

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení valproátu s využitím moderních separačních technik

Michaela Jemelíková

Bakalářská práce

2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.6.2018

Michaela Jemelíková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a rady při zpracování této práce. Zároveň bych ráda poděkovala celé své rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Předmětem této bakalářské práce je vypracování literární rešerše se zaměřením na moderní separační techniky, kterými lze stanovit množství kyseliny valproové v lidském organismu. První část práce se zaměřuje na klinické využití a mechanismus účinku látky. Druhá část je věnována plynové a kapalinové chromatografii a jejich využití pro stanovení valproátu.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina valproová, epilepsie, γ -aminomáselná kyselina, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie

TITLE

Valproate determination using modern separation techniques.

ANNOTATION

The subject of this bachelor thesis is to elaborate a literature research focused on modern separation techniques, which can determinate the amount of valproic acid in the human organism. The first part focuses on clinical use and mechanism of action of the substance. The second part is dedicated to gas and liquid chromatography and their use for the determination of valproate.

KEYWORDS

valproic acid, epilepsy, γ -aminobutyric acid, gas chromatography, liquid chromatography

OBSAH

Úvod.....	10
1 Valproát	11
1.1 Chemické vlastnosti kyseliny valproové	11
1.2 Léčiva obsahující kyselinu valproovou	11
2 Klinické použití.....	13
2.1 Epilepsie.....	13
2.1.1 Antiepileptika	14
2.2 Další klinické indikace.....	14
2.3 Vedlejší účinky.....	15
3 Mechanismus účinku.....	16
3.1 Šíření nervového vzruchu	16
3.2 Účinek valproátu na γ -aminomáselnou kyselinu.....	17
3.3 Účinek valproátu na sodné kanály.....	19
3.4 Účinek valproátu na další neurotransmitery	19
4 Plynová chromatografie.....	20
4.1 Princip metody	20
4.2 Instrumentace	21
4.2.1 Nosný plyn.....	21
4.2.2 Dávkování.....	21
4.2.3 Kolona	21
4.2.4 Detektor.....	22
4.2.5 Termostat.....	23
4.2.6 Vyhodnocovací zařízení.....	23
4.3 Extrakce	24
4.3.1 Extrakce plyn-kapalina.....	24
4.3.2 Extrakce kapalina-kapalina	24

4.3.3	Extrakce tuhou fází	25
4.3.4	Mikroextrakce tuhou fází	25
4.4	Derivatizace.....	26
5	Stanovení valproátu pomocí plynové chromatografie.....	28
5.1	Stanovení VPA z plazmy	28
5.2	Stanovení VPA ze séra.....	29
5.3	Stanovení VPA z krve.....	30
5.4	Stanovení VPA z ústních tekutin.....	30
6	Kapalinová chromatografie.....	32
6.1	Instrumentace v kolonové LC	32
6.1.1	Směšovací zařízení.....	33
6.1.2	Čerpadlo	33
6.1.3	Dávkovací zařízení.....	33
6.1.4	Kolony.....	34
6.1.5	Detektory.....	34
6.2	Druhy kapalinové chromatografie.....	35
6.2.1	Adsorpční kapalinová chromatografie	35
6.2.2	Rozdělovací kapalinová chromatografie.....	36
6.2.3	Chromatografie v systému s obrácenými fázemi.....	36
6.2.4	Iontově-výměnná chromatografie.....	36
6.2.5	Chromatografie sterické vyluky	37
7	Stanovení valproátu pomocí kapalinové chromatografie.....	38
7.1	Stanovení VPA z plazmy	38
7.2	Stanovení VPA z krve.....	39
8	ZÁVĚR.....	41
9	Použitá literatura	42

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Strukturní vzorec kyseliny valproové [2]	11
Obrázek 2	Nervová synapse [17].....	16
Obrázek 3	Schématické znázornění GABAergní inhibiční synapse s presynaptickým a postsynaptickým neuronem [20].....	18
Obrázek 4	Chromatogram při eluční metodě [26]	20
Obrázek 5	Schéma plynového chromatografu [29]	21
Obrázek 6	Schéma teplotně vodivostního detektoru [26]	22
Obrázek 7	Schéma plamenově ionizačního detektoru [26].....	23
Obrázek 8	Headspace extrakce [32].....	24
Obrázek 9	Extrakce DI-SPME a HS-SPME [34]	26
Obrázek 10	Chromatogram vzorku plazmy ze zdravého subjektu po podání jednorázové 500 mg perorální dávky VPA. Pík 1, ethylester kyseliny valproové; pík 2, ethylester kyseliny benzoové (IS) [37]	29
Obrázek 11	Schéma kapalinového chromatografu [27]	32
Obrázek 12	Schéma šesticestného dávkovacího ventilu 1 – nástřík vzorku, 2 – dávkovací smyčka, 3 – přívod mobilní fáze z pumpy, 4 – odtok mobilní fáze do kolony, 5 – odpad [48]	33
Obrázek 13	Schéma refraktometrického detektoru [27]	34
Obrázek 14	Permeace molekul různé velikosti do póru gelu [27].....	37
Obrázek 15	Metabolické cesty kyseliny valproové [52].....	38
Obrázek 16	Chromatogram (A) čistá plazma, (B) plazma pacienta, pík 1 - derivát kyseliny valproové, pík 2 – vnitřní standard [55].....	39
Tabulka 1	Přehled léčiv obsahujících VPA.....	12

