

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

**Analýza fenobarbitalu v krvi
metodou SPME ve spojení off-line s HPLC**

(rigorózní práce)

Hradec Králové 2011

Mgr. Petra Blažková

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

Rigorózní práce vznikla za podpory projektu SVV 263 001.

18.5.2011

Děkuji Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za dohled, trpělivost, preciznost a odbornou pomoc nejen při praktickém výzkumu, ale také při vlastním sepsování rigorózní práce. Děkuji pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za ochotu kdykoliv pomoci v průběhu analýzy. Děkuji také fakultě za možnost posunu v oblasti vlastního vědění i za zprostředkování přístrojů, prostor, materiálu a literatury. Velký dík bych ráda věnovala své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mi byli motorem, podporou a poskytovali mi nemalou dávku tolerance, pochopení a povzbuzení.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Úprava vzorků biologického materiálu.....	9
2.1.1 Přímá injekce vzorku na chromatografickou kolonu	9
2.1.2 Deproteinace biologických vzorků.....	10
2.1.3 Extrakce biologických vzorků organickými rozpouštědly	11
2.1.4 Extrakce biologických vzorků na pevných fázích	12
2.1.5 Extrakce iontových párů	13
2.2 Extrakce na pevnou fázi.....	15
2.2.1 Princip SPE.....	15
2.2.2 Kolony a aparatura	16
2.2.3 Sorbenty a možnosti interakcí	18
2.2.4 Automatizace SPE.....	19
2.3 Mikroextrakce na tuhou fázi.....	20
2.3.1 Faktory ovlivňující SPME	21
2.3.2 Sorbenty	21
2.3.3 Vlákna.....	22
2.3.4 Vzorkování	22
2.3.5 Faktory ovlivňující výtěžek	23
2.3.6 Carry-over.....	24
2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	25
2.4.1 Přístrojové vybavení v HPLC.....	27
2.5 Validace analytických metod.....	29
2.5.1 Přesnost (precision)	30
2.5.2 Správnost (accuracy)	30
2.5.3 Linearita (linearity).....	31
2.5.4 Selektivita (selectivity)	32
2.5.5 Robustnost (robustness)	32
2.5.6 Detekční a kvantitativní limit.....	32
2.6 Charakteristika fenobarbitalu	34

2.7 Analýza fenobarbitalu v biologických vzorcích – informace z literatury	36
3. CÍL	41
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1 Materiál	44
4.2 Příprava roztoků.....	46
4.3. Postup	48
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	49
5.1 HPLC podmínky	51
5.2 SPME podmínky	52
5.2.1 Vláknó CW/TPR	52
5.2.2 Vláknó PDMS/DVB.....	65
5.3 Kalibrační křivka pro vláknó PDMS/DVB	71
5.4 Validace vypracované metody	77
5.4.1 Selektivita	77
5.4.2 Přesnost.....	79
5.4.3 Správnost.....	82
5.4.4 Linearita.....	84
5.4.5 Detekční a kvantitativní limit	84
5.4.6 Robustnost	85
6. ZÁVĚR	88
7. LITERATURA	90

1. ÚVOD

Farmacie je natolik rozsáhlý obor, že zasahuje do mnoha dalších disciplín. Ve spojitosti léčiv je nutno pomýšlet na řadu činností, které zabezpečují nejen výzkum a vývoj, ale také spolehlivou kontrolu, kterou může být dnes velmi důležité monitorování léčiv. Tato výzkumná činnost přináší výsledky, které jsou velkým přínosem při stanovení léčiv, jejich metabolitů a dále například při studiu farmakokinetiky, nebo při výzkumu léčiv z hlediska toxikologie.

Nová doba si žádá nové poznatky. Devadesátá léta přinesla pokrok v moderních technikách, a sice vývoj metody, která usnadnila analýzy řady léčiv a přinesla mnoho výhod při jejich zkoumání. Metoda mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) je často využívanou technikou, která spojuje rychlost, univerzálnost, nenáročnost na přístrojové vybavení, personál a finance. Principem je sorpce analyzované látky na křemenné vlákno potažené stacionární fází a následná desorpce buď prostřednictvím plynového, nebo kapalinového chromatografu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Úprava vzorků biologického materiálu ¹⁾

Téměř pro každé stanovení je nutné ještě před nástřikem na chromatografickou kolonu předčistit a nakoncentrovat biologický vzorek, neboť obsahuje řadu endogenních látek ve vysokých koncentracích, které působí při záznamu rušivě. Způsob úpravy souvisí s vlastnostmi biologického materiálu, s chemickou strukturou analyzované látky, její polaritou, rozpustností atd.

2.1.1 Přímá injekce vzorku na chromatografickou kolonu

Přímé dávkování vzorku na kolonu bez předchozí úpravy je možné jen ve výjimečných případech. Metabolity, jež vykazují fluorescenci nebo absorpci v UV oblasti, minimálně interferují balastní látky. Možným limitem může být fakt, že na kolonu lze vstříkovat jen malý objem biologických tekutin, a tedy koncentrace detekované látky musí být vysoká.

Neeluovatelné složky přítomné v biologickém vzorku při opakované přímé injekci na kolonu často způsobují její rychlé znehodnocení, vzrůst tlaku a změnu separačních vlastností. Tomu se dá předejít použitím předklony.

Metoda přímého nástřiku vzorku na analytickou kolonu je využívána při stanovení látek, které se ve vysoké koncentraci vylučují do moče. Této techniky bylo několikrát využíváno také pro stanovení různých léčiv v plazmě.

V roce 1983 byl vypracován nový systém automatizovaného předčištění a rychlého zakoncentrování látek, jež jsou obsaženy ve velkých objemech biologických tekutin, a to přímo na chromatografických

kolonách. Tato metoda bývá označována termínem „column switching HPLC“ a její nevýhodou je náročné přístrojové vybavení.

2.1.2 Deproteinace biologických vzorků

Precipitace proteinů deproteinačními činidly představuje nejjednodušší úpravu vzorku. Po centrifugaci lze čirý supernatant buď přímo nastříknout na kolonu, nebo odpařit do sucha a následně odparek rozpustit v malém objemu mobilní fáze.

Činidla, která lze použít k deproteinaci, mohou být různého charakteru, ať už se jedná o organická rozpouštědla mísitelná s vodou, silné kyseliny, soli těžkých kovů či kombinace více činidel. V roce 1981 byly zhodnoceny účinnosti 12 precipitačních činidel. Z testovaných organických činidel byla deproteinační schopnost v tomto pořadí: acetonitril > aceton > ethanol > metanol. Acetonitril je z těchto činidel nejpoužívanější. Z kyselin se jako vhodná deproteinační činidla osvědčila kyselina trichloroctová a chloristá. Soli těžkých kovů nebývá často využíváno. Kromě samotného typu použitého činidla je důležitý také jeho objem a koncentrace. Na těchto vlastnostech závisí kompletnost vysrážení proteinů.

Proteiny je možné separovat také ultrafiltrací a to přes semipermeabilní membrány, které jsou schopny zachytit téměř 99 % proteinů v séru, aniž by docházelo ke změně koncentrace léčiv v séru. Stanovované látky nesmí vykazovat specifickou vazbu na membrány. Použité membrány se dají regenerovat promytím nebo speciálním enzymatickým postupem.

Ultrafiltrační zařízení nachází své uplatnění v monitorování volných hladin léčiv v plazmě či séru. Pouze nevázaná část léčiva na proteiny je terapeuticky aktivní. Koncentrace volné frakce může být změněna při patologických stavech. Ostatní metody monitorování

sérových koncentrací léků stanovují celkovou hladinu léčiva, tedy volnou i vázanou.

Metoda je jednoduchá, rychlá a účinná, ale její použití je omezeno. Někdy vznikají při deproteinaci mikročástice, jež nelze centrifugou odstranit, a to vede k ucpání kolony nebo nástřikové smyčky. Další nevýhodou je vysoký obsah endogenních látek ve vzorku. Vzorky jsou deproteinací obvykle naředěny a jen alikvoty se nástřikují na kolonu. Tato neselektivní úprava bývá někdy nahrazena selektivními extrakčními metodami.

2.1.3 Extrakce biologických vzorků organickými rozpouštědly

Princip extrakce organickými rozpouštědly (liquid-liquid) spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny v rozdělovacím poměru K , který udává Nernstův zákon:

$$K = \frac{\text{celková koncentrace v organické fázi (mg/ml)}}{\text{celková koncentrace ve vodné fázi (mg/ml)}}.$$

Zákon platí pro ideální roztoky, kde extrahovaná látka nereaguje s žádnou složkou v obou fázích. Na základě rozpustnosti extrahovaných látek v obou fázích a rozdílu v rozdělovacím poměru K mezi nimi je voleno vhodné rozpouštědlo pro extrakci. V případě, že látka přechází spontánně do rozpouštědla, tedy hodnota K je větší než 1, pak stačí protřepání obou fází k převedení veškeré látky do rozpouštědla. Pokud je naopak hodnota K menší než 1, je doporučována buď vícestupňová extrakce, nebo častěji úprava pH vzorku. Úpravou pH vzorku se léčivo převede na neionizovanou formu a lépe přejde do organického rozpouštědla.

Rozpouštědla jsou volena s přihlédnutím na chemické vlastnosti extrahovaných látek, na jejich hydrofilní a hydrofobní skupiny, na aromatický či alifatický charakter. Vybraná činidla se nesmějí vzájemně příliš rozpouštět a nesmějí být příliš viskózní, aby rychle sedimentovala.

Dalšími důležitými vlastnostmi jsou kromě rozpustnosti extrahované látky také bod varu rozpouštědla a pH vzorku. Větší selektivity extrakce dosáhneme úpravou pH biologického vzorku přidáním pufrů, které jsou minimálně rozpustné v organickém rozpouštědle. Při vhodné změně pH nastane situace, kdy ionizovaná látka zůstane ve vodné fázi a analyzovaná látka, u které je ionizace potlačena, přejde do organického rozpouštědla. Účinnost extrakce je také někdy možno zvýšit přidáním vysolovacích činidel, které zvýší rozdělovací poměr extrahované látky. Těmito vysolovacími činidly jsou anorganické soli v pevném stavu, jako je NaCl, Na₂SO₄. Po provedené extrakci a následném oddělení jednotlivých fází pomocí centrifugy jsou organické fáze obsahující analyt odpařeny do sucha. Odparek je rozpuštěn v minimálním množství mobilní fáze a alikvot je nastříknut na kolonu. Tak je docíleno odstranění některých interferenčních látek a zároveň je vzorek nakoncentrován stanovovanými látkami.

Extrakční metody nevyžadují složitá zařízení, jejich výhodami je rychlost a možnost použití k separaci jednak většího množství látek, ale i pro stopové koncentrace. Nevýhodou je pak možnost vytvoření emulze s organickými rozpouštědly i časová náročnost a pracnost. Jednodušším postupem je použití extrakčních kolonek.

2.1.4 Extrakce biologických vzorků na pevných fázích

Tato technika je vhodná k rychlému a účinnému nakoncentrování, čištění a izolaci léčiv z roztoků na pevné sorbenty. Jedná se o organické nebo anorganické látky, které jsou schopny na svém povrchu sorbovat různé chemické sloučeniny. Využívá se zde pevných sorbentů, které musí splňovat tyto základní požadavky: nerozpustnost v používaných elučních systémech, inertnost k elučním systémům i k analyzovaným látkám a velká sorpční kapacita. Většinou jsou sorbenty látky s pórovitou strukturou a to buď polární, nebo nepolární. Mezi nejpoužívanější polární sorbenty patří silikagel, oxid hlinitý, oxid hořečnatý.

Zástupcem nepolárních organických sorbentů je často používané aktivní uhlí, jež se vyznačuje velkou sorpční kapacitou. Mimo jiné bylo například užito k nakoncentrování látek v moči a k izolaci barbiturátů ze séra. Dalšími nepolárními sorbenty jsou tzv. Amberlity XAD, tedy syntetické polystyrény. Tyto sorbenty jsou plněny do skleněných nebo umělohmotných kolonek. K separaci různých chemických skupin látek jsou využívány kolonky se sorbenty rozdílných vlastností.

Extrakce prováděná na pevných kolonkách je jednoduchá, rychlá, vykazuje dobrou výtěžnost a reprodukovatelnost. Díky navázaným fázím na sorbenty lze dosáhnout maximální selektivity separace látek s možností automatizace užitím vakuového systému. Tato extrakční metoda se proto jeví jako nejvhodnější pro izolaci léčiv a jejich metabolitů z biologických tekutin.

Kapitola 2.2 se touto problematikou zabývá detailněji.

2.1.5 Extrakce iontových párů

Jedná se o separační techniku, která funguje na principu vzniku komplexu ionizované látky s párovým iontem opačného náboje. Tento iontový pár je neutrální, tudíž přechází do organického rozpouštědla. K extrakci iontových párů z vodných roztoků se využívá většinou chloroform nebo metylenchlorid. Jako protiionty jsou využívány anorganické ionty (chloridy, bromidy, dusičnany atd.), organické ionty (alkylamonium, alkylsulfonáty), nebo povrchově aktivní ionty (alkylsulfáty, cetyltrimetylamonium bromid atd.).

Tato metoda byla dříve využita k separaci ionizovaných kyselých a bazických sloučenin, později byla technika rozvinuta a využita v HPLC chromatografii k regulaci retence, separace a selektivity. Ionizované sloučeniny se vyznačují jen malou retencí na kolonách s reverzní fází, což má za následek asymetrické a zdvojené píky. Tomu lze předejít použitím chromatografie iontových párů, kdy je do mobilní fáze přidáno vhodné iont-párové činidlo, jež s analyzovanou látkou vytvoří iontový pár. Tak je

analyzovaná látka více zadržována na koloně na reverzních fázích. Toto iontové párování lze využít i při HPLC stanovení na normálních fázích, kde silikagel tvoří nosič pro vodnou stacionární fázi obsahující protiiont. Mobilní fáze musí pak obsahovat rozpouštědla nemísitelná s vodou.

Chromatografie iontových párů našla široké uplatnění v biomedicínské aplikaci.

2.2 Extrakce na pevnou fázi ²⁾

Extrakce na pevnou fázi, solid phase extraction (SPE), je metoda zakoncentravání vzorku a oddělení analytů z roztoku pomocí sorpce, za kterou následuje desorpce, tedy eluce analytu do vhodného rozpouštědla.

Metodu extrakce liquid-liquid, jež je popsána v kapitole 2.1.3, má jisté nevýhody, které byly překonány se vznikem solid-phase extrakce, tedy extrakce na pevnou fázi. SPE je forma kapalinové chromatografie, která odděluje rozpuštěnou látku pomocí sorpce na pevnou fázi různým sorpčním mechanismem. V počátcích byly pro tuhou fázi voleny sorbenty typu polymerů, jako je pryskyřice. Následně byly také užívány sorbenty typu pryskyřice s navázanou fází C₁₈. Kolony jsou konstruovány z polypropylenu nebo polyetyleny a jsou plněny materiálem s různými funkčními skupinami. Vodný vzorek protéká kolonou a analyty jsou díky správné volbě vnitřní výplně kolony koncentrovány a čištěny. Vzorky mohou být na kolonu dávkovány buď pod tlakem, nebo pomocí vakua a to v objemu od 1 ml do 1 l. Jednou z mnoha výhod metody SPE je možnost automatizace a spojení s chromatografickou analýzou a v neposlední řadě také absence spotřeby velkého množství organických rozpouštědel.

2.2.1 Princip SPE

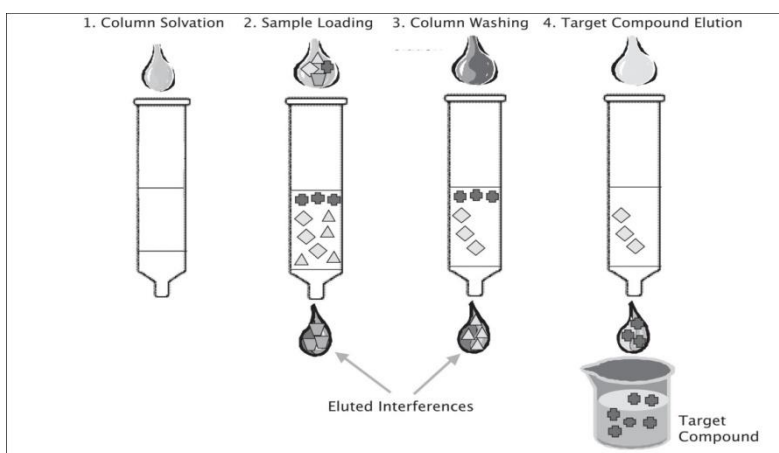
Prvním krokem procesu SPE je aktivace sorbentu, kdy rozpouštědlo protéká skrz sorbent. Dále je odstraněn vzduch přítomný v koloně, která je poté naplněna rozpouštědlem. Typickým rozpouštědlem je metanol, který bývá následován vodou nebo vodným pufrům.

Po aktivaci kolony je vzorek s přítomnými analyty aplikován na kolonu. Mechanismem zadržování analytu na koloně může být vznik van der Waalsových vazeb, vodíkových můstků, vazeb typu dipól-dipól, dále zachycování na základě velikosti molekul nebo kation-aniontová výměna.

Během tohoto kroku jsou analyty zkoncentrovány na pevném sorbentu, neboť některé složky ze vzorku jsou zadrženy v koloně, jiné projdou skrz.

Následuje vymývání kolony od zadržovaných analytů, které by mohly působit při hodnocení rušivě, přičemž zadrženo zůstává právě analyzovaná látka.

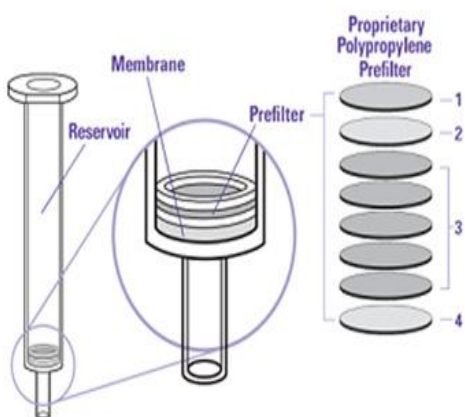
Konečným krokem je vymývání analytu ze sorbentu pomocí příslušného vhodného rozpouštědla, které je vybráno tak, aby došlo k narušení vazby analyt-sorbent.



Obrázek 1: Jednotlivé fáze SPE ³⁾

2.2.2 Kolony a aparatura

Sorbenty používané pro SPE bývají ve třech základních formátech: jako disky, zásobníky (cartridges), válcové stříkačky.



