

trimethylphenylamonium hydroxid. V praxi to probíhalo tak, že po extrakci léčiva do organického rozpouštědla, nejčastěji éteru se éter odpařil, k odparce se přidal roztok derivatizačního činidla a vzorek se aplikoval na kolonu. Reakce pak proběhla přímo při nástřiku za vysoké teploty (16). Na obr. 1 je uveden příklad analýzy antiepileptik.

V současnosti se plynová chromatografie s hmotnostní detekcí používá především při toxikologické analýze. Po nástřiku extraktů z biologického materiálu na kapilární kolonu a následnou separaci se hmotnostní spektra jednotlivých látek porovnávají s knihovny spekter léčivých látek a dokážou poměrně průkazně identifikovat neznámé léčivo.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti nejrozšířenější chromatografickou metodou. Je to separační technika, která využívá kontinuální opakování rovnovážné distribuce mezi pevnou (stacionární) a kapalnou (mobilní) fází. Mezi základní instrumentální vybavení patří vysokotlaká pumpa se zásobníky na mobilní fázi, dávkovací zařízení spojené většinou s automatickým dávkováním vzorků (autosampler), kolona, detektor a zařízení na záznam a zpracování signálu (chromatografický software a počítač). Pumpy mohou pracovat v izokratickém (stejně složení mobilní fáze) nebo gradientovém módu, kdy dochází v průběhu každé analýzy ke změně složení mobilní fáze ve prospěch organické složky a tím k urychlení separace složitějších směsí látek. Kolony představují kovové trubice nejčastěji o délce mezi 5–25 cm a vnitřním průměru 1, 2, 1, 3, 4, 6 mm, které jsou plněné sorbenty s velikostí částic 1,7, 2,6, 3, 5, a 7 µm. Na zpracování signálu v eluátu z chromatografické kolony se mohou použít různé typy detekce, podmínkou je, že musí poskytovat odezvu úměrnou koncentraci přítomných látek. Nejčastěji se používají spektrofotometrické UV/VIS detektory, které pracují v oblasti ultrafialového a viditelného spektra (200–600 nm) a hmotnostní detektory na principu trojitěho kvadrupólu. Detektory fluorimetrické nebo elektrochemické se v analýze léků využívají jen okrajově.

Nejprve se v kapalinové chromatografii používaly metody s polárními stacionárními fázemi představované silikagelem a nepolárními mobilními fázemi jako je pentan, hexan, chloroform apod. Tento typ se při analýze léčivých látek příliš neprosadil

a k významnějšímu použití došlo až s rozvojem techniky nepolární stacionární fáze tzv. reverzní fáze, kdy se na hydroxylové skupiny silikagelu navázaly uhlovodíkové řetězce C8 (oktyl) nebo C18 (oktadecyl), popř. fenyl nebo skupiny CN a NH₂, které změnily významně jeho vlastnosti. Zbývající volné OH skupiny, kde už vazba nebyla ze sférických důvodů možná, byly často ještě upraveny např. trimethylmonochlorsilanem tak, aby se zabránilo chvostování separovaných látek. Jako mobilní fáze se pak používá voda, popř. pufr, acetonitril, metanol, tetrahydrofuran a jejich kombinace. Pro zlepšení a zrychlení separace se do mobilních fází přidávají v nízké koncentraci modifikátory jako je triethylamin, octan amonný, mravenčan amonný nebo se upravuje pH (19).

Běžné úpravy biologických vzorků (sérum, plasy, popř. plné krve) před vlastní analýzou zahrnují precipitaci proteinů (PPT) acetonitrem a metanolem, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) za použití organických rozpouštědel jako je éter, chloroform, dichlórmetan a toluen. Po extrakci se organické rozpouštědlo odstraní, odparek se rozpustí ve vodě nebo mobilní fázi a nastříkuje se na kolonu. Protože u většiny extrakčních metod dochází ke ztrátám analyzované látky (extrakční výtěžek bývá ideálně 80–95 %, ale i méně) používají se tzv. vnitřní standardy (internal standard, IS). Jsou to látky strukturálně blízké stanovovaným léčivům s podobnými vlastnostmi, které se přidávají ke vzorku před extrakcí a jsou podrobeny stejným postupům jako stanovovaná látka. U HPLC s UV/VIS detekcí musí být jejich retenční čas odlišný v porovnání s analyzovanými léčivy, u kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) se jako vnitřní standardy často používají stejná léčiva jen izotopově značená např. deuteriem (meropenem a meropenem d6) a jejich retenční čas je totožný. (19, 20)

HPLC s UV/VIS detekcí se používá při analýze léčivých látek ve všech farmakologických skupinách. Jsou to např. antiepileptika včetně farmakologicky aktivních metabolitů, teofylin, kofein, methotrexat, amiodaron a desethyl- amiodaron, benzodiazepiny apod. (21, 22, 23, 24, 25). Příklad analýzy antiepileptik je uveden na obr. 2.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí je založena na separaci a stanovení látek na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z).

Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí - iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul za vzniku pozitivně nebo negativně nabitých iontů. Nejpoužívanějšími iontovými zdroji je elektrosprej (ESI) a chemické ionizace (APCI). V analyzátoru dochází k separaci iontů ve vakuu na základě poměru jejich hmotnosti a náboje a do detektoru jsou propouštěny jen ty, která mají odpovídající hodnotu m/z daného skenovacího režimu. V detektoru se měří změna signálu např. měřením změny elektrického proudu. Při analýze léčiv se nejčastěji používají trojitě kvadrupóly (tandemová hmotnostní spektrometrie, (MS/MS), které jsou vysoce citlivé a specifické. Tyto přístroje jsou složeny ze dvou kvadrupólů, které pracují jako hmotnostní analyzátoři. Třetí kvadrupól uložený mezi nimi slouží jako kolizní cela, kde za přítomnosti inertního plynu, nejčastěji argonu dochází k fragmentaci stanovované látky. Každá látka je pak charakterizována prekurzorovým (parentním) iontem a specifickými produktovými (dceřinými) ionty a na základě těchto údajů pak může být velmi přesně a specificky kvantifikována. Vzhledem k tomuto způsobu kvantifikace nemusí být jednotlivé látky na rozdíl od HPLC s UV/VIS detekcí zcela separovány, což urychluje analýzu složitějších směsí (26). Nutno ale mít na paměti, že pokud tato léčiva existují v organismu nejen volná ale i ve formě glukuronidů (např. kyselina mykofenolová) nebo sulfátů (např. cyklosporin A) musí se obě složky chromatograficky oddělit, jinak by došlo k falešnému navýšení koncentrace měřeného léčiva (27). Příklad analýzy kyseliny mykofenolové je uveden na obr. 3.

Hmotnostní průletové spektrometrie (Time of Flight, TOF) s vysokým rozlišením se ve spojení s kapalinovou chromatografií používají v toxikologii a v metabolomice při studiu metabolitů léčivých látek (26).

K úpravě vzorků krve, séra nebo plazmy se u hmotnostní detekce nejčastěji používá precipitace metanolem nebo acetonitrem, popř. jejich kombinace a také se přidává síran zinečnatý nebo jiná aditiva pro zvýšení účinnosti (28). Protože precipitace úplně neodstraní příměsi doprovodných složek přítomných v biologických vzorcích jako jsou endogenní fosfolipidy nebo aditiva heparin a EDTA, musí se tyto extrakty testovat na tzv. matricový efekt (29, 30). Ten se zjistí porovnáním plochy píku stanovované látky bez a po přidání