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

DBS	suchá krevní skvrna
DI-SPME	přímá mikroextrakce tuhou fází
ECD	detektor elektronového záchytu
FID	plamenový ionizační detektor
GABA	γ -aminomáselné kyselina
GABA-T	GABA transamináza
GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové
GC	plynová chromatografie
GC-MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GLC	plynová chromatografie v systému plyn-kapalina
GSC	plynová chromatografie v systému plyn-tuhá fáze
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS-SPME	headspace mikroextrakce tuhou fází
IEC	iontově-výměnná chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LLC	rozdělovací kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LSC	adsorpční kapalinová chromatografie
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SSA	sukcinsemialdehyd
SSADH	SSA dehydrogenázu
TCD	tepelně vodivostní detektor
VPA	valproát

ÚVOD

Epilepsie je jedním z mnoha nervových onemocnění a projevuje se nervovými záchvaty. Naštěstí lze projevy epilepsie účinně mírnit nebo zcela potlačit správnou medikací. Kyselina valproová (valproát) se stala pro své široké spektrum účinnosti již během minulého století jedním z nejpoužívanějších antiepileptik a pro některé typy záchvatů je léčivem první volby.

U mnoha léčiv provádíme tzv. terapeutický monitoring léčiv během něhož se stanovuje koncentrace jejich hladin v biologických vzorcích. Nejčastěji je prováděn u léčiv, které mají úzký terapeutický rozsah, toxické účinky nebo se podávají dlouhodobě či dokonce celoživotně. U těchto léčiv je nutné udržovat jejich hladinu v lidském organismu konstantní. K udržení tohoto ustáleného stavu nestačí pouze podávat lék v pravidelných intervalech. Každý jedinec vstřebává, metabolizuje a vylučuje léky s rozdílnou intenzitou v závislosti na mnoha fyziologických faktorech, které se v průběhu života mohou měnit.

Valproát patří mezi léčivé látky, které jsou dlouhodobě užívány. Má krátký poločas eliminace, nízký terapeutický index a širokou variabilitu koncentrací v krevní plazmě pacientů. Všechny tyto faktory jsou dostatečným důvodem k tomu, aby se prováděl terapeutický monitoring. Cílem je dosáhnout co nejvyšší účinnosti léčiva s minimem vedlejších účinků a byla tak zajištěna individualizace farmakoterapie u jednotlivých pacientů.

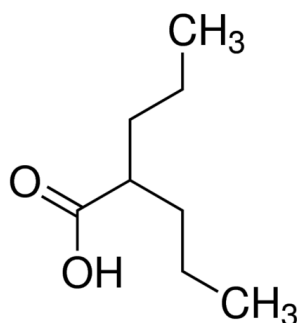
V dnešní době se pro analýzu vzorků ve velké míře používají moderní separační techniky hlavně pro svou rychlost a vysokou přesnost. Pro stanovení valproátu se nejčastěji používá plynová a kapalinová chromatografie.

1 VALPROÁT

Valproát sodný i kyselina valproová v plazmě disociují, proto jsou často označeny souhrnně jako valproát (VPA). Kyselina valproová byla poprvé syntetizována Beverly S. Burtonem roku 1882. Její antikonvulzivní účinky byly náhodou objeveny až v roce 1962 Pierem Eymardem. Valproát byl tehdy použit jako organické rozpouštědlo pro preklinické testování derivátů khellinu. V dnešní době se valproát používá jako antiepileptikum a má také efekt jako stabilizátor nálady při bipolárních poruchách [1].

1.1 Chemické vlastnosti kyseliny valproové

Kyselina valproová (2-propylpentanová kyselina, CAS 99-66-1) je bezbarvá kapalina, která je špatně rozpustná ve vodě, zato dobře rozpustná v organických rozpouštědlech například v methanolu, acetonu nebo etheru. Její strukturní vzorec je uveden na obrázku 1. Její molekulová hmotnost je 144,21 g/mol a hodnota pK_a je 4,8 [3].