Obrázek 2: Zásobníky pro SPE ⁴⁾

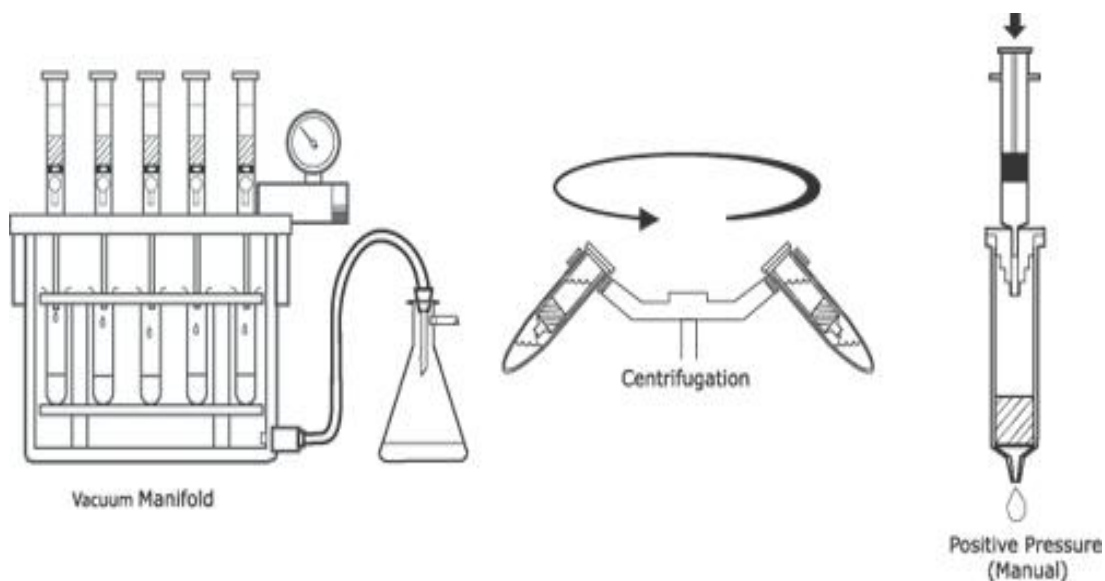


Obrázek 3: Válcové stříkačky ⁵⁾

Co se týká stříkaček, většina dnes používaných formátů pro SPE sestává z takových, které jsou tvořeny polypropylenem, dále někteří dodavatelé pro výrobu používají teflon. Díky podtlaku, pomocí vakua, dochází k eluci rozpouštědel skrz sorbent ve stříkačce. Celý systém je v tomto případě napojen na malou vakuovou pumpu a zásobník pro odpadní produkty. Ventily kohoutku je možné kontrolovat aplikaci vakua do jednotlivých kolon. Jiným používaným typem SPE může být centrifugace a pozitivní tlak, který je vyvíjen shora skrz stříkačku. Jednoduše na základě toku samospádem mohou být použity stříkačky nebo cartridge (zásobníky).

Druhým formátem SPE je zmíněný systém zásobníků (cartridges). Hlavním materiálem pro výrobu bývá polyetylen. Zásobníky pracují jak na principu pozitivního tlaku, tak na principu vakua.

Třetí typ SPE formátu je disk, který je konstruován v několika možných stylech v závislosti na příslušném výrobcí. Jeden z příkladů je sestava částíček plnicího materiálu, která je zapuštěna do vnitřní matrix z polytetrafluoretylenových vláken.



Obrázek 4: Kolony a aparatura pro SPE ⁶⁾

2.2.3 Sorbenty a možnosti interakcí

Sorbenty vyráběné pro metodu SPE jsou podobné jako u kapalinové chromatografie, včetně normální fáze, reverzní fáze, ale jsou také využívány sorbenty, které pracují na principu záchytu dle velikosti částic nebo na principu iontové výměny.

Normální fáze sestává z pevné fáze, která je více polární než rozpouštědlo vzorku. Proto např. voda obvykle nebývá použita jako rozpouštědlo, neboť je příliš polární. Primárním mechanismem záchytů analytu jsou vazby typu vodíkové můstky nebo dipól-dipól. Materiály sorbentů fáze reverzní jsou více hydrofobní než vzorek.

Reverzní fáze jsou tedy používány v okamžiku, kdy analyzovaný vzorek je vodného původu. Mechanismem interakce bývají Van der Waalovy síly a příležitostně také interakce jako jsou vodíkové můstky a vazby dipól-dipól.

Některé sorbenty pro zvýšení selektivity kombinují několik interakcí. Široká škála chemických struktur, ze kterých je sorbent sestaven, umožňuje

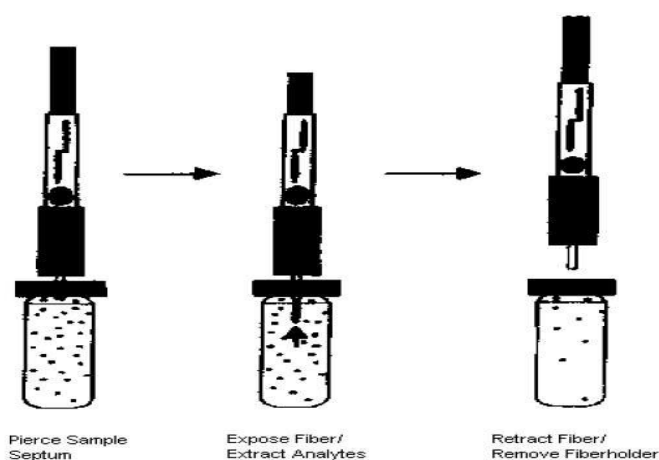
jeden z nejsilnějších aspektů SPE, a sice selektivitu. Selektivita je stav, kdy extrakční technika je schopna oddělovat analyt od vedlejších látek v původním vzorku. Právě množství možných interakcí mezi analyty a pevnou fází umožňuje selektivitu.

2.2.4 Automatizace SPE

Automatizace SPE metody může přinášet řadu výhod, především spolehlivost, lepší výsledky, finanční úsporu. Přináší pohodlnost ve smyslu lidské práce, kdy odpadá nudné pipetování, sestavování kolon nebo někdy zdlouhavý krok eluce atd. Systém automatizovaného SPE je schopen pracovat 24 hodin. Je to tedy možnost, jak si usnadnit práci, jak šetřit personál, místo i vybavení.

2.3 Mikroextrakce na tuhou fázi ⁷⁾

Mikroextrakce na tuhou fázi, tedy Solid Phase Microextraction (SPME), je sorpčně-desorpční analytická metoda, u které dochází k zakoncentrování analytu. Funguje na principu expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Analyzovaná látka je sorbována na vlákno do té doby, než dojde k ustálení rovnováhy. Hodnota rozdělovacího koeficientu určuje, kolik analytu se nasorbuje na vlákno.

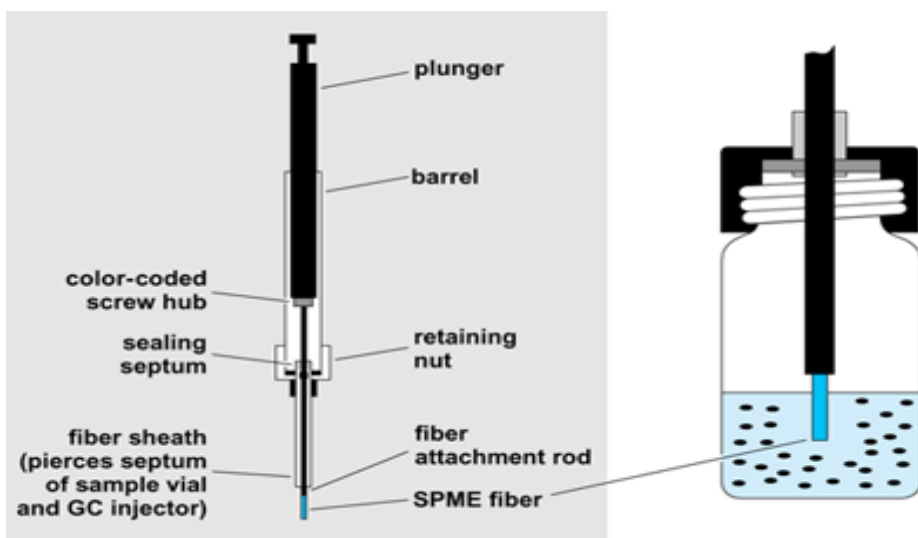


Obrázek 5: Princip mikroextrakce na vlákno ⁸⁾

Metoda byla poprvé publikována profesorem Januszem Pawliszinem na Univerzitě of Waterloo Ontario v Kanadě. Komerčně se prodává od roku 1993.

Technika SPME má hned několik výhod. Jednou z předností je možnost kombinace jak s kapalinovou, tak plynovou chromatografií. Metoda poskytuje lineární výsledky v širokém rozmezí koncentrací. I pro nízké koncentrace analytů je možno dosáhnout reprodukovatelné výsledky volbou vhodného typu vlákna. Je nenáročná nejen na technické vybavení, ale také například na použítá rozpouštědla. Urychluje analytický postup, neboť vzorkování a úprava vzorku probíhají v jenom kroku. Metodu

lze využít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzy. Velký přínos je také v možnosti automatizace metody.



Obrázek 6: SPME vlákno ⁹⁾

2.3.1 Faktory ovlivňující SPME

- Volba stacionární fáze (tloušťka, polarita)
- Podmínky sorpce (úprava vzorku, poloha vlákna, teplota, doba, míchání)
- Podmínky desorpce (umístění vlákna, teplota, délka, typ a objem rozpouštědla)

2.3.2 Sorbenty

- Homogenní čisté pomylery
 1. PDMS (polydimetylsiloxan) – nepolární
 2. PA (polyakrylát) – polární
- Porézní částice/polymer, do kterého jsou suspendovány
 1. Carboxen™/PDMS
 2. DVB (divinylbenzen)/PDMS
 3. Carboxen™/DVB/PDMS

2.3.3 Vlákna 7)

Typ vlákna: ADSORBENT	Typ vlákna: ABSORBENT
porézní materiál	homogenní vrstva polymeru
plocha povrchu	sorpce závisí na tloušťce vrstvy
sorpce je kompetitivní	sorpce není kompetitivní
limitovaná kapacita vlákna	velká kapacita vlákna
nepokryté křemenné vlákno Carboxen™/PDMS DVB/PDMS PDMS/CW (carbowax) DVB/ Carboxen™ -PDMS TPR/CW	PDMS PA

Při SPME analýze se doporučuje začínat s vláknem PDMS nebo PA. Tato vlákna mají výhodu ve velké kapacitě a mají široký lineární rozsah kalibrace. Polarita vlákna je zvolena podle polaritý předpokládaných analytů. Pro dosažení vyšší citlivosti je pro analýzu vhodné použít vlákna typu adsorbentů, např. DVB nebo Carboxen. Výběr závisí na molekulové hmotnosti látky.

2.3.4 Vzorkování

Vzorkování je možno provádět dvěma způsoby. Jednak přímým kontaktem vlákna se vzorkem, tedy ponořením do vzorku, nebo druhou možností, z prostoru, tj. z plynné fáze po head-space úpravě vzorku. Obě varianty mají svoje přednosti, ale i nevýhody.

	Ponoření vlákna do vzorku	Vzorkování z plynné fáze
Výhody	<ul style="list-style-type: none"> - možnost extrakce netěkavých látek - rychlejší ustavení rovnováhy 	<ul style="list-style-type: none"> - vlákno není v kontaktu s roztokem
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> - vlákno může být zničeno látkami v roztoku 	<ul style="list-style-type: none"> - delší ustavení rovnováhy - větší vliv teploty - větší vliv konstantnosti míchání

2.3.5 Faktory ovlivňující výtěžek

Na výtěžnost metody má vliv řada faktorů. Některé mohou přímo zvýšit extrakční účinnost, jiné zkracují dobu, za kterou dojde k ustavení rovnováhy. Tyto faktory avšak mohou mít také nevýhody, proto je třeba zvážit, jaké podmínky analýzy budou při experimentu zvoleny.

Pro snížení času potřebného k dosažení rovnováhy je možno přidat při mikroextrakci míchání např. na magnetické míchačce. Je nutné si dát pozor na nekonstantní míchání, které by mohlo výsledky zhoršit. Vhodné je také k tomuto účelu použít ultrazvuk, kdy je vzorek zahříván.

Metoda vysolování ^{7,10,11,12,13,14,33}), tedy přidavek soli do vzorku, je dalším způsobem, jak ovlivnit výtěžnost. Principem je vznik neutrálních molekul po přidavku vhodné soli, které mají sníženou rozpustnost. Nevýhodou mohou být ionizované analyty, které zvyšují iontovou sílu. Je preferován roztok, ve kterém je kombinováno vysolování spolu s úpravou pH.

SPME není obecně závislá na objemu, resp. velikosti vialek. Výjimku tvoří vyšší koncentrace analytů a látky s vysokou distribuční konstantou. Pak dochází ke vzniku nelineární kalibrační křivky. Je

doporučováno používat silanizované vialky o objemu 2-15 ml a teflonová septa.

2.3.6 Carry-over ^{10,11,12,35)}

Carry-over je v literatuře popisováno jako jev, kdy dochází k převodu léčiva z předchozího užití vlákna, tedy vzájemná kontaminace. Na vláknech je zadržována ta část analyzované látky, která se při desorpci neuvolní do desorpčního media a ani při následném vymývání do rozpouštědla při přečištění před další mikroextrakcí. Tento jev je popsán u řady látek včetně barbiturátů ¹²⁾. Uvolnění veškerého analytu z vlákna je docíleno opakovanou desorpcí ^{11,12)}.

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) představuje separační techniku, která je díky řadě výhod zároveň jednou z nejčastěji používaných analytických metod. Je vhodná pro dělení netěkavých látek, u nichž je analýza plynovou chromatografií obtížná. Jako všechny chromatografické metody spojuje separaci látek a jejich následné hodnocení, umožňuje analýzu látek ve směsích, jako jsou lékové přípravky, nebo rostlinný a biologický materiál.

Chromatografická separace látek je provedena technikou eluce, kdy kolonou protéká mobilní fáze. Mobilní fáze protéká skrz kolonu konstantní rychlostí a její složení je neměnné v případě, že se jedná o isokratickou eluci. Naopak při gradientové eluci se mění složení mobilní fáze s časem, tedy dochází ke zvyšování její eluční síly.

Metoda HPLC poskytuje kvalitativní i kvantitativní výsledky ¹⁵⁾, umožňuje hodnocení totožnosti, čistoty a obsahu. Kvalitativním výstupem metody je poloha píku, tedy retenční čas. Pro kvalitativní hodnocení se využívá metoda standardů. Za kvantitativní informaci je považována plocha, nebo výška píku. Tyto veličiny jsou odpovídající pro koncentraci/množství látky. Pro získání kvantitativních informací se využívá těchto způsobů hodnocení ¹⁵⁾:

- a) metoda vnějšího standardu
- b) metoda standardního přídavku
- c) metoda vnitřního standardu
- d) metoda vnitřní normalizace

Metoda vnějšího standardu: Závislost mezi plochou, resp. výškou píku a koncentrací stanované látky se nejčastěji určuje metodou kalibrační křivky. Analyzuje se série standardů o různé, ale známé koncentraci a hledá se

závislost kalibrační funkce $X=fK(c)$. Neznámý obsah látky se pak určí pomocí funkce $c=fA(x)$. Jestliže kalibrační křivka prochází počátkem, pak můžeme použít metodu porovnání s jedním vnějším standardem, kdy vzorek s hledanou koncentrací a kalibrační vzorky jsou připravovány a analyzovány odděleně.

Stanovovanou koncentraci je pak možné vypočítat ze vztahu:

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

kde A_i je plocha stanovované látky o neznámé koncentraci c_i , plocha standardu A_s se získala proměřením tohoto standardu o koncentraci c_s .

Metoda standardního přídavku: Při této metodě se porovnává signál vzorku se signálem, získaným po přidání známých přídavků standardů stejného druhu jako je stanovovaná látka. Ke vzorku se přidá známé množství látky, u které se má stanovit koncentrace. Provádí se dva nástřiky, kdy jeden představuje přesné množství vzorku a druhý přesné množství směsi. Metodu lze použít, je-li mezi plochou píku a koncentrací analytu lineární vztah.

Metoda vnitřního standardu: Principem této metody je to, že ke vzorku o objemu V_i a neznámé koncentraci c_i je přidán definovaný objem standardu V_s o známé koncentraci c_s , přičemž látky se musí dobře separovat a standard by se měl eluovat v blízkosti stanovované látky. Směs se nadávkuje a vyhodnotí se plochy standardu A_s a stanovované látky A_i . Pak pro koncentraci vzorku platí:

$$c_i = R_{IS} \frac{V_s}{V_i} \cdot \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s ,$$

kde R_{IS} je relativní odezva detektoru stanovované látky vůči vnitřnímu standardu. Výhodou je, že celá analýza je uskutečněna v jednom nástřiku.

Metoda vnitřní normalizace ¹⁶⁾: Při této metodě se postupuje tak, že se provede nástřik analyzované směsi a vyhodnotí se všechny plochy a určí se

relativní zastoupení všech složek směsi. Nedostatkem této metody je nutnost znalosti všech odezvoových faktorů a to znamená úplnou identifikaci chromatogramu. Další nevýhodou je fakt, že výsledkem je pouze bezrozměrné číslo, udávající procentové zastoupení určité složky ve vzorku. Omezením pro použití této metody je také to, že některé komponenty nejsou eluovány nebo jsou nedetekovatelné.

2.4.1 Přístrojové vybavení v HPLC ^{1, 17, 18)}

Čerpadla: Čerpadla plní úlohu dopravování mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí, nebo v případě gradientové eluce zajišťují mísení mobilní fáze. Aby nedocházelo k poškození mechanickými nečistotami z protékajících směsí, je doporučeno rozpouštědla před použitím přefiltrovat.

Dávkovače: Výhodou novějších injektorů je zajištění stejných objemů vzorků, jež jsou dávkovány na kolonu. Je možná jejich automatizace. Automatické dávkovače (autosamplery)⁹ navazují na zásobník vzorku, v němž se nachází vialky (malé zkumavky) s pryžovým septem nebo perforovanou polypropylenovou zátkou. Jehla bývá oplachována, aby nedocházelo ke znečištění vzorků z předchozí dávky.

