 a 5,8 minut s mobilní fází fosforečnan – acetonitril 50:50. V těchto retenčních časech ještě hrozí vymývání balastů z plazmy.

Nejvhodnější se zdály mobilní fáze obsahující acetonitril a octanový pufr. Směs octanu a acetonitrilu 50:50 (v/v) vymývala amisulprid z kolony v čase 9,1

minuty.

Zvolili jsme mobilní fázi 0,1 M octan amonný (okyselený kyselinou octovou na pH 5,6) – acetonitril 40:60 (v/v), která vymývala amisulprid v čase kolem 8 minut.

### 7.3.2 Vnitřní standard

Jak vyplývá z tabulky 1, většina látek, které jsme zkoušeli jako možný vnitřní standard měla příliš krátký retenční čas, ve kterém hrozí, že se ještě z kolony budou vymývat balasty z plazmy. Byla navíc značně rozmytá. Jako nejvhodnější se jevil ambroxol s průměrným retenčním časem 11,3 min.

Ve vlnové délce 235 nm absorbuje ambroxol méně než amisulprid, jeho pík se tedy při stejné koncentraci jeví asi dvakrát menší.

Tab. 1 retenční časy látek zkoušených pro použití jako vnitřní standard

Název látky	Průměrný retenční čas (min)
fenacetin	4,30
diclofenak	3,70
4-chloracetanilid	5,15
acetanilid	3,95
klotrimazol	Pík se neobjevil
bromhexin	Pík se neobjevil
ambroxol	11,30

### 7.3.3 Příprava vzorku

#### LLE

Po vytřepání do etheru i dichlormethanu, bez ohledu na způsob zalkalizování se objevoval pouze pík vnitřního standardu, amisulprid do těchto rozpouštědel dobře nepřecházel. Do směsi dichlormethanu s ethylacetátem dobře nepřecházel ani amisulprid ani vnitřní standard.

Použití metody extrakce do kapaliny se nám tedy nepodařilo.

#### SPE

Na obrázku 2 vidíme pík amisulpridu a vnitřního standardu, po provedení SPE

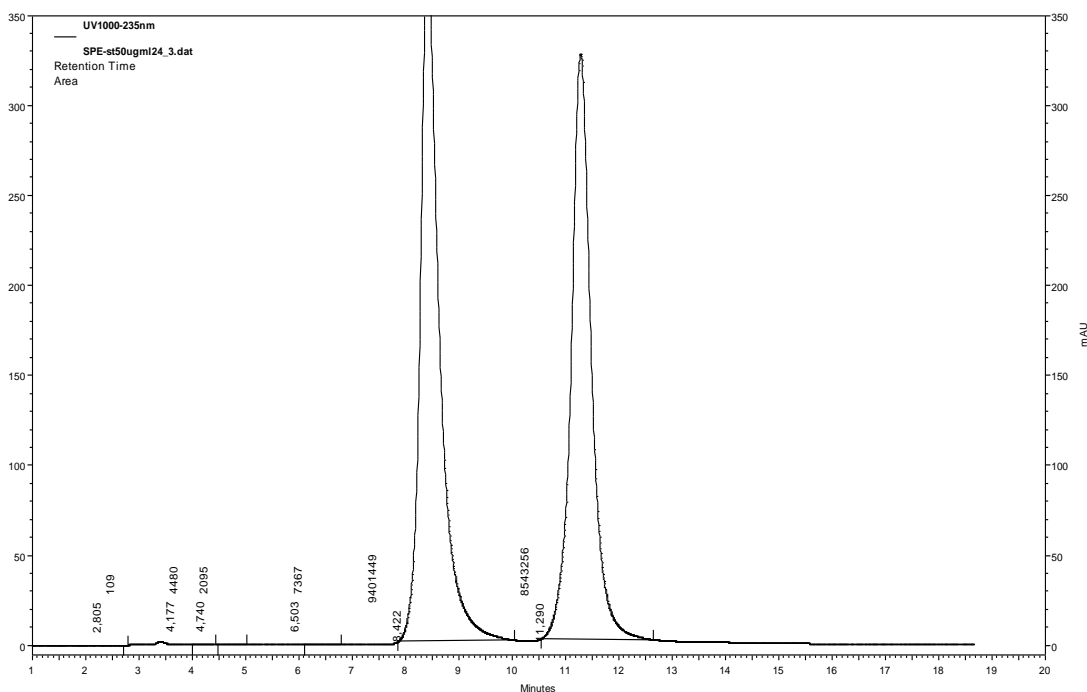
extrakce z plazmy která obsahovala 50 µg/ml amisulpridu a 100 µg/ml vnitřního standardu ambroxolu.