Obrázek 1 Strukturní vzorec kyseliny valproové [2]

1.2 Léčiva obsahující kyselinu valproovou

Léčiva, která obsahují kyselinu valproovou nazýváme obecně antikonvulzivy nebo také antiepileptiky. Tyto léčiva se v České republice vydávají pouze na lékařský předpis a pacienti si na ně musejí většinou doplácet. Léčiva se převážně vyskytují v tabletkové či tobolkové formě s množstvím účinné látky od 100 do 1000 mg. Výjimečně se léčivo podává v roztoku nebo sirupu. Přípravky v injekční formě jsou určeny pro pacienty, kteří dočasně nemohou být léčeni perorálně [4]. Souhrn přípravků obsahující kyselinu valproovou je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled léčiv obsahujících VPA [4]

Název přípravku	Výrobce	Léková forma	Množství účinné látky
Convulex	GL Phrma	Enterosolventní měkká tobolka	150/300/500 mg
		Tableta s prodlouženým uvolňováním	300/500 mg
		Perorální tozok	300 mg/l
Depakine chrono	Sanofi Aventis	Tableta s řízeným uvolňováním	300/500 mg
Depakine	Sanofi Aventis	Sirup	5 g/100 ml
		Prášek a rozpouštědlo pro injekční roztok	400 mg/4 ml
Orfiril	Desitin Pharma	Enterosolventní tableta	150/300/600 mg
		Injekční roztok	100 mg/ml
Orfiril long	Destin Pharma	Tvrdá tobolka s prodlouženým uvolňováním	150/300 mg
		Tableta s prodlouženým uvolňováním	500/1000 mg
Valproat Chrono Sandoz	Sandoz	Tableta s prodlouženým uvolňováním	500/300 mg
Valproat-ratiopharm Chrono	Ratiopharm	Tableta s prodlouženým uvolňováním	300/500 mg

2 KLINICKÉ POUŽITÍ

2.1 Epilepsie

Hlavní použití valproátu v klinické praxi je proti epileptickým záchvatům. Epilepsie je chronické nervové onemocnění, které se vyskytuje asi u 50 milionů lidí, tedy asi u 0,5-1% procenta světové populace [5].

Epilepsii tradičně označujeme za poruchu, která je tvořena mnoha různými chorobami a stavy. Výraz „porucha“ je ale pro společnost často špatně srozumitelný a zlehčuje závažnou povahu epilepsie. Mezinárodní liga proti epilepsii (ILAE) a Mezinárodní úřad pro epilepsii (IBE) se proto dohodli na označení „nemoc“ [6].

ILAE definuje epilepsii jako stav, který je charakterizován opakujícími se (dvěma nebo více) epileptickými záchvaty, nevyprovokovanými žádnou vnější příčinou. Záchvaty jsou od sebe vzdáleny alespoň 24 hodin. Epileptický záchvat je způsoben nadměrnou nervovou aktivitou v mozku. Na základě klinických projevů je možné identifikovat mnoho různých typů záchvatů. Tyto klinické charakteristiky spolu se záznamy elektroencefalogramu lze použít pro kategorizaci záchvatů [6, 7].

Dělení podle nástupu na záchvaty:

- s ohniskovým nástupem,
- s fokálním nástupem,
- s neznámým nástupem [8].

Epileptické záchvaty se projevují:

- ztrátou povědomí nebo vědomí,
- nekontrolovatelnými pohyby rukou a nohou,
- psychickými příznaky, jako je strach, úzkost nebo deja vu,
- změna citlivosti vjemů - zrak, sluch, čich a chuť [5, 9].

Projevy záchvatů se u jednotlivých pacientů mohou lišit v závislosti na místě vzniku nadměrného elektrického výboje a jeho šíření v mozku. Záchvaty mohou trvat od několika sekund po několik minut a jejich frekvence se pohybuje v rozmezí jednoho roku ale i několika dní [5].

2.1.1 Antiepileptika

Efektivní léčba epilepsie vyžaduje celostní přístup, který bere v úvahu potřeby jednotlivých pacientů, konkrétní klinické charakteristiky a osobní okolnosti každého pacienta tak, aby se zajistila úspěšná léčba.

Ideální antiepileptikum by mělo mít tyto vlastnosti:

- dlouhodobé zvládnutí záchvatů,
- příznivá snášenlivost,
- široké spektrum činnosti,
- stabilní a předvídatelný farmakokinetický profil
- umožnění dávkování jednou denně,
- nulová interakce s jinými léky nebo jinými antiepileptiky [10].

Mezi antiepileptika patří karbamazepin, fenobarbital, fenytoin, primidon, kyselina valproová, vigabatrin, oxcarbazepin, felbamát, gabapentin, lamotrigin, topiramate, vigabatrin [11].

U některých pacientů se může objevit epilepsie rezistentní na léky. V takových případech může být u pečlivě vybraných pacientů chirurgické řešení vhodnější než dlouhotrvající medikace. Lékaři mohou přistoupit k třem možným řešením - využití elektrické stimulace, chirurgického odpojení nebo odstranění funkční části mozku [11].