Kolony: Kolony mají zásadní vliv na celou analýzu. Při jejich výběru se zohledňuje délka, tvar, vnitřní povrch, materiál, typ sorbentu aj. Nejčastěji uplatňovanou náplní kolony je reverzní fáze, která bývá tvořena sorbentem SiO₂ s chemicky vázaným řetězcem C₈ nebo C₁₈. Analyzovaná látka tvoří s řetězcem vazby typu vodíkových můstků, nebo Van der Waalsových sil. Normální fáze ze silikagelu vytváří s analytem silikátové skupiny. Pokud se separují enantiomery ¹⁹⁾, probíhá analýza na chirálních stacionárních fázích vznikem diastereoisomerů, které dovolují separaci páru enantiomerů. Prvním způsobem je přímá separace, kdy vzniká diastereoisomer mezi chirální stacionární fází (resp. chirálním aditivem) v mobilní fázi a enatiomerem. Naopak nepřímá separace probíhá v achirálním prostředí. Existují kolony,

které jsou tvořeny jedním kusem pórovitého materiálu, jež zaplňuje celý vnitřní prostor separační kolony. Tyto kolony se označují jako monolitické.

Detektory: S využitím snímače detektory převádí hodnoty analytu na elektrický signál. Tento signál je následně zapisován a vyhodnocen počítačovou technikou. Detektory mohou být spektrofotometrické, refraktometrické, fluorimetrické, elektrochemické, nebo hmotnostní.

Vyhodnocovače dat: Zařízení, která vyhodnocují chromatogramy, poskytují kvantitativní výsledky v podobě tabulky, kterou lze v průběhu měření sledovat na obrazovce počítače.

Velmi hojně je v laboratořích využíváno spojení separačních a moderních analytických metod. Metoda HPLC ve spojení s technikou hmotnostní spektrometrie (MS - Mass Spectrometry) vypadá v praxi tak, že v první fázi dojde k rozdělení složek směsi pomocí kapalinové chromatografie a u jednotlivých složek se poté analyzují jejich chemické struktury metodou MS. Kombinace těchto technik spojuje výhody vysoké separační účinnosti HPLC a získání strukturních informací díky metodě MS.

2.5 Validace analytických metod²⁰⁻²³⁾

Podmínky metody, která je zvolena pro analytické hodnocení, je vhodné validovat. Cílem validace je dokázat, že metodu je možno dále využít a výsledky analýzy jsou spolehlivé. K prokázání vhodnosti metody slouží experimentální data a jejich matematické a statistické zpracování.

Číselným prokázáním toho, že analytický postup byl zvolen správně, je tzv. *test vhodnosti použité metody (systém suitability test)*. U chromatografických metod se doporučuje provést alespoň jeden z těchto testů:

1. dělicí účinnost systému (počet teoretických pater pro kolonovou chromatografii),
2. asymetrie píku,
3. rozlišení píků,
4. čistota píku nebo identita,
5. opakovatelnost analýzy,
6. stabilita vzorku a standardů.

Vlastní validace metody znamená číselné prokázání toho, že získané výsledky jsou správné, přesné a reprodukovatelné. Validace zahrnuje tyto sledované parametry:

1. přesnost (precision),
2. správnost (accuracy),
3. linearita (linearity),
4. robustnost (robustness),
5. selektivita (selectivity) a
6. detekční a kvantitativní limit

2.5.1 Přesnost (precision)

Přesnost vyjadřuje míru shody výsledků, které jsou získány z několika nezávislých měření. Přesnost má dvě formy, a to opakovatelnost, kdy jeden pracovník měří jeden vzorek opakovaně na stejném přístroji, a reprodukovatelnost, kdy stejný vzorek analyzují různí pracovníci na různých přístrojích a na různých místech (tento test není zcela běžný).

V praxi se měření přesnosti provádí následovně:

Připraví se šest vzorků s analyzovanou látkou postupem, který je zvolen pro analýzu jako optimální. Nástřikem na chromatografickou kolonu se zjistí plochy píků (A_i) pro hlavní i pro vedlejší látky (nečistoty, produkty degradace). Ze získaných hodnot se vypočte průměr (A_p) a směrodatná odchylka (s) podle vzorců:

$$A_p = \frac{A_i}{n} = \frac{(A_i - A_p)^2}{(n-1)},$$

$$\text{relativní směrodatná odchylka: } s_R = \frac{100 s}{A_p}.$$

2.5.2 Správnost (accuracy)

Správnost charakterizuje shodu mezi získaným výsledkem C_i (koncentrace modelového vzorku) a referenční hodnotou C_0 (známá koncentrace), která představuje buď skutečný známý obsah látky, nebo obsah zjištěný jinou metodou, u které je správnost zaručena.

Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (R), která se zjistí výpočtem ze vzorce:

$$R_i (\%) = \frac{100 c_i}{c_0},$$

$$R_p = \frac{R_i}{n} = \left[\frac{(R_i - R_p)^2}{(n-1)} \right],$$

$$S_E = \left[\frac{(R_i - 100)^2}{n} \right].$$

$$\text{Relativní směrodatná odchylka: } s_R = \frac{100 s}{R_p}.$$

2.5.3 Linearita (linearity)

Linearita vyjadřuje schopnost metody vykazovat v daném intervalu výsledky úměrné koncentraci analyzované látky ve vzorku. Tento test je kvalitativní a jeho zobrazením je křivka závislosti plochy píku na koncentraci analytu.

Postup má následující charakter:

Připraví se pět vzorků standardní látky v uvedeném koncentračním rozmezí a s každým se provede nástřik do chromatografu třikrát. Jednotlivé koncentrace a k nim odpovídající plochy píků vytvoří dvojice $n(x, y)$ a ty se využijí pro zpracování lineární regrese:

$$y = b_0 + b_1 x + \dots,$$

$$b_0 = y_p - b_1 x_p \quad b_1 = \frac{(y_i - y_p)(x_i - x_p)}{(x_i - x_p)^2},$$

$$\text{kde } x_p = \frac{x_i}{n} \quad y_p = \frac{y_i}{n},$$

$$\text{korelační koeficient } r = \frac{(y_i - y_p)(x_i - x_p)}{(y_i - y_p)^2 (x_i - x_p)^2},$$

Pro výpočet směrodatné odchylky experimentálních dat od regresní přímky s_e se vypočítají reziduály

$$i = y_i - Y_i,$$

$$\text{kde } Y_i = b_0 + b_1 x_i \quad s_e = \frac{i^2}{(n-2)}.$$

Požadavek je, aby žádný reziduál nebyl v absolutní hodnotě větší než $2s_e$.

2.5.4 Selektivita (selectivity)

Přesnost analytického měření nesmí být ovlivněna vedlejšími látkami, jako jsou nečistoty, rozkladné produkty nebo látky pomocné. U analytické metody je možno stanovit analyt v přítomnosti vedlejších látek pomocí validačního parametru selektivita.

Testuje se tak, že se připraví jeden roztok standardu a přidá se přibližně 5 % látek vedlejších. Hodnotí se, zdali neinterferují hlavní analytická látka s látkami vedlejšími.

U biologických vzorků se srovnávají 3 chromatografické záznamy, z nichž jeden představuje nástřik standardu analyzované látky, druhý nástřik biologické matrice s přidavkem hodnocené látky a třetí nástřik samotné biologické matrice, tedy slepý vzorek.

2.5.5 Robustnost (robustness)

Metoda je považována za robustní v případě, že přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. U testu robustnosti se připraví jeden vzorek standardu, opakovaně se nastříkne do chromatografu a změří se odpovídající plochy signálu analyzované látky *A*. V tomto experimentu se mění pracovní podmínky (proměnné) na dvou úrovních – spodní a horní. Proměnné jsou voleny tak, aby zahrnovaly faktory, které by mohly ovlivnit průběh analýzy. Úrovně těchto změn se zvolí tak, aby představovaly reálně možné odchylky od optimálních hodnot.

2.5.6 Detekční a kvantitativní limit

LOD (Limit of Detection) – detekční limit je charakterizován jako nejnižší koncentrace látky, která je ještě detekovatelná, nestanovená kvantitativně a za přesně definovaných podmínek; je to trojnásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu – šumu.

LOQ (Limit of Quantification) – kvantitativní limit vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností; je to desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

Směrodatnou odchylku šumu je možno odhadnout v rámci měření slepého vzorku ze záznamu šumu v okolí retenčního času vlastní stanovované látky. Středem šumu je vedena linie, od které se změří největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu. Toto rozpětí šumu je po vydělení pěti odhadem jeho směrodatné odchylky:

$$s_n = \frac{(r^+ - r^-)}{5}$$

Dále se vypočtou detekční a kvantitativní limit podle vzorců:

$$LOD = \frac{3 s_n K}{b_1},$$

$$LOQ = \frac{10 s_n K}{b_1},$$

Kde K je poměr plochy píku a výšky píku, hodnota je charakterizující pro stanovovanou látku, b_1 je poměr plochy píku a koncentrace analytu, kdy tento poměr je dán směrnici regresní rovnice (viz Linearita 2.5.3).

2.6 Charakteristika fenobarbitalu ²⁴⁻²⁷⁾

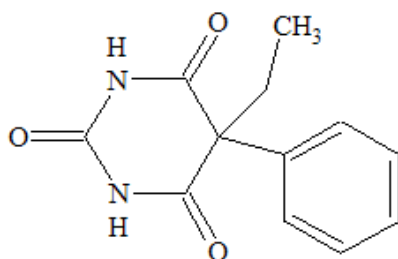
Lékopisný název ²⁴⁾: Phenobarbitalum

Chemický název: 5-ethyl-5-fenylpyrimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion

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

Sumární vzorec: C₁₂H₁₂N₂O₃

Strukturní vzorec:



- Fyzikálně chemické vlastnosti

Vzhled: bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly ²⁴⁾

Molekulová hmotnost: 232,2

pKa: 7,4 (25°C)

Rozpustnost: voda 1 g⁻¹, ethanol 1:10, chloroform 1:40, ether 1:40

- Farmakologické vlastnosti ²⁷⁾

Maximální denní dávka: 0,4 g

Maximální jednotlivá dávka p.o.: 0,2 g (ČL 2009)

Absorpce perorální dávky: 80 až 100 %

Metabolismus: biotransformace játry a vylučování močí

- Použití

Fenobarbital se používá jako hypnotikum a v nízkých dávkách jako sedativum a antiepileptikum. Léčivé přípravky s obsahem fenobarbitalu jsou buď v tabletové formě, nebo ve formě injekcí. S obsahem fenobarbitalu nalezneme na českém farmaceutickém trhu hlavně přípravky kombinovaných.

2.7 Analýza fenobarbitalu v biologických vzorcích – informace z literatury ²⁸⁻³⁷⁾

Při optimalizaci podmínek analýzy bylo čerpáno z prací, které se podobnou problematikou již zabývaly. Data získaná z literatury posloužila k lepší orientaci v problematice a usnadnila vypracování celé metodiky. Pro rešerši bylo využito národní knihovny MEDLINE (z let 1997-2010), která poskytla informace, jež byly vodítkem pro jednotlivé kroky experimentu. V této kapitole je uveden stručný nástin z některých článků.

- **Fedorova, Baram a spol.** ²⁸⁾ popsali využití mikro-kolon HPLC pro izolaci fenobarbitalu a karbamazepinu z lidského krevního séra. Přečištění séra probíhalo následujícím způsobem: Ke 120 μ l vzorku séra byl přidán 1 ml hexanu a směs byla míchána po dobu 5 minut. Pomocí centrifugy došlo k oddělení lipidových složek rozpustných v hexanu. Z každé části extrakčních produktů bylo 50 μ l doplněno chloristanem lithným v acetonitrilu a po centrifugování bylo 5-10 μ l z každé části supernatantu dávkováno na kolonu HPLC. Použitá analytická kolona C₁₈ měla rozměry 2 x 75 mm. Detekce proběhla s gradientovou elací pomocí rozpouštědel acetonitrilu a 0,2 M chloristanu lithného (pH 2). Průtok byl 150 μ l/min, UV detekce probíhala při 210 nm. Pro přípravu standardů byl použit methanol. Vzorky o jednotlivých koncentracích posloužily ke kalibraci.
- **Yang a Xie** ²⁹⁾ ve své práci uvedli použití nového druhu membrány (SPMEM) pro metodu SPME. Analýze byl podroben dichlorvos v krvi, morfin a fenobarbital v moči. Membrána (0,5 mm) byla syntetizována komplexem polyamidů a amidů. Vlastně připravená membrána má vysokou extrakční kapacitu. Při stanovení nízkých koncentrací vzorku bylo doporučeno použití vhodného vnitřního

standardu. Jako optimální čas pro nasycení membrány, tedy adsorpční čas, bylo zvoleno 5 minut, kdy byla membrána ponořena do kofeinového roztoku. Pro desorpční rozpouštědlo byly ukázány jako vhodné methanol, ethanol a aceton. Během desorpce byl použit ultrazvuk, který zkrátil dobu pro nasycení vlákna až na 1 minutu. Desorbované analyty v ethanolu byly dále stanoveny pomocí GC-MS. Byla použita kapilární kolona. Pro fenobarbital byla zvolena teplota 200°C po dobu 10 minut. Nosným plynem bylo helium a tlak byl 72 kPa.

- **Queiroz, Silva a Carvalho** ³⁰⁾ využili pro determinaci antiepileptik včetně fenobarbitalu metody SPME-GC-TSD (termoionická specifická detekce). 1 ml vzorku plazmy byl doplněn chloridem sodným v množství 15 %. Pro docílení hodnoty pH 7 byl dále přidán pufr fosforečnanu draselného. Teplota po dobu extrakce byla 30°C a směs byla míchána 15 minut. Pro desorpci byla zvolena doba 4 minuty, kdy detektor ukazoval vysokou výtěžnost a zároveň byl zjištěn minimální výskyt carry-over. Další hodnocení proběhlo pomocí plynové chromatografie s termoionickou specifickou detekcí. Metoda byla podrobena validaci, kdy byla mimo jiné prokázána dobrá linearita v rozmezí hodnot 0,05 až 40,0 µg/ml.
- **Hannak, Haux a spol.** ³¹⁾ zveřejnili svou práci analýzu fenobarbitalu, fenytoinu, teofylinu pomocí kapalné chromatografie. Při testování byl použit vnitřní standard (5-allyl-5-isobutylbarbiturová kyselina) 1 mg/ml ve směsi methanol:voda (1:1). Roztok standardu byl použit od firmy Abbott. K vysrážení agentů došlo díky naředění 2 ml vnitřního standardu acetonitrilem na objem 100 ml. Mobilní fáze pro HPLC představovala směs 50 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0, dále 200 ml acetonitrilu a 750 ml vody (neionizované a přefiltrované). Činidlo bylo připraveno přidáním 200 µl vysráženého činidla s vnitřním standardem ke 100 µl roztoku fenobarbitalu (20 mg/ml). Vzorek

sestával ze 100 µl séra, obohaceného o 200 µl vysráženého činidla s vnitřním standardem. Následovala centrifuga po dobu 5 minut. Objem dávkovaného supernatantu činil 50 µl. Průtokové rychlost byla 2 ml/min na kolonu o velikosti částic 5 µm. UV detekce probíhala při 212 nm.

- **Marca, Malvagia a spol.** ³²⁾ zvolili pro analýzu fenobarbitalu z krve metodu kapalně chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií (MS). Při sestavování kalibrační křivky byl použit vnitřní standard D₅-fenobarbital. Roztok standardu fenobarbitalu o koncentraci 1 µg/l a vnitřního standardu D₅-fenobarbitalu byl připraven rozpuštěním látky ve směsi methanol:voda (80:20). Pro kapalnou chromatografii byla použita chromatografická kolona o rozměrech 2 x 150 mm (velikost částic 4 µm). Mobilní fázi představovala směs methanol:voda (80:20) a její průtok kolonou byl 0,2 ml/min. Eluent vycházející z kolony byl dále směřován na sondu „TurbolonSpray“. 2 µl extrahovaného vzorku byly dávkovány do aparatury LC-MS.
- **Iwai, Hattori a kol.** ³³⁾ popsali detekci fenobarbitalu z biologického materiálu (z krve a moči) metodou SPME v kombinaci s GC-MS. Jako rozpouštědlo pro standard fenobarbitalu byl zvolen methanol. Vzorek byl připraven přidáním 10 µg fenobarbitalu k 0,5 ml krve, resp. moči. Další úprava vzorku zahrnovala okyselení na pH 6-7 pomocí hydroxidu sodného a dále přidání 0,5 g síranu sodného. Sorpce probíhala po dobu 60 minut při teplotě 60 °C, po níž následovala 10 minutová desorpce. Pro GC-MS analýzu byla použita HP-1 kolona o rozměrech 30 m x 0,25 mm I.D.

- **García-Borregón, Lores a Cela** ³⁴⁾ představili izolaci fenobarbitalu technikou mikro-HPLC a fotochemickou derivatizací. Příprava standardu spočívala v rozpuštění analyzovaného léčiva v methanolu a pro sestavení stupnice příslušných koncentrací standardu byla k ředění použita směs methanolu a vody v poměru 50:50. Jako mobilní fáze byla zhotovena směs 50 dílů methanolu a 50 dílů fosfátového pufru o pH 7. Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. UV-detekce probíhala při 220 nm, nebo v případě derivovaných barbiturátů při 270 nm.
- **Hall a Brodbelt** ³⁵⁾ uvedli postup pro detekci fenobarbitalu (a dalších sedmi barbiturátů) za využití metody SPME a GC-MS s analyzátozem na principu iontové pasti. Jako extrakční vlákno bylo zvoleno carbowax-divinylbenzen (DVB). Vzorek pro mikroextrakci byl připraven z acetonového nebo methanolického roztoku barbiturátů, a to naředěním deionizovanou vodou. Desorpce probíhala při 250 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 minut a následně bylo vlákno přesunuto z injektoru do ledu. Byl zaznamenán pozitivní vliv přídavku chloridu sodného na výslednou výtěžnost, optimální přídavek byl zvolen v množství 25 %. Použitá analytická kolona PTE-5 měla parametry 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μm d_f.
- **Cantú, Toso a kol.** ³⁶⁾ se zabývali analýzou celé skupiny léčiv, mezi něž patřil i fenobarbitalu, a to technikou SPME v kombinaci s LC. Mobilní fáze byla směsí fosfátového pufru (0,01 M, pH 7), dále acetonitrilu a methanolu. Roztok standardu fenobarbitalu a vnitřního standardu byl připraven rozpuštěním látky v methanolu. 50 μl připraveného standardu a vnitřní standard 4-methylprimidon byl přidán ke vzorku plazmy. Takto získaný vzorek byl ještě obohacen o NaCl a fosfátový pufr (pH 5), než mohl být použit pro 30 minutovou sorpci za teploty 30 $^{\circ}\text{C}$. Desorpce probíhala 10 minut do 50 μl mobilní fáze. Pro SPME bylo

vybráno vlákno carbowax/pryskyřice (CW/TPR, 50 μm). Chromatografická kolona RP-18 měla rozměry 125 mm x 4 mm x 5 μm a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

- **Moriyama, Yamashita a kol.** ³⁷⁾ ve své práci popsali postup pro determinaci fenobarbitalu z plazmy pomocí HPLC. Methanolicke vzorky fenobarbitalu o stanovených koncentracích byly uzavřeny v kapiláře. Podíl ploch píků PB a vnitřního standardu (IS) vyjadřovalo množství léčiva. Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a KH_2PO_4 (0,01M) v poměru 25:75. Průtok mobilní fáze analytickou kolonou C_{18} (4 x 125 mm) byl 0,8 ml/min. UV detekce probíhala při 210 nm. Kapilární plazma byla vložena na SPE předkolonu s použitím 1 ml 0,01 M KH_2PO_4 . Na kolonu bylo dávkováno množství 30 μl . Pro vnitřní standard byl připraven roztok acetonitrilu o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$. Kolona byla dvakrát promývána s 1 ml KH_2PO_4 a následně byl fenobarbital a vnitřní standard extrahován do 250 μl methanolu.