Na obrázku 3 vidíme chromatogram vzniklý po zpracování čisté králičí plazmy stejným způsobem.

SPE se ukázala jako relativně účinná extrakční metoda. Amisulprid, rozpuštěný v plazmě v koncentraci 50 µg/ml byl extrahován dokonce 94 % účinností a vnitřní standart přecházel z plazmy s účinností asi 82 %. Tato data jsme ovšem získali zprůměrováním pouze dvou analýz, nelze jim tudíž přiřkládat velkou váhu.

Metodu bude třeba dále dopracovat, protože zkoušená koncentrace byla podstatně vyšší než předpokládané plazmatické koncentrace léčiva.

Z blankové plazmy se vymývala neznámá látka s retenčním časem 12,2 minuty, který se překrýval s píkem vnitřního standardu.



obr. 2: První pík s retenčním časem 8,4 min odpovídá amisulpridu o koncentraci v plazmě 50 µg/ml, druhý pík s retenčním časem 11,3 min odpovídá ambroxolu o koncentraci 100 µg/ml



## 8. Literatura

- 1) Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalytika léků, Avicenum, Praha 1990, 272 s.
- 2) Nobilis M., cyklus přednášek z předmětu Analýza exogenních látek v biologickém materiálu pro studijní program zdravotnická bioanalytika, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008/2009
- 3) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1985, 192 s.
- 4) Mikeš O. et al.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980, 676 s.
- 5) Aulakh J. S., Malik A. K., Kaur V., Schmitt-Kopplin P.: A Review on Solid Phase Micro Extraction – High Performance Liquid Chromatography (SPME-HPLC) Analysis of Pesticides, *Critical Reviews of Analytical Chemistry*, 35, 71 – 85, 2005
- 6) Glowka F. K. et al.: Pharmacokinetics of high-dose i.v. treosulfan in children undergoing treosulfan-based preparative regimen for allogeneic haematopoietic SCT, *Bone Marrow Transplantation*, 42, S67–S70, 2008
- 7) Grafnetterová J., Klíma J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii, Avicenum, Praha 1987, 256 s.
- 8) Martens-Lobenhoffer J., Kielstein J. T., Oye C., Bode-Böger S. M.: Validated high performance liquid chromatography–UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 875, 546–550, 2008
- 9) Denooz R., Charlier C.: Simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 864, 161–167, 2008
- 10) Legrand T. et al.: Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 875, 551–556, 2008
- 11) Song O. X., Ding L., Li J. H., Cao X. M., Chu X. X.: Determination of balofloxacin in human plasma by RP-HPLC and its application to bioequivalence research, *Chinese Pharmaceutical Journal*, 43, 1092 – 1095,