2.2 Další klinické indikace

Kromě epilepsie se valproát používá také při léčbě jiných onemocnění. Bylo prokázáno, že valproát je účinný pro pacienty s bipolárními a schizofrenními poruchami, včetně těch, které jsou odolné vůči lithiu a karbamazepinu.

Bipolární porucha je psychické onemocnění, které je charakterizováno střídajícími se depresivními a manickými epizodami a nemocní tráví až třikrát delší čas v depresi než v manii. Nejčastěji se pro léčbu bipolární poruchy používá lithium nebo právě valproát, který je zvláště účinný proti manickým epizodám bipolárních poruch a má také širší spektrum účinku než lithium. Při celkovém srovnání je ale léčba lithiem výhodnější hlavně pro své lepší účinky při léčbě depresivních episod, které během bipolární poruchy převládají [7, 12, 13].

Klinické studie také prokázaly, že valproát podávaný v nízkých dávkách je účinný jako prevence proti migrénám, které jsou rezistentní na léky. VPA snižuje počet migrénových záchvatů, jejich trvání i intenzitu [14].

2.3 Vedlejší účinky

Jedním z výhod terapie VPA je její široká terapeutická míra bezpečnosti. VPA je spojena pouze s vzácnými idiosynkratickými reakcemi a řadou běžných vedlejších nežádoucích účinků.

Mezi nejběžnější nežádoucí účinky patří nevolnost, zvracení, pálení žáhy, dermatologické účinky (alopecie, vyrážka), neurologické účinky (ospalost, podrážděnost, ataxie) a přírůstek hmotnosti.

Kyselina valproová může také vyvolávat metabolické poruchy, například hypokarnitinemii a hyperamonemii. Tyto stavy se vyskytují hlavně u pacientů, kteří mají metabolické aberace a ty jsou odhaleny až přidaným stresem metabolismu VPA. Trombocytopenie a inhibice agregace trombocytů jsou častějšími nežádoucími účinky, vyskytujícími se u 12% pacientů užívajících VPA, avšak ve většině případů je trombocytopenie mírná. Mezi velmi vzácné a idiosynkratické nežádoucí účinky patří reverzibilní idiopatická hepatitida a hemoragická pankreatitida. Deriváty VPA jsou stále ve vývoji. Cílem je nalézt deriváty, které jsou silnější, méně teratogenní a méně hepatotoxické [15].

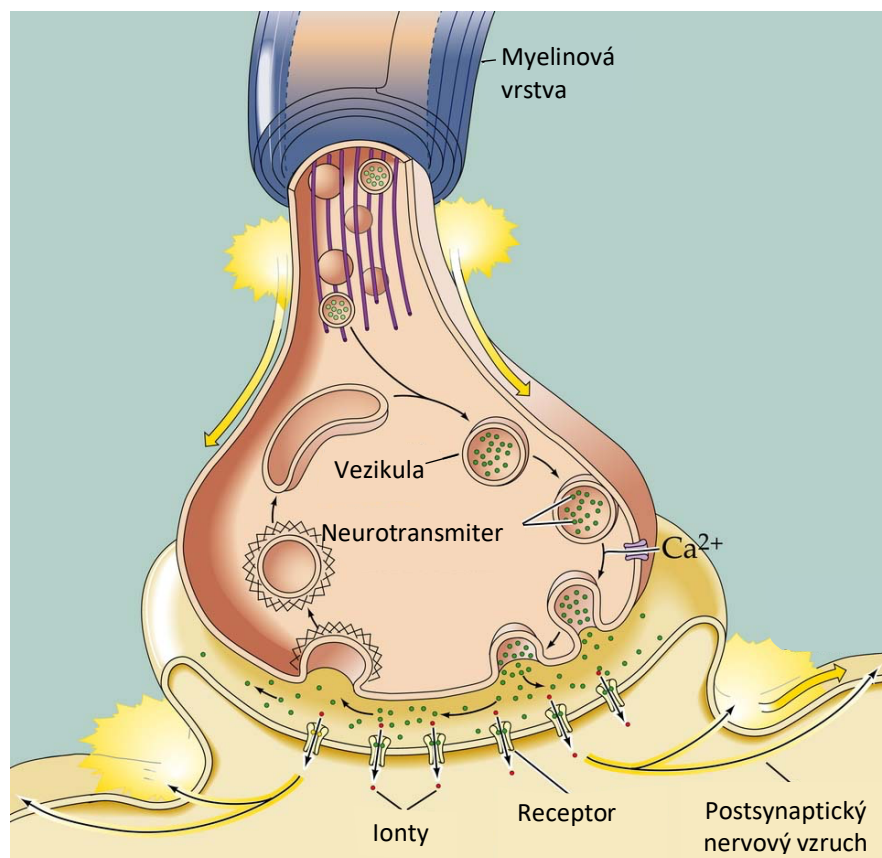
Důležitou vlastností valproátu je jeho silná teratogenita. Jeho použití pro těhotnou matku je tedy spojeno se zvýšeným rizikem významných vrozených abnormalit embrya a plodu. Přesto u většiny žen s epilepsií, které plánují těhotenství, nelze antiepileptika vysadit kvůli riziku záchvatů během těhotenství, což může být škodlivé jak pro matku, tak pro dítě. Existuje však rozdíl v rychlosti stupně teratogenního potenciálu různých antiepileptik.. Použití valproátu během těhotenství je spojeno s 1-2% výskytem rozštěpů neurální trubice, hlavně Spina bifida. Mohou se objevit i srdeční malformace, rozštěpy patra či vady končetin. Navíc je zaznamenána také vysoká míra spontánních potratů [15, 16].