3. CÍL

Cílem rigorózní práce je určení podmínek pro stanovení fenobarbitalu v krvi pomocí metody mikroextrakce tuhou fází (SPME) ve spojení off-line s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). V textu dále jen HPLC-SPME.

Práce obsahuje tyto dílčí části:

- Optimalizace podmínek metody HPLC-SPME pro stanovení fenobarbitalu ve vzorku krve
- Sestrojení kalibrační křivky
- Validace vypracované metody

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

Biologický materiál

- králíčí krev (Eldoret s.r.o., Praha, ČR)

Léčiva a chemikálie

- Phenobarbitalum (RNDr. Jan Kulich, Praha, ČR)
- methanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- voda pro HPLC
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lachema n.p., Brno, ČR)
- kyselina fosforečná 85 % p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)

Materiál pro metodiku

a) chromatografický materiál

- analytická kolona Discovery HS C₁₈, 150 x 4,6 mm I.D. (5µm), (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

b) materiál pro mikroextrakci

- extrakční vlákno PDMS/DVB 100µm Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- extrakční vlákno carbowax 100µm Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- držák pro SPME vlákno Supelco, Bellefonte USA (Sigma Aldrich, Praha, ČR)

Přístroje

- analytické váhy HR-120 (A&D Company Ltd, Japonsko)
- pH metr Acidimetr 333 (Druopta, Praha, ČR)
- ultrazvuk K10 (Krainek s.r.o., Nové Zámky, SR)
- magnetická míchačka MM2A (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)
- čerpadlo Spectra System P 1000 (Thermo Separation Products, USA)
- autosampler Spectra System AS 1000 (Thermo Separation Products, USA)
- UV detektor Spectra System UV 3000 HR (Thermo Separation Products, USA)
- PC program ChromQuest 4.2.34 (Thermo Electron 2003, USA)

4.2 Příprava roztoků

Mobilní fáze

K 50 ml methanolu bylo přidáno 50 ml vody a po promíchání byla směs odvzdušněna na ultrazvukové lázni

Fosfátový pufr ²⁴⁾

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

Standard fenobarbitalu

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

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

Vzorek pro SPME

Vzorek pro mikroextrakci byl připraven přidáním 50 μ l standardu fenobarbitalu o koncentraci 10 mg/ml k 0,5 ml krve a po rozpuštění léčiva a promíchání byla směs naředěna pomocí 4,5 ml vody.

Kyselina fosforečná 0,85%

1 ml kyseliny fosforečné 85 % bylo doplněno vodou na objem 100 ml.

Kyselina fosforečná 0,43%

50 ml kyseliny fosforečné 0,85 % bylo doplněno vodou na objem 100 ml.

4.3. Postup

Optimalizace podmínek HPLC-SPME pro stanovení fenobarbitalu v krvi

Prvním krokem rigorózní práce bylo vymezení nejvhodnějších podmínek pro izolaci fenobarbitalu ze vzorku krve a následnou analýzu metodou HPLC.

Po celou dobu experimentu byla používána analytická kolona Discovery HS C₁₈ (5µm). Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 218 nm.

Jako optimální mobilní fáze byla zvolena směs složená z methanolu a vody v poměru 50:50. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min (tlak 7,6 MPa).

Rozpouštědlo pro standard fenobarbitalu představovala směs 80 dílů methanolu a 20 dílů fosfátového pufru.

Při těchto podmínkách byl retenční čas léčiva 7,5 minut.

U metody SPME byly porovnávány dva typy extrakčních vláken a sice: polydimethylsiloxan v kombinaci s divinylbenzenem (PDMS/DVB) a dále carbowax v teplátové pryskyřici (CW/TPR).

Před vlastní extrakcí bylo 0,5 ml vzorku krve s léčivem naředěno na objem 5 ml. Tento vzorek byl upraven na hodnotu pH, při které byla výsledná extrakční účinnost nejvyšší, tedy na pH 6,5.

Sorpce ze vzorku krve na vlákno probíhala 20 minut za stálého míchání. Následovala desorpce do 200 µl methanolu po dobu 20 minut. Poté bylo k desorpčnímu mediu přidáno 50 µl fosfátového pufru a následoval nástřik 20 µl na kolonu a analýza HPLC za výše uvedených podmínek. Sorpce 20 minut, desorpce 20 minut - v práci dále uváděno jako standardní doba SPME.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Stanovení fenobarbitalu v králičí krvi probíhalo metodou SPME ve spojení off-line s HPLC. Podmínky, za kterých analýza probíhala, byly vytýčeny na základě studia rešerší, poznatků získaných v DP ³⁸⁾ a jejich praktického ověření.

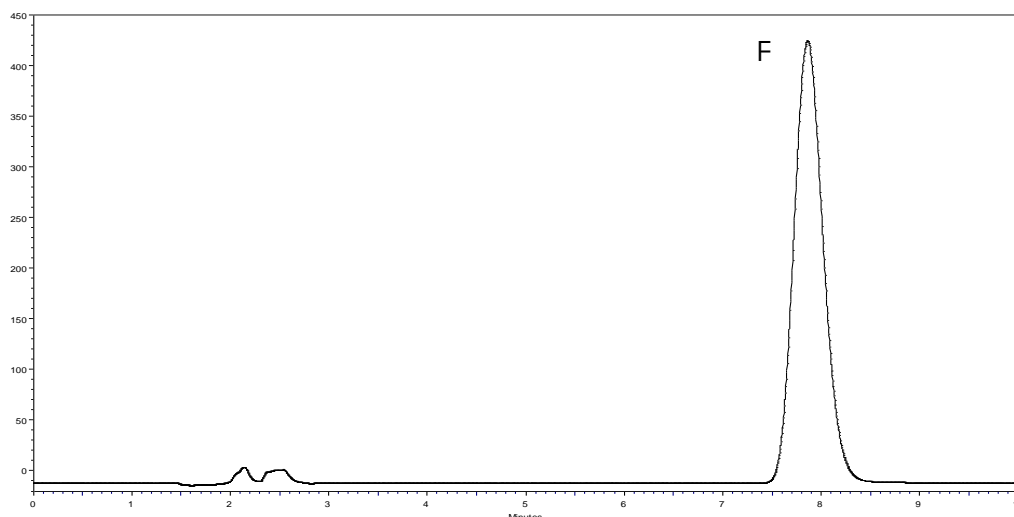
5.1 HPLC podmínky

Jak bylo zmíněno, pro optimalizaci HPLC podmínek bylo využito informací získaných v DP. Pro analýzu fenobarbitalu ze vzorku krve byla použita kolona od jiného výrobce než v DP, což vysvětluje odlišnou průtokovou rychlost a změnu složení mobilní fáze. V DP obsahovala mobilní fáze pufr, který byl ředěn vodou.

Detekce probíhala v oblasti UV při 218 nm na analytické koloně Discovery HS C₁₈ s parametry 150 x 4,6 mm (částice 5 µm).

Mobilní fáze, jež protékala kolonou, byla složena z 50 dílů methanolu a 50 dílů vody. Byla testována také mobilní fáze obsahující methanol a fosfátový pufr v poměru 50:50. Toto složení však nevyhovovalo pro výsledná vyobrazení píků, kdy jejich tvar byl neuspokojivý. Zvolená směs představující mobilní fázi protékala kolonou rychlostí 0,6 ml/min při tlaku 7,6 MPa.

Standard fenobarbitalu byl připravován rozpouštěním ve směsi složené z 80 dílů methanolu a 20 dílů pufru. Retenční čas byl cca 7,5 minut



Obrázek 7: HPLC záznam standardu fenobarbitalu (c = 0,1 mg/ml). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

5.2 SPME podmínky

V DP ³⁹⁾ byly při stanovení fenobarbitalu ze vzorku vody a následně plazmy získány poznatky, které sloužily jako výchozí pro optimalizaci podmínek při izolaci léčiva z krve. V DP byla testována vlákna PDMS/DVB a carbowax, která se často používají v odborné literatuře pro hodnocení barbiturátů ^{35,36)}. V DP bylo zjištěno, že při 10 minutové izolaci není léčivo detekovatelné. Optimální čas sorpce i desorpce činil 20 minut. Byl také ověřován vliv změny pH vzorku na výtěžnost fenobarbitalu. S okyselováním vzorku se výtěžnost zvyšovala.

Při optimalizaci podmínek SPME pro hodnocení ze vzorku krve byla testována vlákna CW/TPR a PDMS/DVB.

Vzorek krve o koncentraci 0,1 mg/ml fenobarbitalu byl podroben mikroextrakci na vlákno za stálého míchání na magnetické míchačce. Sorpce i desorpce probíhala 20 minut (v práci dále uváděno jako standardní doba). Po sorpci bylo z vlákna léčivo desorbováno do 200 µl methanolu. Po 20 minutách desorpce bylo do zkumavky s desorpčním médiem přidáno 50 µl fosfátového pufru, což odpovídalo výslednému poměru složek zvoleného rozpouštědla standardu. S takto připraveným vzorkem byla provedena detekce léčiva metodou HPLC za podmínek, jež jsou výše uvedeny.

5.2.1 Vlákno CW/TPR

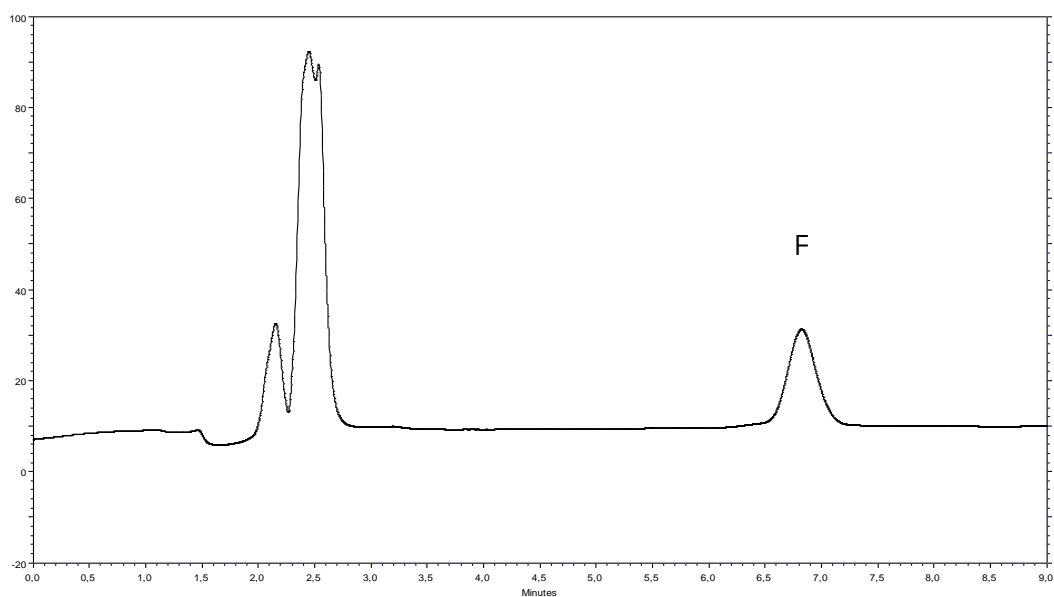
Doba mikroextrakce

Na vlákně CW/TPR byl testován vliv zvýšení času desorpce. Již v DP bylo zjištěno, že zvýšení času má pozitivní vliv na výtěžnost léčiva.

Vlákno po standardní době sorpce (20 minut) bylo ponořeno do 200 µl methanolu na 30 minut a ve druhém případě na 40 minut. Po

chromatografické analýze byl zhodnocen vliv delší doby desorpce jako pozitivní, neboť přinesl zvýšení extrakční výtěžnosti téměř o 1 %. Při 20 minutové desorpci se extrahovalo 2,63 % léčiva. Po 30 minutách desorpce byla výtěžnost 3,40 %, po 40 minutách pak 4,36%.

Níže je uveden chromatografický záznam (obrázek 8), který byl získán při tomto měření. Tabulka 1 shrnuje vliv zvýšení doby desorpce na výtěžnost. Hodnoty ploch píků jsou průměrem ze dvou nástřiků na kolonu.

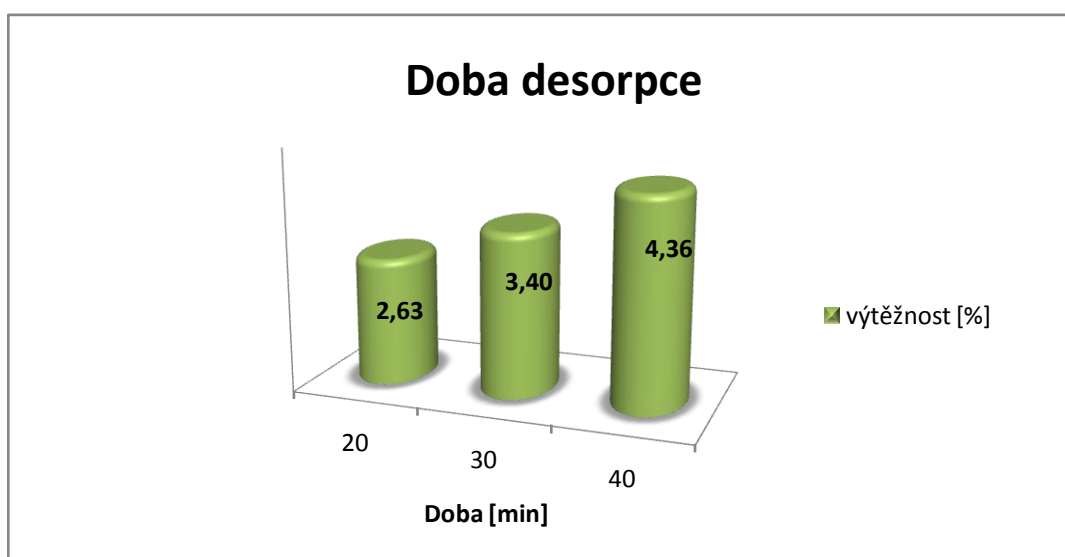


Obrázek 8: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřik po mikroextrakci na vlákno carbowax. Doba desorpce 40 minut. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

Tabulka 1: Vliv doby desorpce na výtěžnost léčiva

Sorpce [min]	Desorpce [min]	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
20	20	227 362	2,63
20	30	301 629	3,40
20	40	386 942	4,36

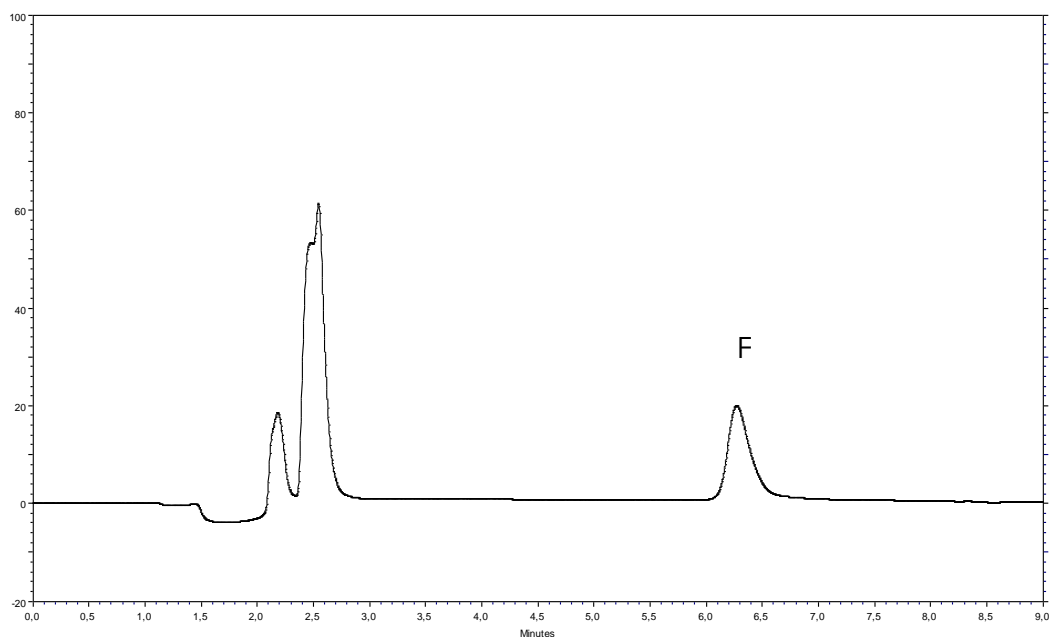
Graf 1: Výtěžnost léčiva při různých dobách desorpce



pH vzorku

Byl sledován vliv úpravy pH vzorku na výslednou výtěžnost při standardním čase extrakce, tedy 20 minut sorpce a následně 20 minut desorpce. Ke zvýšení acidity sloužila kyselina fosforečná 0,85% a kyselina

fosforečná 0,43 % (dále jen kyselina fosforečná). Pro přehled byla sestavena škála jednotlivých hodnot pH a pro ně odpovídající výsledky výtěžnosti. Bez přídavku kyseliny fosforečné bylo pH vzorku 8,6 a výtěžnost činila 2,63 %. Nejvíce léčiva bylo detekováno po mikroextrakci ze vzorku upraveného na pH 6,5 a to s výsledkem výtěžnosti 3,71 %. Dále bylo pro další postup pH vzorku upravováno na hodnotu 6,5.