2008

- 12) Contin M., Mohamed S., Albani F., Riva R., Barruzi A.: Simple and validated HPLC–UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy, *Journal of Chromatography B*, 873, 129–132, 2008
- 13) Budáková L., Brozmanová H., Grundmann M., Fischer J.: Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their two active metabolites by HPLC, *J. Sep. Sci.*, 31, 1–8, 2008
- 14) Bompadre S., Tagliabracci A., Battino M., Determination of lamotrigine in whole blood with on line solid phase extraction, *Journal of Chromatography B*, 863, 177–180, 2008
- 15) Xiong Ch., Ruan J., Cai Y., Tang Y.: Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 572–578, 2009
- 16) Mandal U., Ghosh A., Pal T. K., Chattaraj T. K.: Bioequivalence study of two formulations containing 30 mg of aripiprazole in healthy human volunteers, *Asian Journal of Chemistry*, 20, 1561 – 1566, 2008
- 17) Kang X. J., Chen L. Q., Wang Y., Zhang Y. Y., Gu Z.: Design of packed-fiber solid-phase extraction device for analysis of the drug and its metabolite in plasma, *Biomed Microdevices*, DOI 10.1007/s10544-009-9285-9, 2009
- 18) Mercolini L., Mandrioli R., Amore M., Raggi M. A.: Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma, *J. Sep. Sci.*, 31, 2619 – 2626, 2008
- 19) Mercolini L., Colliva C., Amore M., Fanali S., Raggi M A.: HPLC analysis of the antidepressant trazodone and its main metabolite *m*-CPP in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 882–887, 2008
- 20) Jin Y. X., Tang Y. H., Zeng S.: Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug–protein binding in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46, 953–958, 2008
- 21) Gandimathi M., Ravi T. K.: RP-HPLC and HPTLC estimation of tramadol hydrochloride and paracetamol in combination, *Asian Journal of chemistry*, 20, 4940 – 4942, 2008

- 22) Bahrami G., Mohammadi B., Kiani A.: Determination of oseltamivir carboxylic acid in human serum by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography B*, 864, 38–42, 2008
- 23) Myung C. S. et al.: Analytical HPLC method validation of amiloride and its pharmacokinetic study in humans, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 2455 – 2466, 2008
- 24) Maher H. M., Youssef R. M., Khalil R. H., El-Bahr S. M.: Simultaneous multiresidue determination of metronidazole and spiramycin in fish muscle using high performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography B*, 876, 175–181, 2008
- 25) Bharathi Ch. et al.: Identification, isolation and characterization of impurities of clindamycin palmitate hydrochloride, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1211–1218, 2008
- 26) Rao R. N., Raju A. N., Narsimha R., Babu G. R.: Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI-MS/MS, *J. Sep. Sci.*, 31, 107 – 118, 2008
- 27) Rao R. N., Raju A. N., Narsimha R.: Isolation and characterization of degradation products of citalopram and process-related impurities using RP-HPLC, *J. Sep. Sci.*, 31, 1729 – 1738, 2008
- 28) Chittury S. R. et al.: Impurity profile study of lopinavir and validation of HPLC method for the determination of related substances in lopinavir drug substance, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1430–1440, 2008
- 29) Rao R. N., Raju A. N., Narsimha R.: Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 505–519, 2008
- 30) Peccini R. G., Ximenes V. F., Cesarino E. J., Lanchote V. L.: Stereoselective Analysis of Carvedilol in Human Plasma and Urine using HPLC after Chiral Derivatization, *Biopharm. Drug Dispos.* 29, 280–288, 2008
- 31) Xu D. H., Gao J. Q., Liang W. Q., Zhao Y. X.: Determination of doxorubicin concentrations in MDR cancer cell nuclei by HPLC, 43, 1264 –

1267, 2008

32) Liu X., Wang Y., Vardeman D., Cao Z., Giovanella B.: Development and validation of a reverse-phase HPLC with fluorescence detector method for simultaneous determination of CZ48 and its active metabolite camptothecin in mouse plasma, *Journal of Chromatography B*, 867, 84–89, 2008

33) Viola M. et al.: New electrophoretic and chromatographic techniques for analysis of heparin and heparan sulfate, *Electrophoresis*, 29, 3168–3174, 2008

34) Paroni R., Faioni E. M., Razzari C., Fontana G., Cattaneo M.: Determination of vitamin K1 in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 877, 351–354, 2009

35) Liu Ch. H. et al.: Cellular Absorption of Emodin Influenced by Anthraquinones in Human Intestinal Caco-2 Cells, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 298 – 301, 2008/6