3 MECHANISMUS ÚČINKU

Vzhledem k širokému spektru antikonvulzivních účinků proti různým typům záchvatů, bylo opakovaně prezentováno že valproát působí kombinací několika mechanismů. Mluvíme o zvýšení množství γ -aminomáselné kyseliny a jiných neurotransmiterů a působení valproátu na sodné kanály postsynaptického neuronu. Tyto mechanismy způsobují zastavení nebo zpomalení šíření nervového vzruchu mezi neurony.

3.1 Šíření nervového vzruchu

Jak již bylo řečeno, epileptické záchvaty jsou způsobeny abnormálními výboji neuronů. Nervový vzruch se v podobě akčního potenciálu šíří po buněčné membráně nervové buňky. Potenciál se může šířit po buněčné membráně axonu, nemůže ale „přeskočit“ synaptickou štěrbinu. Elektrický akční potenciál tedy musí být převeden chemickou reakcí na následující neuron pomocí chemického mediátoru, neurotransmiteru.



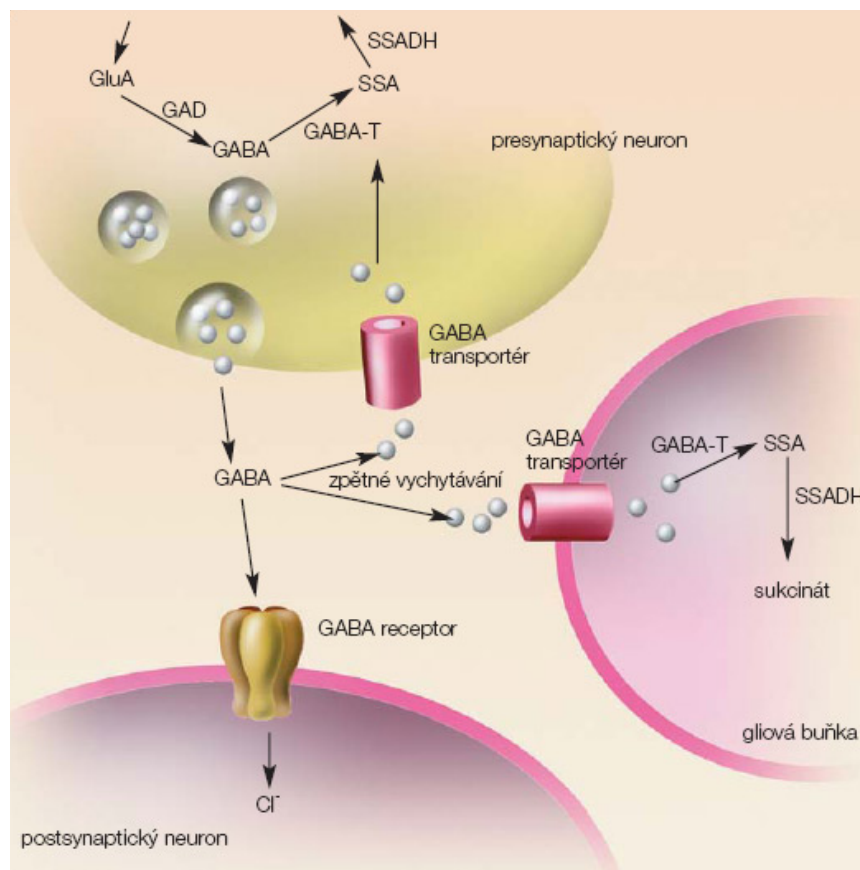
Obrázek 2 Nervová synapse [17]

Ve chvíli, kdy akční potenciál dosáhne synapse, způsobí otevření napětově řízených kanálů pro Ca^{2+} . Vápník vstupující do buňky způsobí posun vezikul s neurotransmiterem k presynaptické membráně, kde váčky splývají s buněčnou membránou a uvolní tak neurotransmitery do synaptické štěrbině. Mediátory se poté váží na receptory umístěné na postsynaptické membráně a otevírají tak konkrétní membránové kanály, kterými do postsynaptické buňky vstupují ionty. Nadbytečný neurotransmitter může být následně zpětně vychytáván do presynaptické buňky nebo může být biotransformován. Dle typu neurotransmiteru a receptorů na které působí, je výsledný efekt excitační nebo inhibiční. Nejznámějšími neurotransmitery jsou acetylcholin, noradrenalin, kyselina glutamová (excitační), kyselina γ -aminomáselná a glycin (inhibiční) [18, 19].