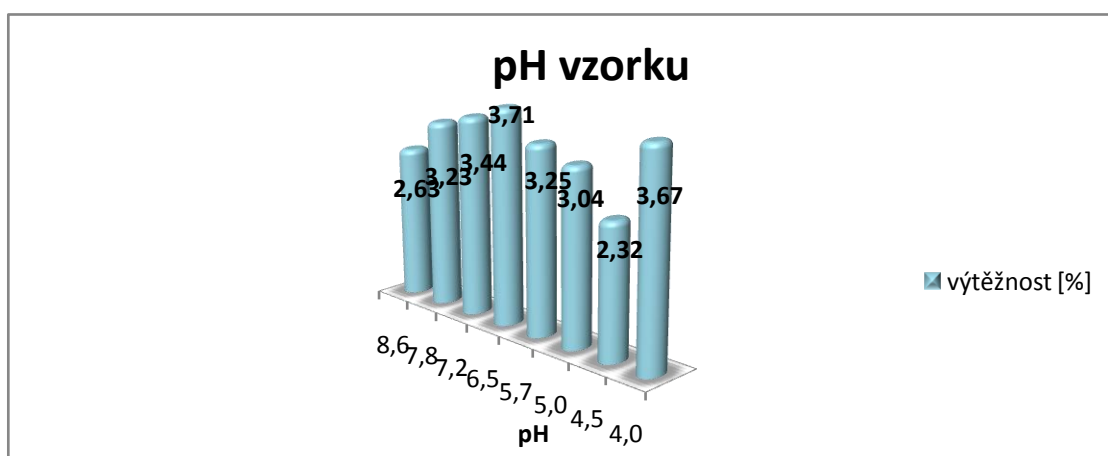


Obrázek 9: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřik po mikroextrakci na vlákno carbowax. Vzorek upraven na pH 6,5. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3

Tabulka 2: Vliv pH na výtěžnost léčiva

pH vzorku	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
8,6	227 500	2,63
7,8	279 806	3,23
7,2	297 653	3,44
6,5	320 857	3,71
5,7	280 956	3,25
5,0	262 775	3,04
4,5	200 506	2,32
4,0	317 789	3,67

Graf 2: Výtěžnost léčiva při různých hodnotách pH vzorku



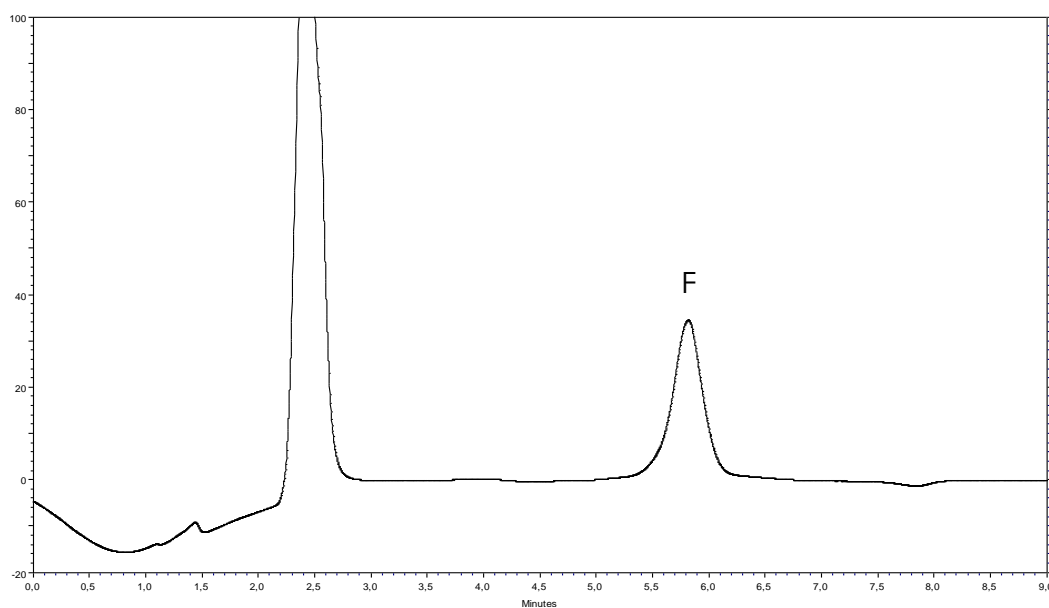
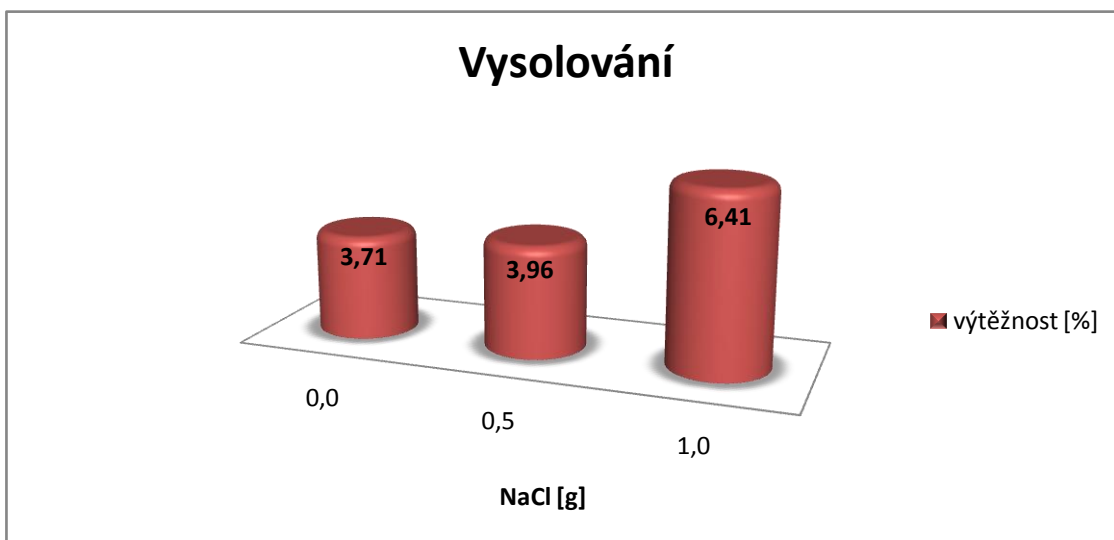
Vysolování

Na základě informací získaných z prací, které se zabývaly touto problematikou ^{30,33,35,36}, byla testována metoda vysolování, což představovalo přidání určitého množství látky k jednotlivým vzorkům před samotnou mikroextrakcí. To mělo za následek zvýšení výtěžnosti léčiva. V praxi se jednalo o postup, kdy k 5 ml připraveného vzorku krve s léčivem, okyseleného pomocí kyseliny fosforečné na pH 6,5 byl přidán chlorid sodný v množství 0,5 g nebo v množství 1,0 g a po důkladném rozpuštění byl vzorek podroben mikroextrakci standardním postupem. Významný vliv byl potvrzen získanými hodnotami výtěžnosti. Bez přídavku chloridu sodného byla výtěžnost 3,71 %, po přidání 0,5 g chloridu sodného se výtěžnost zvýšila na 3,96 % a přídavkem 1,0 g až na 6,41 %.

Tabulka 3: Vliv metody vysolování na výtěžnost léčiva

Množství přidaného NaCl [g]	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
0,0	320 857	3,71
0,5	342 857	3,96
1,0	554 507	6,41

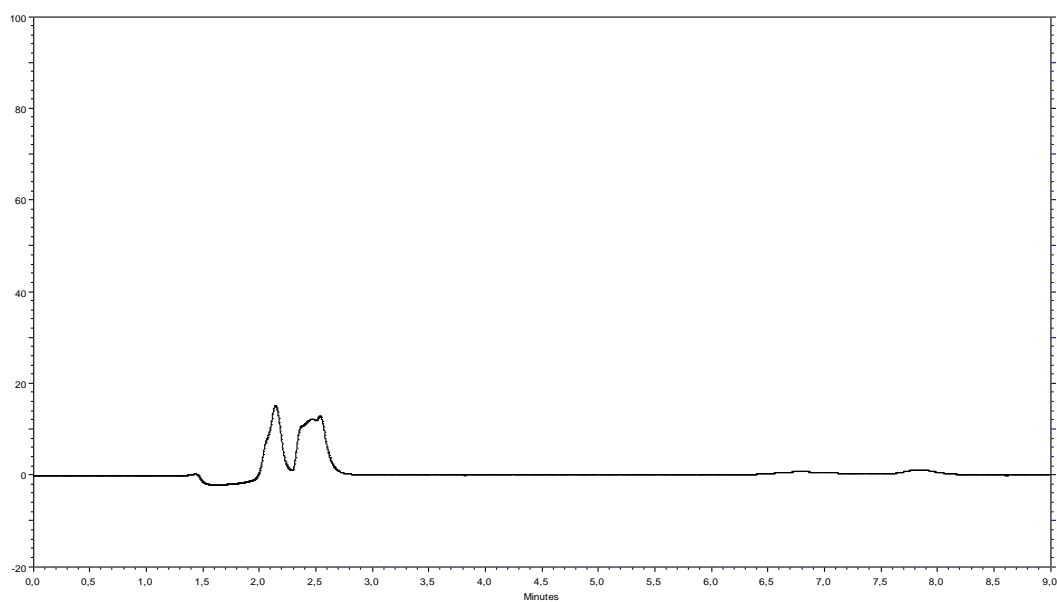
Graf 3: Výtěžnost léčiva po přidání chloridu sodného



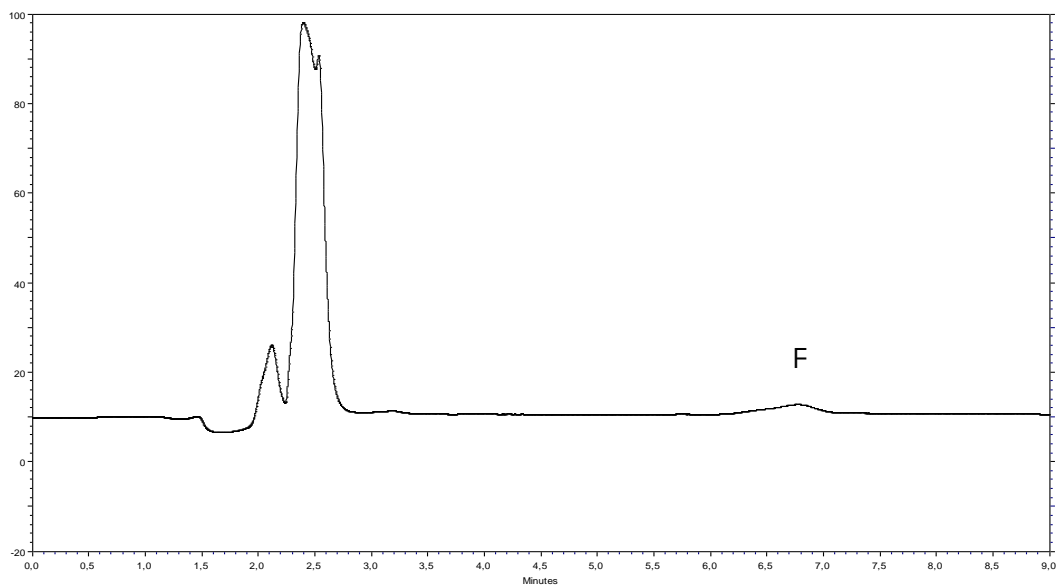
Obrázek 10: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřik po mikroextrakci na vlákno carbowax. Ke vzorku přidáno 1,0 g NaCl. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

Vymývání

Mezi jednotlivými extrakcemi bylo vlákno vždy ponořeno do 5 ml methanolu a za stálého míchání na magnetické míchačce vymýváno po dobu 20 minut, než bylo opětovně použito pro další extrakci. Po celodenním používání jednoho vlákna byla detekovatelná jistá rezidua léčiva, která se nasorbovala na vlákno při několika extrakcích a nevymyla se do methanolu. Na konci dne bylo vlákno vymýváno 60 minut a následující den ještě před jeho použitím dalších 30 minut (tedy celkem 90 minut). Poté již nebyly zjištěny žádné stopy fenobarbitalu zachycené na vlákně (viz obrázek 11), a tudíž mohlo být vlákno použito pro další extrakce. Jako lepší řešení lze uvést doporučení, aby vlákno mezi jednotlivými extrakcemi bylo vymýváno nejméně 40 minut místo 20 minut a poté bylo provedeno ověření, zda již nejsou usazena žádná rezidua, aby se mohlo s jistotou pokračovat v další analýze. Při testování vysolování se zachováním standardní doby 20 minut pro vymývání bylo prováděno ověření reziduí na vlákně. Toto ověření spočívalo ve 20 minutové desorpci a následném nástřiku na kolonu. Bylo zjištěno, že na vlákně zůstávalo zachyceno do 0,9 % léčiva (viz obrázek 12).



Obrázek 11: HPLC záznam reziduí na vlákně carbowax, získaný po 90 minutách vymývání. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.



Obrázek 12: HPLC záznam reziduí na vlákne carbowax, získaný po 20 minutách vymývání. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

Kalibrační křivka

Na podkladě získaných výsledků byly vytýčeny podmínky pro izolaci fenobarbitalu s využitím vlákna CW/TPR a bylo provedeno kvantitativní stanovení, respektive sestrojení kalibrační křivky s následujícím postupem.

Pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny vzorky krve s odstupňovanou koncentrací fenobarbitalu (viz tabulka 4). Každý vzorek krve byl naředěn, dále upraven na pH 6,5 pomocí kyseliny fosforečné a poté byl přidán 1,0 g chloridu sodného. Sorpce probíhala na vlákno CW/TPR po dobu 20 minut. Desorbovalo se 40 minut do 200 μ l methanolu. K desorpčnímu médiu bylo přidáno 50 μ l pufru a byl proveden nástřik na kolonu. Vlákno bylo před dalším použitím vymýváno 20 minut v 5 ml methanolu za stálého míchání.

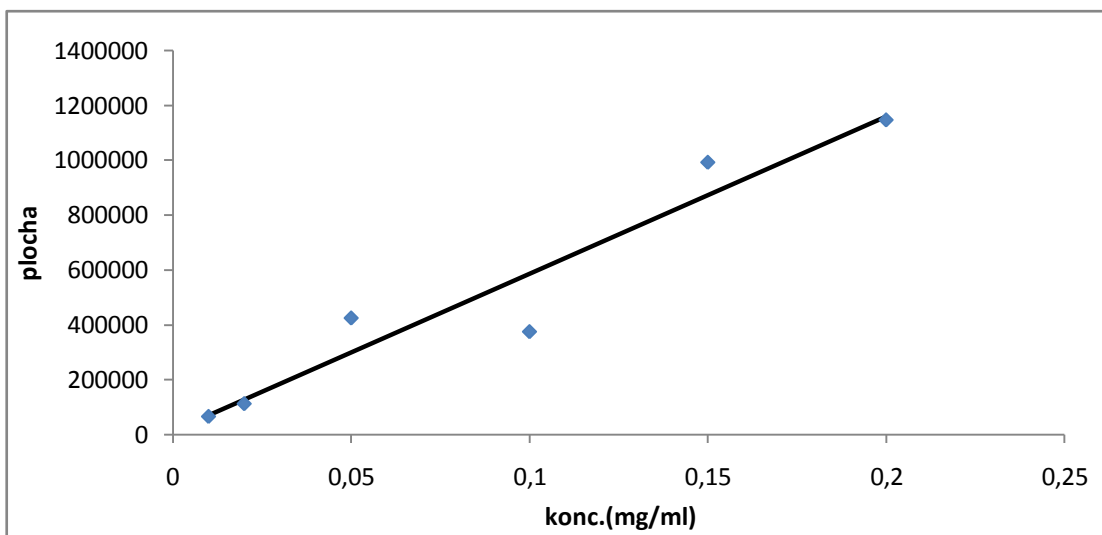
Tabulka 4: Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku při různých množstvích přidaného standardu fenobarbitalu

Množství přidaného standardu [μl]	Koncentrace vzorku [mg/ml]
5,00	0,01
10,00	0,02
25,00	0,05
50,00	0,10
75,00	0,15
100,00	0,20

Tabulka 5: Plochy píků při mikroextrakci fenobarbitalu ze vzorku krve s
přídavkem chloridu sodného za použití vlákna CW/TPR.

Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku [mg/ml]	Plochy píků jednotlivých měření	Průměrná plocha píku
0,01	66 501	66 501
0,02	122 075	113 064
	104 052	
0,05	395 965	425 217
	454 469	
0,10	318 881	375 511
	432 640	
0,15	907511	992 572
	1 077 633	
0,20	1 111 630	1 146 977
	1 182 324	

Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka i přesto, že hodnota pro koncentraci 0,1 mg/ml byla odlehlá.



Obrázek 13: Kalibrační křivka pro izolaci fenobarbitalu na vlákně CW/TPR

Regresní funkce : $y = kx + q$

Počet bodů $n = 6$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 5,73E+6 \pm 8,1E+5$
absolutní člen	$1,4E+4 \pm 9,1E+4$

koeficient korelace	$R = 0,962$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 1,37E+5$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti 0,01

Dále pro srovnání těchto výsledků se postup opakoval na témže vlákně (CW/TPR), ale bez přídavku NaCl a s časy sorpce 20, desorpce 20 (získané výsledky jsou v následující tabulce).

Tabulka 6: Plochy píků při mikroextrakci fenobarbitalu ze vzorku krve bez přídavku chloridu sodného za použití vlákna CW/TPR.

Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku [mg/ml]	Plochy píků jednotlivých měření	Průměrná plocha píku
0,01	338 674	324 677
	310 479	
0,02	238 842	252 798
	266 753	

Došlo zde k nepředvídané skutečnosti. S nově připravenými vzorky bylo kvantitativní stanovení provedeno pro srovnání bez přídavku chloridu sodného. Při tomto experimentu bylo zjištěno, že výsledky analýzy nejen, že neměly lineární tendenci, ale od třetího vzorku dokonce nebylo možné v chromatografickém záznamu fenobarbital detekovat. Po několikerém testování různých koncentrací se nedostávalo odpovídajících výsledků.

V praxi se projevil carry-over (viz. kapitola 2.3.6). To znamená, že se na vlákne zadržela část sorbovaného léčiva a neuvolnila se ani při desorpci a ani při následném vymytí do methanolu. Tento problém se objevil až po přidavku NaCl do vzorku krve. Vlákno CW/TPR bylo proto nutno opakovaně a delší dobu vymývat, než bylo možno jej použít k další mikroextrakci. V kapitole vymývání je uvedeno doporučení doby pro vymývání vlákna mezi jednotlivými extrakcemi, a to nejméně 40 minut místo 20 minut s následným prověřením, zda již nejsou usazena žádná rezidua.