36) Zahr N. et al.: Pharmacokinetic Study of Mycophenolate Mofetil in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Design of Bayesian Estimator Using Limited Sampling Strategies, *Clin. Pharmacokinet.* 48, 277 – 284, 2008

37) Poirier J. M., Robidou P., Jaillon P.: Quantification of the HIV-integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 867, 277–281, 2008

38) Gonzales O. et al.: Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008

39) Cheng G. W., Wu H. L., Huang Y. L.: Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system, *analytica chimica acta* 616, 230–234, 2008

40) Michael C., Teichert J., Preiss R.: Determination of voriconazole in human plasma and saliva using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 865, 74–80,

2008

41)Khedr A.: Sensitive determination of ranitidine in rabbit plasma by HPLC with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 862, 175–180, 2008

42)Nakashima K., Ikeda R., Wada M.: Analytical Studies on the Development of High-Performance Liquid Chromatographic Methods with Fluorescence or Chemiluminescence Detections and Their Practical Applications, *Analytical Sciences*, 25, 21 – 31, 2009

43)Ahmed S. et al.: Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta* 78, 94–100, 2009

44)Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., García-Martínez M. D.: Simultaneous determination of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone by high-performance liquid chromatography with chemiluminescent detection, *analytica chimica acta* 623, 89–95, 2008

45)Bellomarino S. A., Brown A. J., Conlan X. A., Barnett N. W.: Preliminary evaluation of monolithic column high-performance liquid chromatography with tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection for the determination of quetiapine in human body fluids, *Talanta* 77, 1873–1876, 2009

46)Sun Y, Zhang Z., Xi Z.: Direct electrogenerated chemiluminescence detection in high-performance liquid chromatography for determination of ofloxacin, *analytica chimica acta* 623, 96–100, 2008

47)Angüí L., Yáñez-Sedeno P., Pingarrón J. M.: Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry A review, *analytica chimica acta* 622, 11–47, 2008

48)Lai Ch. S. et al.: Validation of high performance liquid chromatography–electrochemical detection methods with simultaneous extraction procedure for the determination of artesunate, dihydroartemisinin, amodiaquine and desethylamodiaquine in human plasma for application in clinical pharmacological studies of artesunate–amodiaquine drug combination, *Journal of Chromatography B*, 877, 558–562, 2009

49)Gu Y., Li Q., Melendez V., Weina P.: Comparison of HPLC with electrochemical detection and LC–MS/MS for the separation and validation

- of artesunate and dihydroartemisinin in animal and human plasma, *Journal of Chromatography B*, 867, 213–218, 2008
- 50) Supattanapong S., Konsil J.: Solid phase extraction and high performance liquid chromatography for the determination of azithromycin in human plasma, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 39, 978 – 987, 2008
- 51) Alkhalidi B. A. et al.: Assessment of the Bioequivalence of Two Formulations of Clarithromycin Extended-Release 500-mg Tablets Under Fasting and Fed Conditions: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Period, Two-Way Crossover Study in Healthy Jordanian Male Volunteers, *Clinical Therapeutic*, 30, 1831 – 1843, 2008
- 52) Chiu M. H., Yang H. H., Liu Ch. H., Zen J. M.: Determination of lincomycin in urine and some foodstuffs by flow injection analysis coupled with liquid chromatography and electrochemical detection with a preanodized screen-printed carbon electrode, *Journal of Chromatography B*, 877, 991–994, 2009
- 53) Goyal R. N., Gupta V. K., Chatterjee S.: Fullerene-C60-modified edge plane pyrolytic graphite electrode for the determination of dexamethasone in pharmaceutical formulations and human biological fluids, *Biosensors and Bioelectronics* 24, 1649–1654, 2009
- 54) Santana M. B. et al.: Evaluation of the effects and mechanisms of action of flutriafol, atriazole fungicide, on striatal dopamine release by using in vivo microdialysis in freely moving rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009
- 55) South S. M., Edwards S. R., Smith M. T.: ANTINOCICEPTION VERSUS SERUM CONCENTRATION RELATIONSHIPS FOLLOWING ACUTE ADMINISTRATION OF INTRAVENOUS MORPHINE IN MALE AND FEMALE SPRAGUE-DAWLEY RATS: DIFFERENCES BETWEEN THE TAIL FLICK AND HOT PLATE NOCICEPTIVE TESTS, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36, 20–28, 2009
- 56) Mashayekhi S. O., Ghandforoush-Sattari M., Hain R. D, W.: Rapid and sensitive quantitation of morphine using HPLC with electrochemical detection, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 33, 419–427, 2008