3.2 Účinek valproátu na γ -aminomáselnou kyselinu

γ -aminomáselná kyselina (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmitter v mozku. VPA dle studií způsobuje lokalizované změny hladin GABA v oblastech středního mozku jako substantia nigra. Jedná se o region, o němž se předpokládá, že je významně zapojen do vzniku záchvatů. Tento mechanismus podporuje i fakt, že inhibice signalizace GABA způsobuje záchvaty, a naopak, její potence zabráňuje záchvatům.

Přestože existují podstatné důkazy, že valproát zvyšuje koncentrace GABA v klinicky významných dávkách, mechanismus a funkční význam zvýšení hladin GABA v mozku je stále předmětem odborných debat. Zvýšení presynaptických hladin GABA vyvolaných valproátem lze vysvětlit odlišnými mechanismy, a to inhibičním účinkem valproátu na degradaci GABA nebo posílením syntézy GABA.



Obrázek 3 Schématické znázornění GABAergní inhibiční synapse s presynaptickým a postsynaptickým neuronem [20]

GABA je syntetizována v GABAergních presynaptických zakončeních axonu dekarboxylací glutamátu a je degradována presynaptickým zakončením a gliovými buňkami. Zvýšení koncentrace GABA díky valproátu byla původně přičítána inhibici GABA transaminázy (GABA-T), která katalyzuje degradaci GABA na sukcinsemialdehyd (SSA). Přesto většina studií in vitro [21, 22], pro inhibici GABA-T pomocí valproátu, zjistila inhibiční účinky pouze při velmi vysokých koncentracích, které nebyly dosaženy in vivo. Zdá se tedy, že redukce GABA-T není způsobena přímou inhibicí pomocí valproátu, ale sekundárním účinkem způsobeným změnami v následných krocích metabolismu GABA.

Valproát in vitro vykazuje oproti GABA-T větší inhibiční účinek na SSA dehydrogenázu (SSADH), což je enzym zodpovědný za degradaci SSA na kyselinu jantarovou [23, 24]. Akumulace SSA inhibicí SSADH by mohla vést ke zvýšení hladin GABA buď reverzí SSA na GABA nebo inhibicí degradace GABA, protože SSA je inhibitorem přímé reakce GABA-T. Nicméně inhibice těchto enzymů in vivo dosud nebyla prokázána.

VPA může také zvýšit syntézu GABA aktivací dekarboxylázy kyseliny glutamové (GAD), která přeměňuje kyselinu glutamovou na GABA. Takže i když zvýšená translace GABA může

příspěvek k antiepileptické aktivitě VPA např. u hlodavců, předběžné in vivo studie nepotvrdily zvýšení hladiny GABA v CNS u lidí [7, 14, 15].

3.3 Účinek valproátu na sodné kanály

VPA inhibuje napětově řízené kanály pro sodík, které jsou jedny z kanálů na postsynaptické buňce. Jejich otevřením dochází k excitaci. Podle studií prováděných na hippocampálních neuronech potkanů, valproát silně zpomaluje obnovení inaktivovaných napětově řízených kanálů pro Na⁺. Navíc studie na bezobratlých ukázaly, že valproát přímo inhibuje účinnost sodíkových kanálů. Tato schopnost omezit opakované vysokofrekvenční stimulační může přispět k efektivitě VPA při epilepsii, u níž nadměrně dochází k vysokofrekvenčním výbojům neuronů. Účinky valproátu na draselné kanály jsou ale příliš malé, než aby měly jako jediné význam v mechanismu antikonvulzivního účinku [7, 14].

3.4 Účinek valproátu na další neurotransmitery

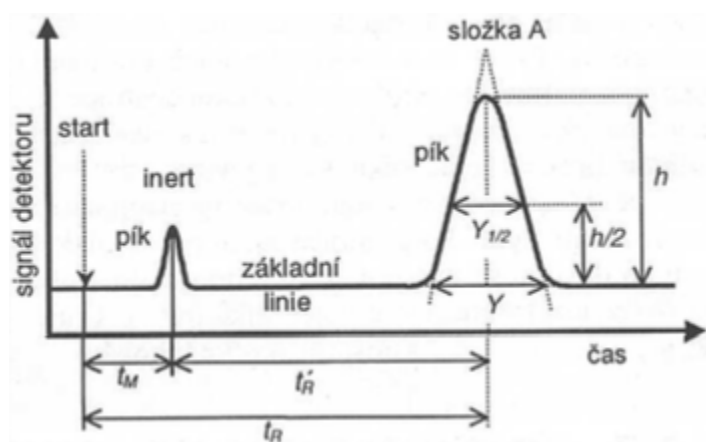
Dalším mechanismem, který by také vedl ke snížení excitační neurotransmise, je účinek na excitační neurotransmitery, například glutamát nebo aspartát. Některé studie naznačují, že VPA způsobuje snížení excitačního přenosu v mozku, a to snížením počtu akčních potenciálů vyvolaných aktivací NMDA. Další studie předpokládá, že VPA zvyšuje práh napětí, které je potřebné pro vznik nervového vzruchu [14, 25].