U testovaných vzorků krve (bez přidavku NaCl) připravených pro kalibrační křivku bylo, jako řešení pro mikroextrakci, využito vlákno PDMS/DVB, na kterém byl proveden identický postup mikroextrakce a bylo ověřeno, že vlákno je schopno poskytnout adekvátní výsledek. V záznamech chromatogramu bylo léčivo detekovatelné, a tedy hodnotitelné. Proto bylo pro další hodnocení fenobarbitalu ve vzorcích krve použito vlákno PDMS/DVB.

5.2.2 Vlákno PDMS/DVB

Při mikroextrakci na vlákne PDMS/DVB nebylo experimentováno s vysolováním. Před použitím bylo vlákno aktivováno 30 minut v methanolu. Mezi jednotlivými mikroextrakcemi bylo vlákno vždy ponořeno do 5 ml methanolu a za stálého míchání na magnetické míchačce vymýváno po dobu 20 minut, než bylo opětovně použito pro další extrakci. Experimentálně bylo ověřeno, že se z vlákna neuvolňuje fenobarbital. Toto ověření spočívalo v 20 minutové desorpci a následném nástřiku desorpčního media na kolonu.

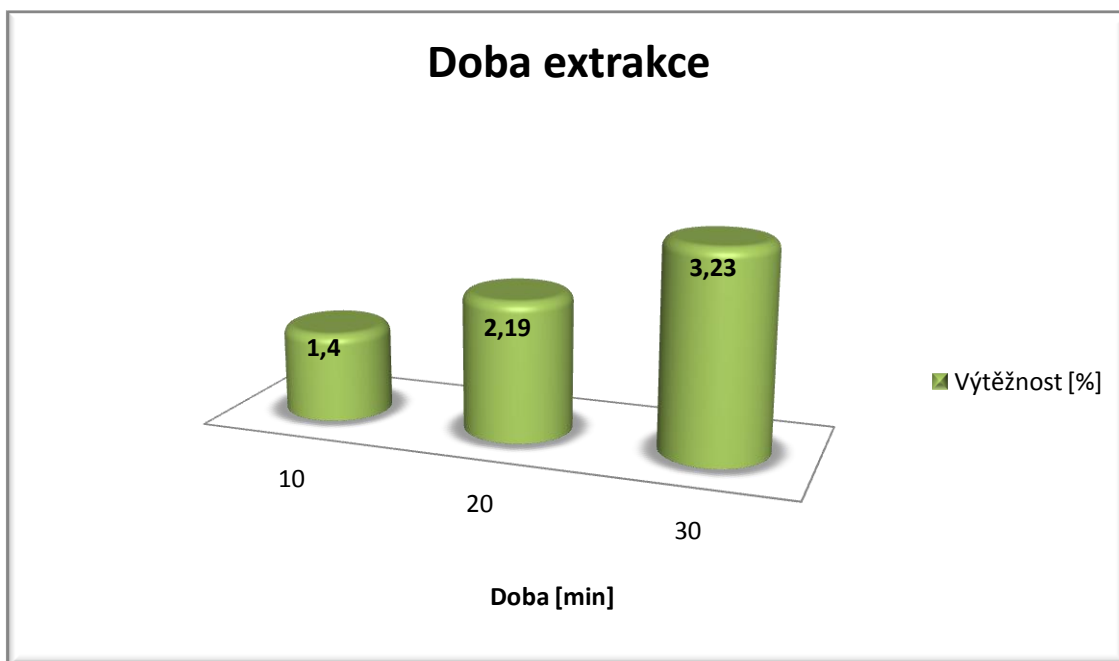
Doba mikroextrakce

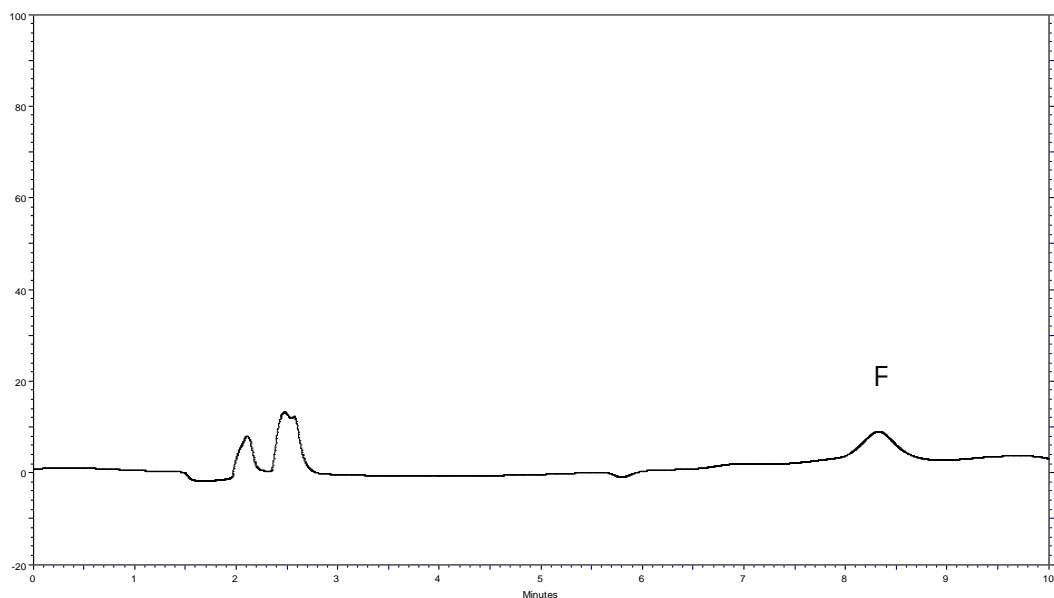
Na vlákne PDMS/DVB byly prověřovány změny ve výtěžnosti v závislosti na různých časech extrakce. Srovnány byly výsledky získané při době extrakce 10 minut, dále 20 minut a také 30 minut. Byl prokázán předpoklad zvyšující se výtěžnosti léčiva s rostoucím časem extrakce. Při extrakčním čase 10 minut se sorbovalo 1,40 % fenobarbitalu, při době extrakce 20 minut 2,19 % a při zvýšení na 30 minut to bylo 3,23 % léčiva. Pro zjištění, zda na výtěžnost má vliv sorpce, nebo spíše desorpce, byl proveden pokus se zvýšením pouze doby sorpce na 30 minut se zachovalou standardní 20 minutovou desorpcí. Výtěžnost byla přibližně odpovídající výtěžnosti při celkové extrakci 20 minut, konkrétně 2,30 %. Lze vyslovit závěr o tendenci zvyšování výtěžnosti fenobarbitalu se zvyšující se dobou desorpce, která má zřejmě větší vliv než doba sorpce. Z časových důvodů bylo i přes toto zjištění nadále postupováno při analýze s využitím standardního času extrakce, tedy 20 minut sorpce, 20 minut desorpce. Pro lepší představu a přehlednost je sestaven graf vlivu extrakční doby na výtěžnost.

Tabulka 7: Vliv doby mikroextrakce na výtěžnost léčiva

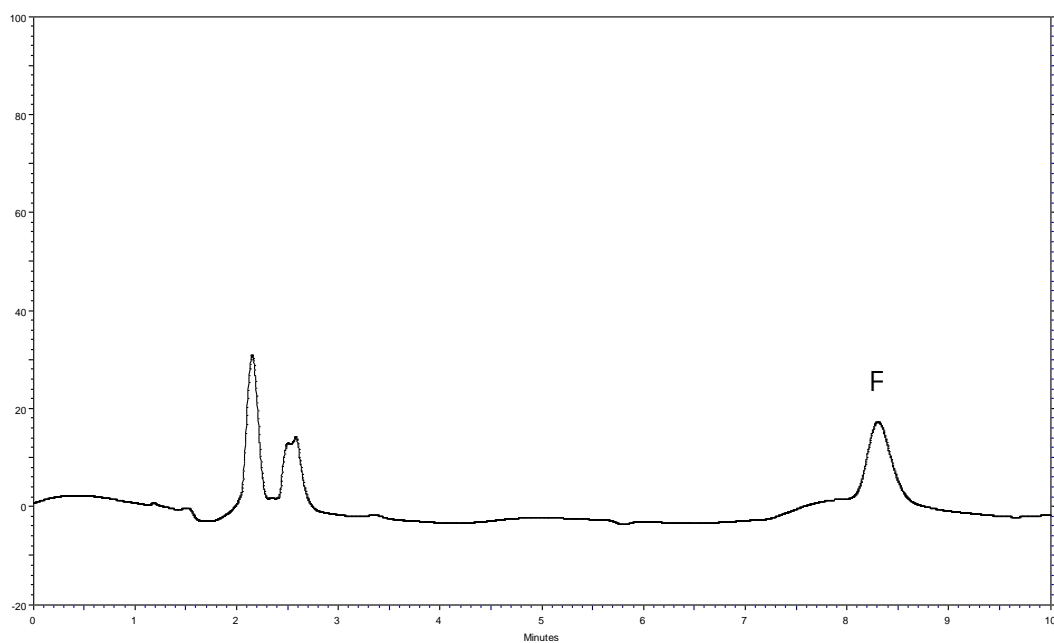
Sorpce [min]	Desorpce [min]	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
10	10	127 200	1,40
20	20	198 617	2,19
30	30	292 584	3,23
30	20	208 627	2,30

Graf 4: Výtěžnost léčiva při různých dobách extrakce





Obrázek 14: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřik po mikroextrakci na vlákno PDMS/DVB. Doba extrakce 10 minut. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.



Obrázek 15: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřik po mikroextrakci na vlákno PDMS/DVB. Doba extrakce 30 minut. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

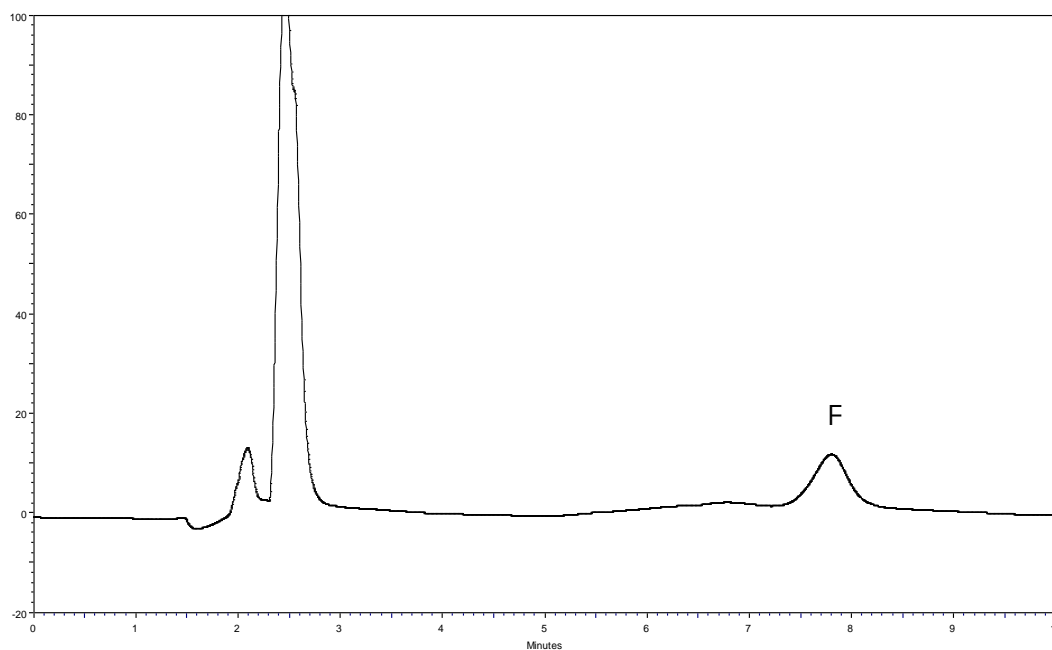
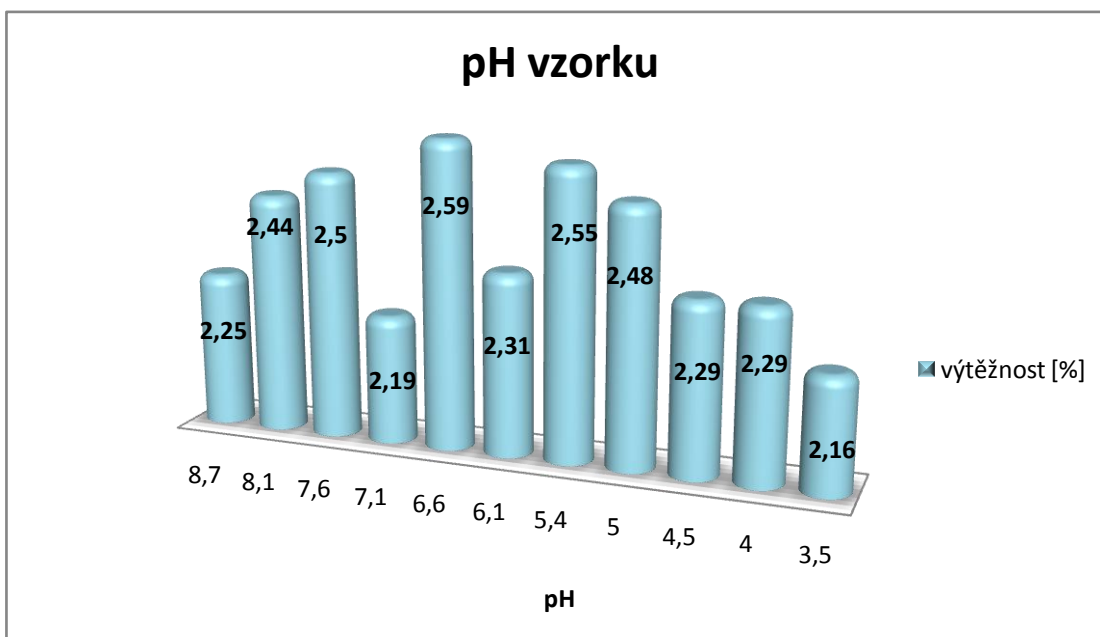
pH vzorku

Na vlákně PDMS/DVB byla sestavena stupnice různých hodnot pH docílených přidáním kyseliny fosforečné a pro každou hodnotu její odpovídající výtěžnost fenobarbitalu. Bez úpravy pH se extrahovalo 2,25 % léčiva, nejvyšší vliv na výtěžek měla úprava na pH 6,6 a to 2,59 %. Na vlákně CW/TPR byla nejvyšší hodnota zaznamenána také při úpravě na pH 6,6.

Tabulka 8: Vliv pH na výtěžnost léčiva

pH vzorku	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
8,7	194 260	2,25
8,1	210 727	2,44
7,6	215 866	2,50
7,1	189 373	2,19
6,6	223 567	2,59
6,1	199 845	2,31
5,4	220 519	2,55
5,0	213 806	2,48
4,5	197 537	2,29
4,0	198 085	2,29
3,5	186 424	2,16

Graf 5: Výtěžnost léčiva při různých hodnotách pH vzorku



Obrázek 16: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu. Nástřík po mikroextrakci na vlákno PDMS/DVB. Vzorek upraven na pH 6,5. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

5.3 Kalibrační křivka pro vlákno PDMS/DVB

Pro kvantitativní stanovení fenobarbitalu ve vzorku králičí krve byla vypracována kalibrační křivka. Hodnoty byly získány z analýz jednotlivých vzorků o zvolených koncentracích fenobarbitalu.

K 0,5 ml vzorku krve byla přidávána různá množství standardu fenobarbitalu o koncentraci 10 mg/ml a směs byla vodou doplňována na výsledný objem 5 ml. Každý vzorek byl upraven na pH 6,5 a podroben procesu SPME na vlákne PDMS/DVB při standardní době mikroextrakce a dále hodnocení HPLC. Získané hodnoty ploch píků fenobarbitalu pro příslušné koncentrace byly využity k sestavení kalibrační křivky. Rovnice kalibrační křivky vniklé regresní analýzou je:

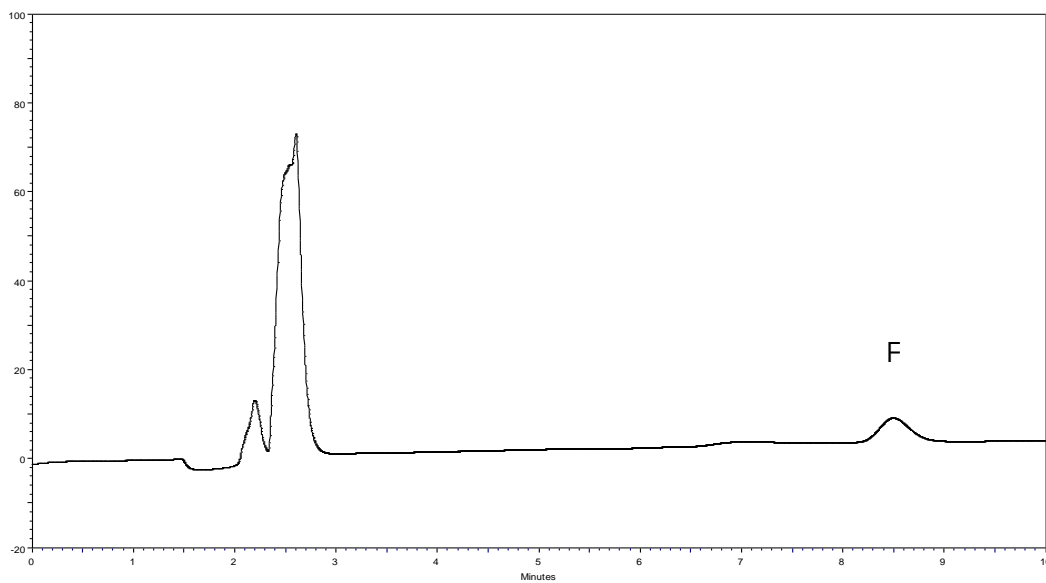
$$y = 1\,800\,000x + 134\,000, \text{ koeficient korelace } r = 0,989.$$

Tabulka 9: Složení vzorků pro hodnocení linearity

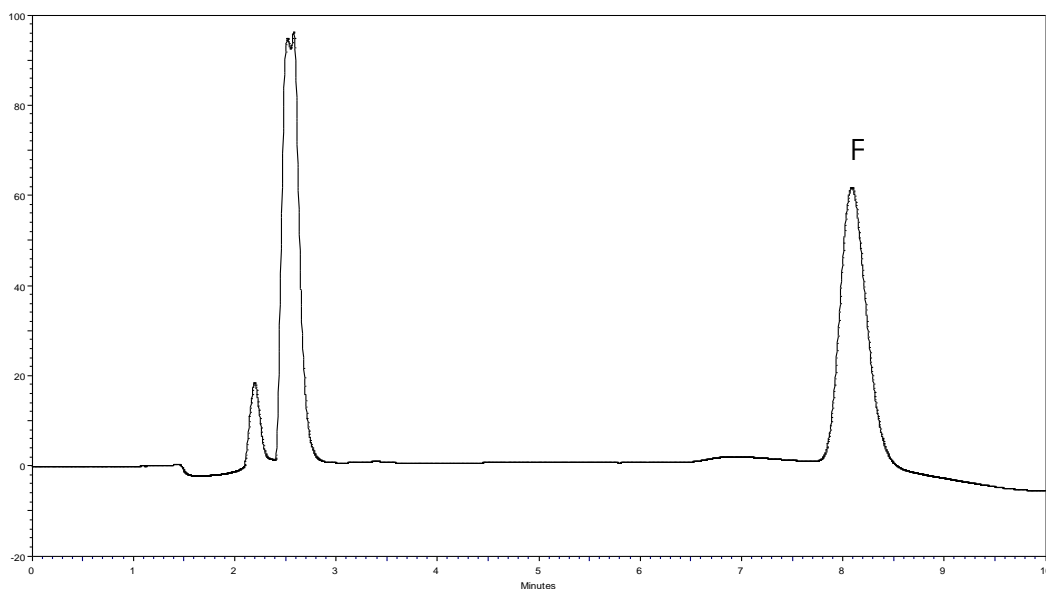
Králičí krev [ml]	Standard fenobarbitalu [μl]	Voda [ml]	Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku [mg/ml]
0,50	10,0	4,49	0,02
0,50	50,0	4,45	0,10
0,50	100,0	4,40	0,20
0,50	200,0	4,30	0,40
0,50	300,0	4,20	0,60

Tabulka 10: Plochy píků při mikroextrakci fenobarbitalu ze vzorku krve za použití vlákna PDMS/DVB.

