

dělení spolupodílí detergenty např. dodecylsírán sodný. K detekci se používají UV/VIS detektory, elektrochemické a laserem indukované fluorescenční detektory a v poslední době i hmotnostní detektory (13). Citlivá vodivostní detekce se provádí u izotachofórey (ITP) založené na separaci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli (14).

I když elektromigrační metody představují standardní analytický přístup, mají omezené rutinnímu použití. Testovaly se pro stanovení antiepileptik, benzodiazepinů, některých psychofarmak, diklofenaku a vybraných beta-blokátorů (13).

Chromatografické metody

Chromatografické metody mají při analýze léčivých látek významné zastoupení. Jednotlivé chromatografické techniky se vyvíjely postupně a vždy ve své době představovaly významný pokrok. Na počátku to byla tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) a plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC), které dosáhly svůj vrchol ještě před rozšířením kapalinové chromatografie a v současnosti je jejich využití jen okrajové. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s různými typy detekce se začala rozvíjet od šedesátých let minulého století a v současnosti je to především ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) s hmotnostní detekcí (Mass Detection, MS), která se stala zlatým standardem při analýze léčivých látek.

Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie má své stálé místo v toxikologii při identifikaci léčivých látek. Po nanesení analyzované látky a standardu na start destičky pokryté stacionární fází se chromatografická destička vloží do vyvíjecí komory, která obsahuje směs rozpouštědel (mobilní fáze) a ponechá se zde tak dlouho, až rozpouštědlo dosáhne čelo destičky. Po dokonalém vysušení se jednotlivé látky detekují buď pod UV lampou nebo na základě barevné reakce s různými činidly. Hodnota RF (poměr vzdálenosti skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědel od startu) a barevná reakce jsou pro jednotlivé látky charakteristické a dokážou v mnoha případech jednoznačně identifikovat danou toxu i bez použití instrumentální techniky (15).

Plynová chromatografie

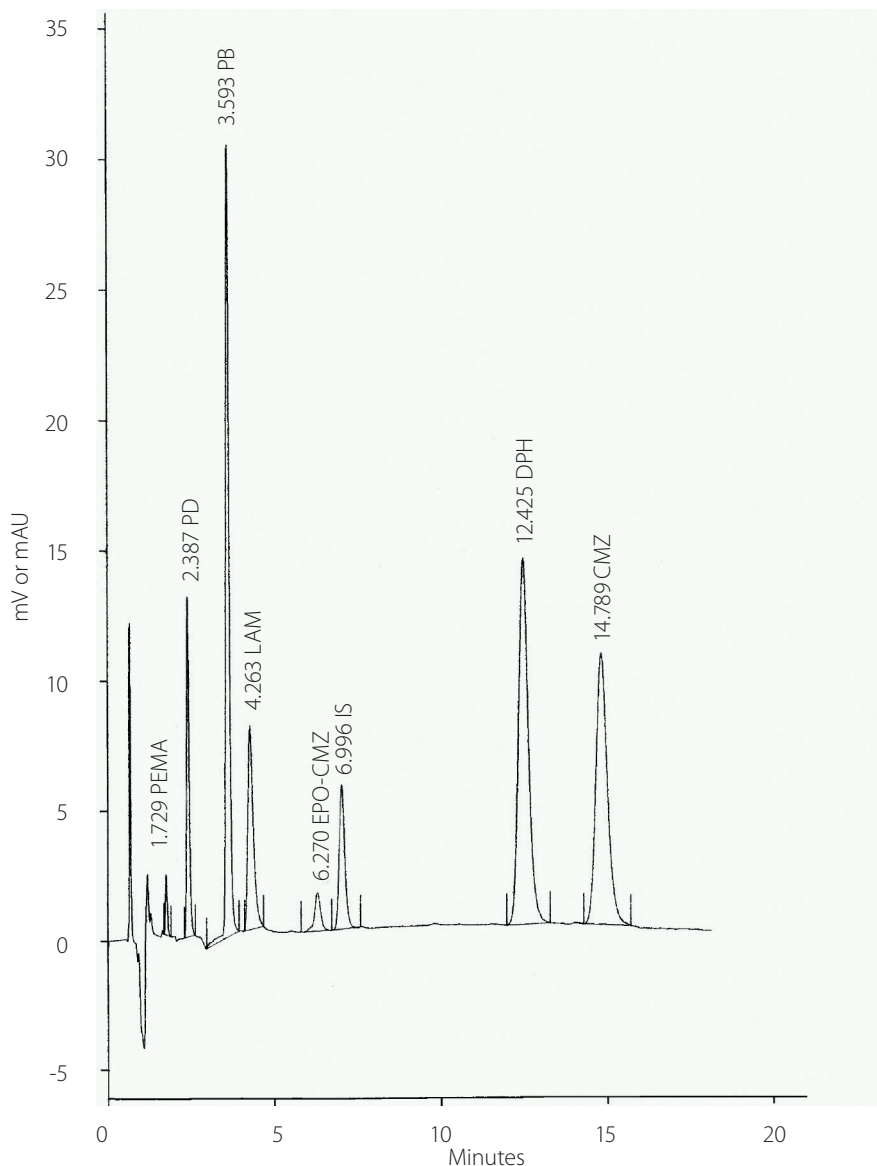
Plynová chromatografie (GC) se při analýze léčiv začala uplatňovat od 60. let minulého století

pro látky, které se daly při vysoké teplotě převést do plynného stavu, popř. tyto vlastnosti získaly chemickou reakcí tzv. derivatizací. Většinou se pracovalo v módu rozdělovací plynové chromatografie (Gas Liquid chromatography, GLC), kde k separaci jednotlivých látek dochází na základě interakcí mezi stacionární fází (tenkou vrstvou kapalné fáze navázanou na nosič) a analytem. Jako mobilní fáze se používají plyny, nejčastěji dusík, helium nebo vodík a detekce se provádí buď plamenově ionizačním detektorem (FID) nebo se používá upravená tryska s navázaným alkalickým kovem AFID nebo termionický detektor, oba se zvýšenou citlivostí na přítomnost dusíku a fosforu. Z počátku se používaly náplňové kolony, což byly skleněné nebo kovové trubice plněné stacionárními fázemi. Později to byly ka-

pilární kolony dlouhé až několik desítek metrů s tenkým filmem stacionární fáze naneseným na vnitřní straně kapilární kolony, které jsou spojené především s hmotnostními detektory.

Metoda GLC se používala hlavně pro stanovení antiepileptik první a druhé generace jako je kyselina valproová, fenytoin, fenobarbital, primidon a karbamazepin, ale dá se použít i pro topiramát, který představuje antiepileptikum třetí generace (16, 17, 18). Pracuje se s náplňovými kolonami se stacionárními fázemi na bázi polysiloxanu nejčastěji OV-17 nebo SE-30 a s dusíkem jako mobilní fází. Kyselina valproová se stanovuje přímo na fázi SP-1000. U ostatních antiepileptik, která jsou tepelně nestálá, se prováděla on column derivatizace za vzniku metylderivátů a jako derivatizační činidlo se používal tetramethylamonium hydroxid nebo

Obr. 2. Analýza antiepileptik metodou HPLC s UV/VIS detekcí



Analýza antiepileptik metodou kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí (PD – primidon, PB – fenobarbital, LAM – lamotrigin, IS – vnitřní standard, DPH – fenytoin, CMZ – karbamazepin a dva aktivní metabolity PEMA – phenethylmalonamid a EPO-CMZ-epoxy-karbamazepin)