4 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) patří mezi moderní analytické separační metody, která má za účel separovat složky směsi a provést tak kvalitativní i kvantitativní analýzu. Separace složek probíhá mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fáze je u GC vždy plyn, stacionární fází může být pevná fáze, pak mluvíme o systému plyn-tuhá fáze (GSC) nebo kapalná fáze (systém plyn-kapalina, GLC). V těchto systémech se liší způsob separace, v případě GSC je distribuce mezi obě heterogenní fáze založena na absorpci, zatímco u GLC na rozpouštění [26-28].

4.1 Princip metody

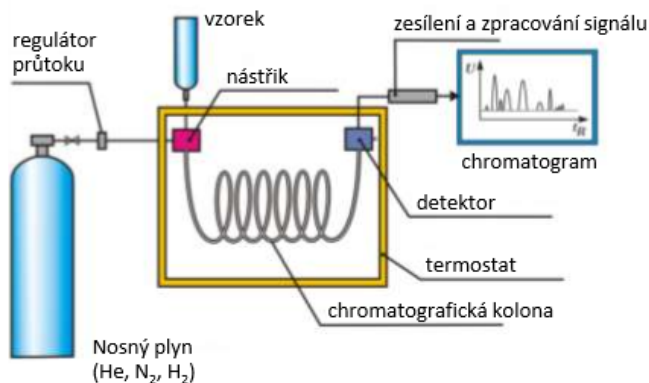
Kolonou se stacionární fází prochází nosný plyn. Vzorek je dávkován do vyhřívaného dávkovacího systému, kde se odpaří a ve formě par je unášen nosným plynem do kolony. Každá složka ze vzorku postupuje kolonou svou vlastní rychlostí závislou na distribuční konstantě složky. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru. Detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. U chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x retenční čas. Podle polohy píku, tzn. retenčního času, lze identifikovat o jakou látku se jedná. Plocha píku je úměrná množství látky ve vzorku. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar Gaussovy křivky a je popsán třemi parametry: retenčním časem t_R , výškou píku h a šířkou píku měřenou buď na základní linii Y nebo v polovině výšky píku $Y_{1/2}$ (viz obrázek 4) [29].



Obrázek 4 Chromatogram při eluční metodě [26]

4.2 Instrumentace

Plynový chromatogram se skládá z tlakové lahve, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Schéma plynového chromatografu je uvedeno na obr. 5.



Obrázek 5 Schéma plynového chromatografu [29]

4.2.1 Nosný plyn

Zdrojem nosného plynu je tlaková lahev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Volba nosného plynu je často určena druhem kolony a detektoru. Plyn následně prochází čisticím zařízením, které zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Regulátor průtoku zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu.

4.2.2 Dávkování

Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Pro zabránění kondenzace vzorku je důležité, aby teplota dávkovače přesahovala teplotu varu nejméně těkavé analyzované složky alespoň o 50 °C. Roztoky můžeme dávkovat jemnou nástřikovou jehlou přes těsnění ze silikonové gumy, a to v malých objemech (1 až 10 µl). Další možností je použití děliče toku, díky kterému se do kolony dostává jen definovaný zlomek nastříkovaného množství (0,1 až 2 µl).

4.2.3 Kolona

Kolona je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. Kolony mohou být náplňové nebo kapilární.

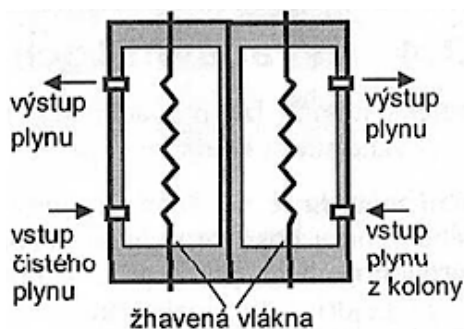
- Náplňová kolona – je tvořena kovovou nebo skleněnou trubicí, která je naplněna částicemi stacionární fáze. Pro absorpční chromatografii se jako náplně používají např. silikagel, grafitizované saze nebo alumina (oxid hlinitý).