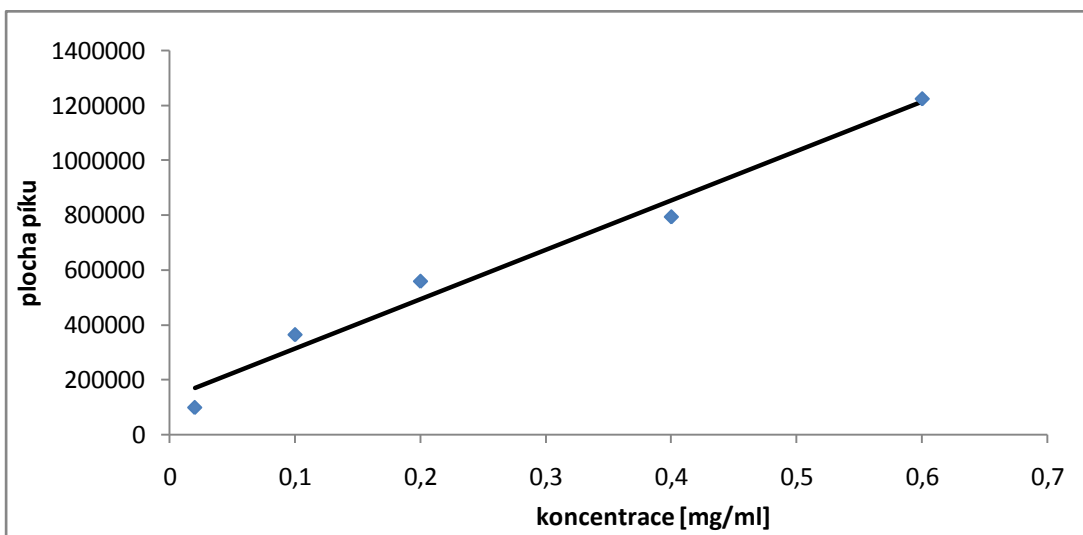
Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku [mg/ml]	Plochy píků jednotlivých měření	Průměrná plocha píku
0,02	104 135	99 896
	95 656	
0,10	351 966	365 150
	378 334	
0,20	537 233	559 573
	581 912	
0,40	773 654	794 200
	814 745	
0,60	1 142 479	1 224 159
	1 305 839	



Obrázek 17: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu ($c = 0,02$ mg/ml), mikroextrakce na vlákno PDMS/DVB. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.



Obrázek 18: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu ($c = 0,6$ mg/ml), mikroextrakce na vlákno PDMS/DVB. Podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.



Obrázek 19: Kalibrační křivka pro izolaci fenobarbitalu na vlákne PDMS/DVB

Regresní funkce : $y = kx + q$

Počet bodů $n = 5$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

směrnice	$k = 1,80E+6 \pm 1,5E+5$
absolutní člen	$q = 1,34E+5 \pm 5,2E+4$

koeficient korelace	$R = 0,989$
reziduální odchylka	$s_{rez} = 7,19E+4$

Závislost y na x **byla** prokázána na hladině významnosti 0,01

Ověření kalibrační křivky

Pro ověření kalibrační křivky byly připraveny vzorky o třech předem zvolených koncentracích a podrobeny analýze. Získané plochy píků byly dosazeny do rovnice kalibrační křivky a výsledná hodnota vypočítané koncentrace byla porovnána se známou koncentrací připravených vzorků.

Tabulka 11: Složení vzorků pro ověření kalibrační křivky

Králíčí krev [ml]	Standard fenobarbitalu [μl]	Voda [ml]	Koncentrace fenobarbitalu ve vzorku [mg/ml]
0,500	75,0	4,425	0,15
0,500	150,0	4,350	0,30
0,500	250,0	4,250	0,50

Tabulka 12: Plochy píků připravených vzorků a na základě těchto dat vypočítané koncentrace dosazením do kalibrační křivky

Koncentrace vzorku [mg/ml]	Průměrná plocha píku	Koncentrace vypočítaná z rovnice kalibrační křivky [mg/ml]	Koncentrace vypočítaná z rovnice kalibrační křivky [%]
0,15	447 987	0,17	113,33
0,30	755 776	0,35	116,67
0,50	1 072 640	0,52	104,00

Modelový vzorek

Byly připraveny 2 vzorky tak, že k 0,5 ml krve bylo přidáno u jednoho vzorku 100 μ l a u druhého 200 μ l standardu fenobarbitalu o koncentraci 10 mg/ml. Vzorky byly zmrazeny na 24 hodin a po rozmrazení byly doplněny vodou na objem 5 ml. Po úpravě na pH 6,5 byly analyzovány metodou HPLC-SPME. Z ploch píků byla vypočítána výsledná koncentrace a porovnána se známou koncentrací.

U prvního vzorku, který byl připraven o koncentraci 0,2 mg/ml, byla po výpočtu zjištěna koncentrace 0,205 mg/ml, což v procentuálním vyjádření odpovídá 102,63 %.

Druhý vzorek o koncentraci 0,4 mg/ml měl hodnotu koncentrace po výpočtu z kalibrační křivky 0,437 mg/ml, tedy 109,32 %.

5.4 Validace vypracované metody

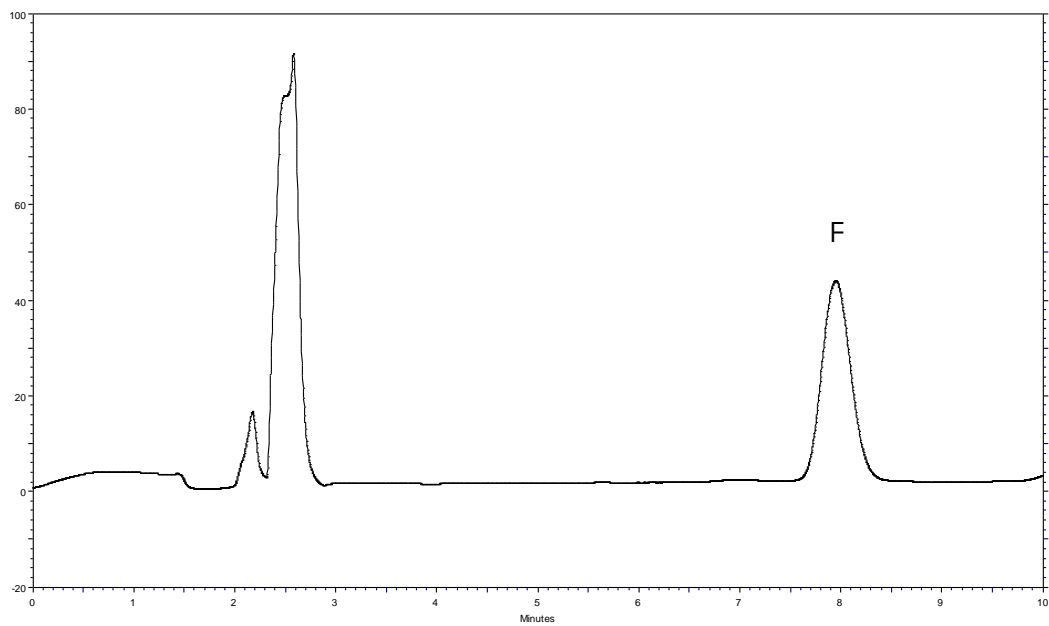
Pro ověření vhodnosti zvolených podmínek analýzy SPME-HPLC byly využity validační parametry jako selektivita, přesnost, správnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, robustnost.

Na základě výše popisovaných výsledků zvolené a následně validací prověřované podmínky měly tedy následující charakter:

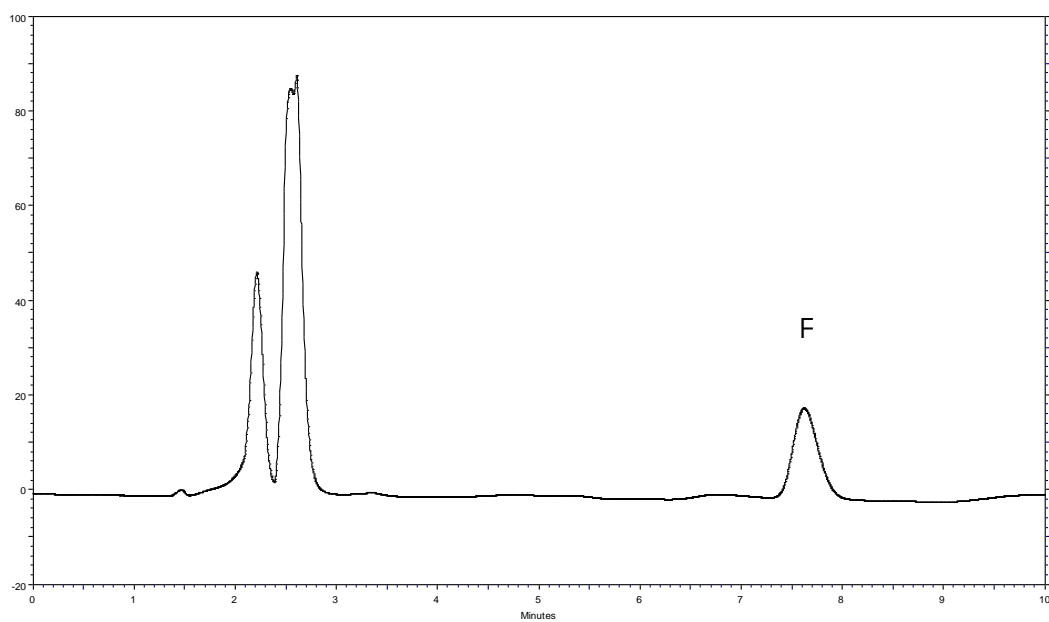
Vzorek pro analýzu fenobarbitalu o koncentraci 0,1 mg/ml byl naředěn a upraven na pH 6,5. Poté byl podroben analýze metodou SPME, kdy bylo do vzorku ponořeno extrakční vlákno PDMS/DVB na 20 minut za stálého míchání na magnetické míchačce. Následovala 20 minutová desorpce do insertu s methanolem o objemu 200 μ l, ke kterému bylo po desorpci přidáno 50 μ l pufru. Takto připravené desorpční médium bylo nastříknuto na analytickou kolonu s náplní C₁₈, kterou protékala mobilní fáze složená z 50 dílů methanolu a 50 dílů vody. Fenobarbital byl hodnocen metodou HPLC při 218 nm v retenčním čase cca 7,5 minut.

5.4.1 Selektivita

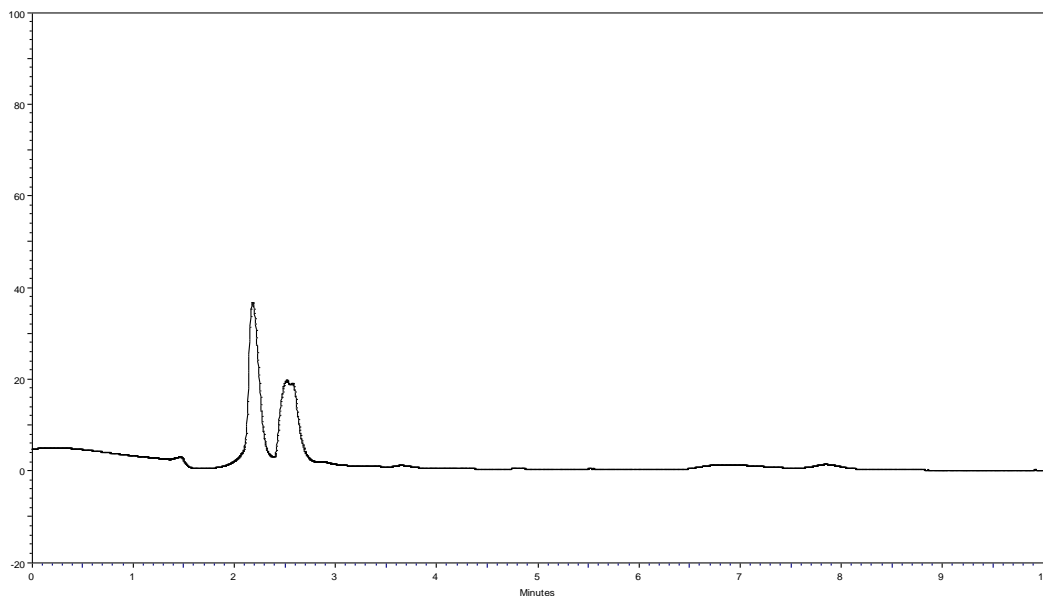
Byly srovnány tři chromatogramy, z nichž jeden představoval standard fenobarbitalu o koncentraci 0,01 mg/ml, další HPLC záznam fenobarbitalu po mikroextrakci na vlákno ze vzorku krve a třetí záznam po mikroextrakci ze vzorku krve bez přídavku fenobarbitalu, tedy slepý vzorek.



Obrázek 20: HPLC chromatogram standardu fenobarbitalu ($c = 0,01$ mg/ml). Podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.



Obrázek 21: HPLC záznam fenobarbitalu v desorpčním mediu, získaný po mikroextrakci ze vzorku krve na vlákno PDMS/DVB. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.



Obrázek 22: HPLC záznam získaný po mikroextrakci na vlákno PDMS/DVB ze vzorku krve bez přídavku fenobarbitalu. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.

Z chromatografických záznamů s přídavkem fenobarbitalu je při čase 7,5 minut detekován pík fenobarbitalu. Bez přídavku léčiva není v záznamu mezi sedmou až osmou minutou zachycen žádný pík. Residua ze vzorku krve se eluují do třetí minuty, nedochází k interferenci s píkem fenobarbitalu.

5.4.2 Přesnost

Pro zhodnocení přesnosti metody byl jeden připravený vzorek opakovaně měřen za stejných podmínek. Pro stanovení byl připraven vzorek o koncentraci 0,1 mg/ml a celkem 6x byl extrahován na vlákno. Získaná desorpční media z těchto extrakcí byla nastříkávána na kolonu, každé celkem 2x. Mezi jednotlivými měřeními bylo ověřováno vymytí vlákna

chromatografickým nástřikem vzorku methanolu, do kterého bylo vlákno ponořeno po jeho vymytí.

Průměr ze šesti získaných hodnot ploch píků byl 320 466, směrodatná odchylka byla 33 605 a relativní směrodatná odchylka 10,49 %. Souhrnná tabulka získaných výsledků je uvedena na následující straně.

Při porovnání jednotlivých výsledků měření je zřejmé, že jedna ze šesti naměřených hodnot, která je v tabulce uvedena jako čtvrtá v pořadí, se výrazně liší. Byl proveden nový výpočet s vynecháním této hodnoty. Průměrná plocha píků z pěti započítaných měření byla 332 665, směrodatná odchylka 21 501 a relativní směrodatná odchylka 6,46 %.

Tabulka 13: Získané plochy píků po jednotlivých extrakcích jednoho vzorku a vypočtené koncentrace.

Pořadí měření	Plochy píků z jednotlivých nástřiků	Průměrná plocha píku	Vypočtená koncentrace [mg/ml]
1	283 102	302 139	0,093
	321 175		
2	303 698	322 766	0,105
	341 834		
3	349 120	324 056	0,106
	298 991		
4	255 206	259 472	0,070
	263 738		
5	333 360	358 815	0,125
	384 269		
6	329 913	355 550	0,123
	341 187		

5.4.3 Správnost

Pro test správnosti bylo stejným postupem připraveno šest vzorků o koncentraci 0,1 mg/ml a každý z nich byl podroben analýze. Cílem bylo získat šest výsledků co nejméně se lišících a stanovit, v jaké míře se různé koncentrace těchto vzorků od známé koncentrace. Výsledky byly vyjadřovány v procentech, kde 100 % představovalo koncentraci 0,1 mg/ml.

Tabulka 14: Získané plochy píků po jednotlivých extrakcích šesti připravených vzorků a vypočtené koncentrace.

Pořadí měření	Plochy z jednotlivých nástřiků	Průměrná plocha píku	Vypočtená koncentrace [mg/ml]	Vypočtená koncentrace [%]
1	323 776	326 260	0,106	106,81
	328 743			
2	345 795	336 412	0,112	112,45
	327 028			
3	307 705	313 997	0,099	100,00
	320 289			
4	326 698	305 540	0,059	95,30
	284 382			
5	314 733	319 083	0,103	102,82
	323 433			
6	300 703	302 493	0,094	93,61
	304 282			

Z tabulky vyplývá, jak se liší získané hodnoty koncentrace vzorků od známé koncentrace 0,1 mg/ml. Průměr ze šesti měření činí v procentuálním vyjádření 101,83 %.