- 57)Shanmugarajah D. et al.: Analysis of BNP7787 thiol-disulfide exchange reactions in phosphate buffer and human plasma using microscale electrochemical high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 877, 857–866, 2009
- 58)Zhu W. et al.: Effect of (*R*)-Salsolinol and *N*-Methyl-(*R*)-Salsolinol on the Balance Impairment Between Dopamine and Acetylcholine in Rat Brain: Involvement in Pathogenesis of Parkinson Disease, *Clinical Chemistry*, 54, 705–712, 2008
- 59)Gudes A. G. P., Papich M. G., Rude E. P., Rider. M. A.: Pharmacokinetics and physiological effects of intravenous hydromorphone in conscious dogs, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 31, 334–343, 2008
- 60)Blazewicz A., Fijalek Z., Warowna-Grzeskiewicz M., Banasiuk J.: Application of high-performance liquid chromatography with amperometric and coulometric detection to the analysis of SZ1677, a new neuromuscular blocking agent, and its two derivatives, *Journal of Chromatography A*, 1204, 114–118, 2008
- 61)Ubik K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie, Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, Sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice, Pardubice 2001
- 62)Holčapek M.: HPLC/MS od pohyblivého pásu k elektrospreji, Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, Sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice, Pardubice 2001
- 63)Fayet A. et al.: A LC–tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine, *Journal of Chromatography B*, 877, 1057–1069, 2009
- 64)ter Heine R. et al.: Quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in peripheral blood mononuclear cell lysate using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 877, 575–580, 2009
- 65)Damen C. W. N. et al.: Validated assay for the simultaneous quantification of total vincristine and actinomycin-D concentrations in human EDTA plasma and of vincristine concentrations in human plasma ultrafiltrate

by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 763–774, 2009

66) Schimmel K. et al.: Quantitative analysis of the experimental cytotoxic drug cyclopentenyl cytosine and its metabolite in plasma with HPLC tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 22, 1368–1373, 2008

67) Zhang W., Seymour L., Chen E. X.: Determination of intact oxaliplatin in human plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 876, 277–282, 2008

68) Jakusch T. et al.: Biospeciation of various antidiabetic VIVO compounds in serum, *Dalton Trans.*, 2428–2437, 2009

69) Lu S., Jiang K., Qin F., Lu X., Li F.: Simultaneous quantification of enalapril and enalaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 163–167, 2009

70) Park J. H. et al.: Quantification of isradipine in human plasma using LC–MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence study, *Journal of Chromatography B*, 877, 59–64, 2009

71) Franceschi L., Faggiani A., Furlanut M.: A simple method to monitor serum concentrations of fluoxetine and its major metabolite for pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 554–557, 2009

72) Matar K. M.: Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 822–828, 2008

73) Ryu J. H., Choi S. J., Lee H. W., Choi S. K., Lee K. T.: Quantification of roxatidine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study, *Journal of Chromatography B*, 876, 143–147, 2008

74) De Leo M., Giorgi M., Saccomanni G., Manera C., Braca A.: Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/ fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques, *Rapid Commun. Mass*

Spectrom. 23, 228–236, 2009

75)van der Heijden J., de Beer Y., Hoogtanders K., Christiaans M., de Jong G. J., Neef C., Stolk L.: Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009

76)Arinobu T. et al.: High-throughput determination of theophylline and caffeine in human serum by conventional liquid chromatography-mass spectrometry, *Forensic Toxicol.*, 27, 1–6, 2009