5.4.4 Linearita

Rovnice kalibrační křivky vniklé regresní analýzou je:

$$y = 1\,800\,000x + 134\,000, \text{ koeficient korelace } r = 0,989.$$

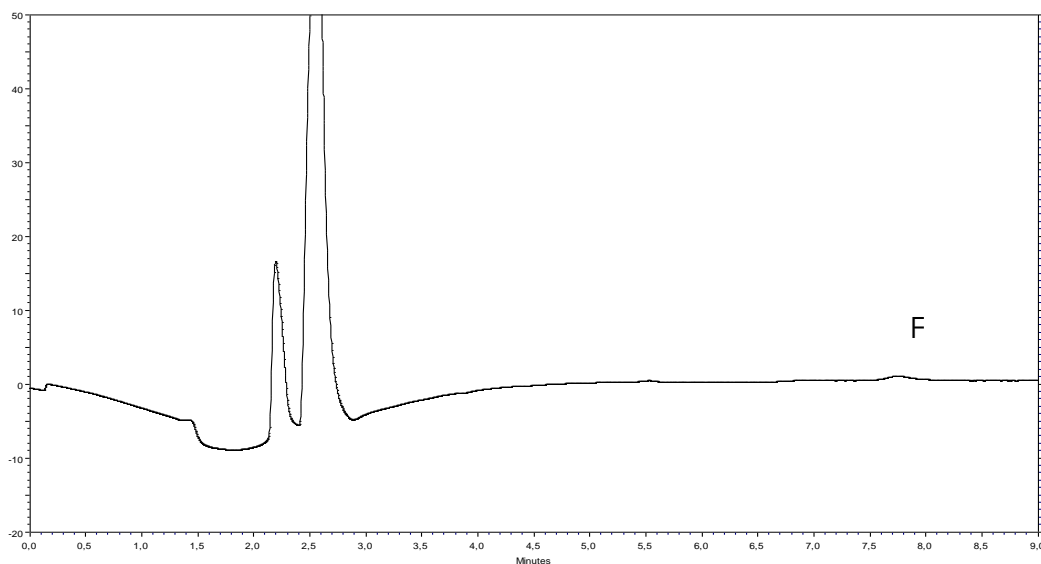
Metoda je lineární v rozsahu 20-600 μg fenobarbitalu v ml krve.

5.4.5 Detekční a kvantitativní limit

Pro výpočet detekčního a kvantitativního limitu byla stanovena směrodatná odchylka šumu, tedy odezvy slepého pokusu 0,0282.

Byl připraven vzorek o koncentraci 0,001 mg/ml, jehož výška píku vykazovala 0,658. Následně byl vypočítán detekční limit LOD 0,1286 $\mu\text{g/ml}$ a kvantitativní limit LOQ 0,429 $\mu\text{g/ml}$.

Dále se ředilo na koncentraci 0,05 $\mu\text{g/ml}$, tedy poloviční koncentraci detekčního limitu. Zde bylo možno léčivo ještě zachytit v chromatografickém záznamu (viz obr. 23).



Obrázek 23: HPLC chromatogram fenobarbitalu v desorpčním mediu ($c = 0,05 \mu\text{g/ml}$). Záznam odpovídá cca polovině hodnoty LOD. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

5.4.6 Robustnost

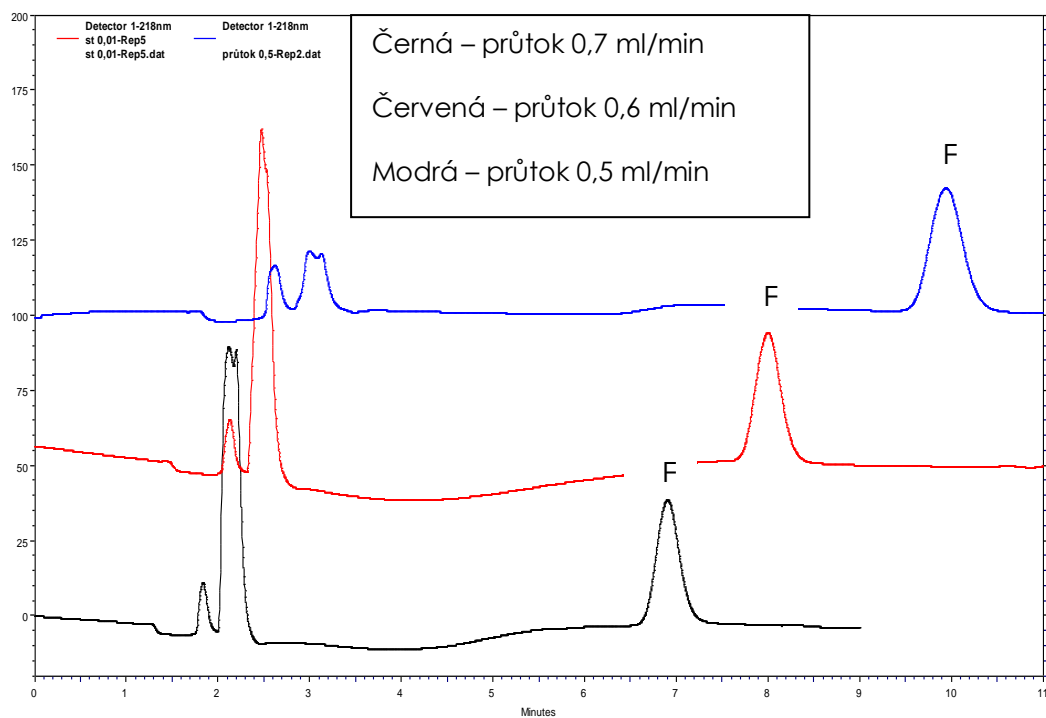
Byl sledován vliv změn pracovních podmínek na výsledky analytického hodnocení standardu fenobarbitalu o koncentraci 0,01 mg/ml. Byly zvoleny dvě proměnné, a sice rychlost průtoku mobilní fáze kolonou a dále samotné složení mobilní fáze.

Mobilní fáze protékala kolonou za normálních podmínek rychlostí 0,6 ml/min, přičemž retenční čas byl 8 minut. Při změně průtoku na 0,5 ml/min bylo léčivo detekováno v čase 10 minut a při průtoku 0,7 ml/min již v čase 7 minut.

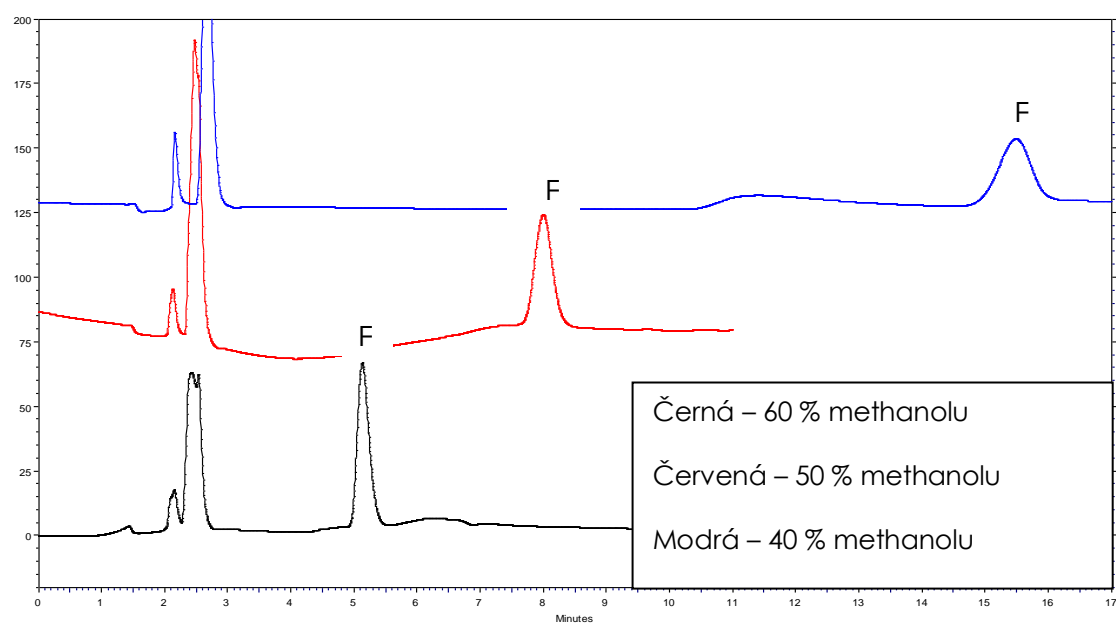
Standardní složení mobilní fáze bylo 50 dílů methanolu a 50 dílů vody. Pro hodnocení robustnosti metody byly namíchány dva typy mobilní fáze, kde jedna obsahovala 40 % methanolu a 60 % vody a druhá právě naopak. Při snížení obsahu organické fáze na 40 % byl fenobarbital detekován v retenčním čase 15,5 minut a ve druhém případě při obsahu methanolu 60 % byl retenční čas 5 minut.

Z experimentu vyplývá, že metoda je robustní a změny složení a průtoku mobilní fáze nemají výrazný vliv na hodnocení.

Na následujících obrázcích lze porovnat vliv změn dvou zvolených proměnných na retenční čas léčiva.



Obrázek 24: Porovnání HPLC záznamů s různou rychlostí průtoku mobilní fáze kolonou.



Obrázek 25: Porovnání HPLC záznamů s různým složením mobilní fáze.

Souhrnné zhodnocení metody

Při prověřování validačních parametrů bylo docíleno závěrů., které jsou níže shrnuty do tabulky.

Tabulka 15: Výsledky validačních parametrů

Validační parametr	Výsledek
selektivita	prokázána
přesnost	relativní směrodatná odchylka 10,49 % (resp. 6,46 %)
správnost	101,83%
linearita	$y = 1\,800\,000x + 134\,000$, $r = 0,989$ lineární v rozsahu 20-600 μg
detekční limit	0,129 $\mu\text{g/ml}$
kvantitativní limit	0,429 $\mu\text{g/ml}$
robustnost	robustní (z hlediska složení a průtoku mobilní fáze)

6. ZÁVĚR

Tématem této rigorózní práce bylo analytické hodnocení fenobarbitalu metodou mikroextrakce tuhou fází (SPME) v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Detekce metodou HPLC probíhala v oblasti UV při 218 nm na analytické koloně Discovery HS C₁₈ s parametry 150 x 4,6 mm, (částice 5 µm). Mobilní fáze byla složena z 50 dílů methanolu a 50 dílů vody a její průtok kolonou byl 0,6 ml/min. Standard fenobarbitalu byl rozpouštěn ve směsi složené z 80 dílů methanolu a 20 dílů pufru.

Izolace léčiva z krve byla zprostředkována metodou mikroextrakce na tuhé fázi, kde tuhou fází představovalo vlákno PDMS/DVB. Roztok léčiva byl před analýzou okyselen na pH 6,5 pomocí kyseliny fosforečné. Doba pro extrakci byla 20 minut sorpce, 20 minut desorpce. Desorpce probíhala do 200 µl methanolu. K desorpčnímu mediu bylo přidáno 50 µl fosfátového pufru a následovalo hodnocení na analytické koloně.

Pro kvantitativní hodnocení fenobarbitalu z králičí krve byla vypracována kalibrační křivka ze vzorků o různých koncentracích. Vzorky byly připravovány výše popsaným postupem a byly podrobeny mikroextrakci na tuhé fázi za zvolených podmínek.

Stanovené podmínky analýzy SPME-HPLC byly ověřeny validačními parametry jako selektivita, přesnost, správnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, robustnost.

7. LITERATURA

LITERATURA

- 1) Klíma J., Grafnetterová J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum Praha (1987)
- 2) Thurman E.M., Mills M.S.: Solid Phase Extraction, Principles a Practise, John Wiley and Sons, Inc. New York (1998)
- 3) <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=35833>
(staženo: duben 2011)
- 4) <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/3m-empore/cartridges.html>
(staženo: duben 2011)
- 5) <http://chromservis.cz/category/syringe-care>
(staženo: duben 2011)
- 6) <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=49597>
(staženo: duben 2011)
- 7) [http://www.zemvpasci.sk/docs/2008/presentations/Prochadzková.pdf](http://www.zemvpasci.sk/docs/2008/presentations/Prochadzкова.pdf)
(staženo: duben 2011)
- 8) <http://www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/SPME.htm>
(staženo: duben 2011)
- 9) <http://accessscience.com/search.aspx?topic=CHEM:ANAL&term=forinsic+chemical+analysis>
(staženo: duben 2011)
- 10) Prosen H., Zupančič-Kralj L.: Solid-phase microextraction. Tr. Anal. Chem. **18**, 272-282 (1999)
- 11) Popp P., Bauer C., Moder m., Paschke A.: J. Chromatogr. A 897, 153-159 (2000)
- 12) de Oliveira A.R.M., Cesarino E.J., Bonato P.S.: Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. J. Chromatogr. B **818**, 285-291 (2005)

- 13) Wardencki W., Curylo J., Namiešnik J.: Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* **70**, 275-288, (2007)
- 14) <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
(staženo: květen 2011)
- 15) http://www.hplc.cz/Teorie/evaluation_HPLC.html
(staženo: květen 2011)
- 16) http://aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM_HPLC_4.pdf
(staženo: květen 2011)
- 17) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL Praha 1985
- 18) Kodíček M., Chromatografie kapalinová vysoceúčinná, Biochemické pojmy: výkladový slovník [online], Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-01-04]
- 19) <http://www.hplc.cz/Chiral/index.htm>
(staženo: květen 2011)
- 20) Holík M.: Validace analytických metod, Přírodovědecká fakulta MU Brno, 1995
- 21) Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, May 2001
- 22) Text on Validation of Analytical Procedures. Guideline for Industry. ICH-Q2A, March 1995
- 23) Validation of Analytical Procedures (Methodology). ICH Topic-Q2B, November 1996
- 24) Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada Praha 2009
- 25) Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie II, Karolinum Praha 1994
- 26) Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalytika léků, Avicenum Praha 1990
- 27) Katzung B.G.: Základní a klinická farmakologie, H a H Praha 1994
- 28) Fedorova G.A., Baram G.I., Grachev M.A., Aleksandrov Yu.A., Tyuleneva G.N., Starodubtsev A.V.: Application of Micro-Column

- HPLC to the Determination of Phenobarbital and Carbamazepine in Human Blood Serum, *Chromatographia*, **53**, 495-497, 2001
- 29) Yang R., Xie W: Preparation and usage of a new solid phase micro-extraction membrane, *Forens. Sci. Int.*, **139**, 177-181, 2004
- 30) Queiroz M.E.C., Silva S.M, Carvalho D: Determination of Lamotrigine Simultaneously with Carbamazepine, Carbamazepine Epoxide, Phenytoin, Phenobarbital, and Primidone in Human Plasma by SPME-GC-TSD, *J. Chromatogr. Sci.*, **40**, 219-223, 2002
- 31) Hannak D., Haux P., Scharbert F., Kattermann R.: Liquid chromatographic analysis of phenobarbital, phenytoin, and theophylline, Institut für Klinische Chemie, Klinikum Mannheim, 27-31
- 32) Marca G., Malvagia S., Filippi L., Luceri F., Moneti G., Guerrini R: A new rapid micromethod for the assay of phenobarbital from dried blood spots by LC-tandem mass spectrometry, *Epilepsia*, **50(12)**, 2658-2662, 2009
- 33) Iwai M., Hattori H., Arrinobu T., Ishii A., Kamazawa T., Noguchi H., Noguchi H., Suzuki O., Seno H.: Simultaneous determination of barbiturates in human biological fluids by direct immersion solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **806**, 65-73, 2004
- 34) García-Borregón P. Fernández, Lores M., Cela R.: Analysis of barbiturates by micro-high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization, *J. Chromatogr. A*, **870**, 39-44, 2000
- 35) Hall B.J., Brodbelt J.S.: Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **777**, 275-282, 1997
- 36) Cantu M.D., Toso D.R., Lacerda C.A., Lancas F.M., Carrilho E., Queiroz M.E.: Optimization of solid-phase microextraction procedures for the determination of tricyclic antidepressants and anticonvulsants in plasma samples by liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem*, **386**, 256-263, 2006

- 37) Moriyama M., Yamashita S., Domoto H., Furuno K., Araki H., Gomita Y.: Determination of plasma phenobarbital concentration by high-performance liquid chromatography in rat offspring, *J. Chromatogr. B*, **723**, 301-305, 1999
- 38) Blažková P.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Petra Blažková

Konzultant: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, Csc.

ANALÝZA FENOBARBITALU V KRVI METODOU SPME VE SPOJENÍ OFF-LINE S HPLC

Rigorózní práce

Tématem práce bylo analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií. Vlastní problematika se týkala hodnocení fenobarbitalu v biologickém materiálu za užití metody mikroextrakce tuhou fází (SPME) ve spojení off-line s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Vlnová délka pro detekci byla 218 nm. Analýza probíhala na analytické koloně C₁₈. Mobilní fáze představovala směs 50 dílů methanolu a 50 dílů vody. Rychlost průtoku kolonou byla 0,6 ml/min. Na kolonu bylo dávkováno 20 µl vzorku. Rozpouštědlo fenobarbitalu bylo směsí 80 dílů methanolu a 20 dílů pufru.

Pro izolaci léčiva ze vzorku krve metodou SPME bylo zvoleno vlákno PDMS/DVB, doba sorpce i desorpce byla 20 minut, desorpce probíhala do methanolu.

Pro kvantitativní hodnocení fenobarbitalu v králičí krvi byla vypracována kalibrační křivka. Podmínky byly podrobeny validaci.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Petra Blažková

Consultant: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, Csc.

ANALYSIS OF PHENOBARBITAL IN BLOOD OF SPME METHOD COUPLED OFF-LINE WITH HPLC

The purpose of the work presented in this thesis was an analytical evaluation of active ingredients using High Performance Liquid Chromatography. The core of the work was an evaluation of phenobarbital level in biological material using Solid Phase Microextraction method in off-line conjunction with HPLC.

The wavelength used for detection was 218 nm. C18 HPLC column was used to perform the analysis. Mobile phase was a mixture of 50 parts of methanol and 50 parts of water. The flow rate was set to 0,6 ml/min. Sample amount was 20 µl. A mixture of 80 parts of methanol and 20 parts of a buffer was used as a solvent to dissolve phenobarbital.

PDMS/DVB fibre was used to extract the drug from a blood sample by SPME. Sorption and desorption time was 20 minutes. The drug was desorbed into methanol.

A calibration curve was created for the quantitative analysis of phenobarbital in rabbit blood. The conditions under which the experiment was undertaken were validated.