77)Homer N. Z. M. et al.: Quantitative analysis of RU38486 (mifepristone) by HPLC triple quadrupole mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 877, 497–501, 2009

78)Feng S. et al.: Rapid simultaneous determination of paracetamol, amantadine hydrochloride, caffeine and chlorpheniramine maleate in human plasma by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, *Drug Research*, 59, 86-95, 2009

79)Mallett D. N., Ramírez-Molina C.: The use of partially porous particle columns for the routine, generic analysis of biological samples for pharmacokinetic studies in drug discovery by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 100–107, 2009

80)Kiffe M., Schmid D. G., Bruin G. J. M.: Radioactivity Detectors for High-Performance Liquid Chromatography in Drug Metabolism Studies, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 1593 – 1619, 2008

81)Nováková L.: Pokroky v HPLC, instrumentace a software, chromatografické přístupy, přednáška pro studijní program Zdravotnická bioanalytika, předmět Speciální instrumentální metody, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2008

82)Skibinski R., Komsta L., Hopkala H., Suchodolska I.: Comparative validation of amisulpride determination in pharmaceuticals by several chromatographic, electrophoretic and spectrophotometric methods, *Analytica Chimica Acta* 590, 195–202, 2007

83)Guo N. et al.: The surface D2-binding profile of the atypical antipsychotic drug amisulpride, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27, PO30 – 02U, 2007



- 84) Santosh P. J., Baird G.: Pharmacotherapy of Target Symptoms in Autistic Spectrum Disorders, *Indian J. Pediatr.*, 68, 427-431, 2001
- 85) Sachse J., Härtter S., Weigmann H., Hiemke Ch.: Automated determination of amisulpride by liquid chromatography with column switching and spectrophotometric detection, *Journal of Chromatography B*, 784, 405–410, 2003
- 86) Malavasi B., Locatelli M., Ripamonti M., Ascalone V.: Determination of amisulpride, a new benzamide derivative, in human plasma and urine by liquid-liquid extraction or solid-phase extraction in combination with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, Application to pharmacokinetics, *Journal of Chromatography B*, 676, 107-115, 1996
- 87) Péhourcq F., Ouariki S., Bégaud B.: Rapid high-performance liquid chromatographic measurement of amisulpride in human plasma: application to manage acute intoxication, *Journal of Chromatography B*, 789, 101–105, 2003
- 88) Bergemann N., Kopitz J., Kress K. R., Frick A.: Plasma amisulpride levels in schizophrenia or schizoaffective disorder, *European Neuropsychopharmacology* 14, 245– 250, 2004

## **SOUHRN**

### **Způsoby detekce používané při HPLC analýzách léčiv v biologickém materiálu**

*Alžběta Kračmarová*

V práci je uveden přehled v současnosti používaných detekčních metod pro HPLC analýzu léčiv v biologickém materiálu a jsou zmíněny výhody a nevýhody jejich použití. V experimentální části je vypracována metoda stanovení atypického antipsychotika amisulpridu v plazmě pomocí HPLC s UV detekcí (235 nm). Byla použita kolona s náplní Separon SGX C18, 7  $\mu\text{m}$  a mobilní fáze acetonitril – 0,1M octan amonný (pH 5,6) 40:60 (v/v). S použitím ambroxolu jako vnitřního standardu byl celkový čas analýzy kratší než 14 minut. Metoda zatím nebyla validována.

## **ABSTRACT**

### **The ways of detection used for HPLC analysis of drugs in biological material**

*Alžběta Kračmarová*

The study consist of review and experimental part. The review covers recent methods of detection used for HPLC analysis of drugs in biological material, their advatages and disadvantages. In second part of study, HPLC method with UV detection (235 nm) for determination of amisulpride, atypical antipsychotic, in plasma was developed. Separon SGX C18, 7  $\mu\text{m}$  as a stationary phase, acetonitrile – 0,1 mol/l ammonium acetate (pH 5,6) as a mobile phase and ambroxol as an internal standard were used. Analysis time was below 14 minutes. The method was not validated.