- Kapilární kolona – je nejčastěji vyrobena z křemenné kapiláry. Kapilára je obalena polyimidovou vrstvou, která chrání křehký materiál kolony. Na vnitřní straně kapiláry je zakotvena (nanesena nebo chemicky navázána) netěkavá kapalina sloužící jako stacionární fáze. Stacionární kapaliny by měly dobře rozpouštět separované látky a samy být teplotně stálé a málo těkavé. Také by měly být pevně ukotveny na nosiči, aby nedocházelo k jejich vymývání.

4.2.4 Detektor

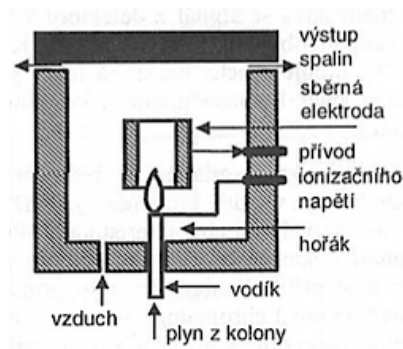
Nosný plyn z kolony prochází detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor musí mít dostatečnou citlivost.

- Tepelně vodivostní detektor (TCD) – jedná se o univerzální detektor. Nosný plyn proudí přes elektricky žhavené vlákno a tím ho ochlazuje na určitou teplotu. Přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem vlákna a tím jeho teplotu i elektrický odpor. Detektor se skládá z měrné a srovnávací cely, v každé je umístěno žhavené vlákno. Přes jednu celu proudí čistý nosný plyn, přes druhou plyn z kolony. Schéma detektoru je uvedeno na obrázku 6.



Obrázek 6 Schéma tepelně vodivostního detektoru [26]

- Plamenový ionizační detektor (FID) – využívá ionizace molekul v kyslíkovodíkovém plameni. V hořáku je spalována směs vodíku a vzduchu do něhož je přiváděn i výstup z kolony (viz obrázek 7). Dokud do plamene přichází pouze nosný plyn je množství nabitých částic minimální. Pokud je v plamenu spalována látka přicházející z chromatografické kolony dojde ke zvýšení počtu iontů a elektronu v prostoru detektoru a dojde ke zvýšení elektrické vodivosti a procházejícího proudu. Velikost signálu závisí na typu a koncentraci detekované látky. Detektor je univerzální a poskytuje odezvu na většinu organických sloučenin.



Obrázek 7 Schéma plamenově ionizačního detektoru [26]

- Detektor elektronového záchytu (ECD) – radioaktivní zářič ^{63}Ni svým zářením β (proud rychlých elektronů) ionizuje molekuly nosného plynu a vyvolává ionizační proud. Uvolňují se pomalé elektrony, které zachycují elektronegativní atomy složek a tím snižují ionizační proud. Detektor je velmi citlivý na halogenované sloučeniny a také na sloučeniny obsahující fosfor, síru, olovo, nitrosloučeniny nebo areny.
- Hmotnostní spektrometr – nepostradatelné je spojení plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru (GC-MS) v případech, kde se identifikují neznámé složky. Pro každou složku lze získat její hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter. Základem hmotnostní spektrometrie je převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a detekce. Ve spojení s plynou chromatografií se využívá zejména elektronové ionizace, která patří mezi tvrdé ionizační techniky. Pro ionizaci se zpravidla využívá elektronů o energii 70 eV.
- Fotoionizační detektor
- Atomový emisní detektor

4.2.5 Termostat

Zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu.

4.2.6 Vyhodnocovací zařízení

Zpracovává signál z detektoru a zakresluje chromatografickou křivku – chromatogram [26-28].

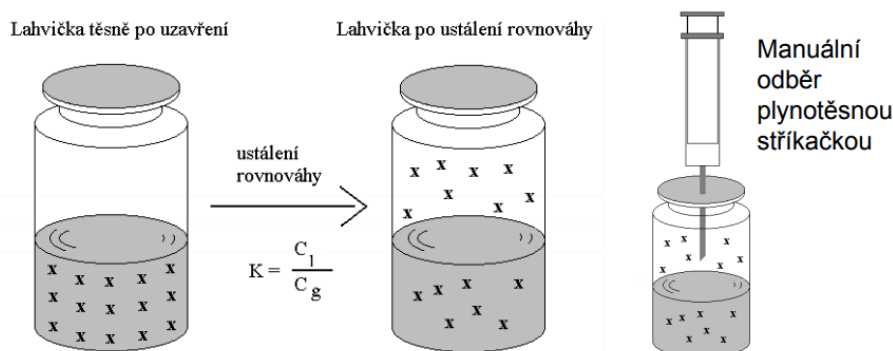
4.3 Extrakce

Extrakce je separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Analyty se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení. Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek vzorku nebo naopak oddělení rušících složek od analytu [30].

Pro zabránění kontaminace dávkovače a separační kolony je nutno dávkovat vzorek, jehož veškeré složky jsou dostatečně těkavé. Aby nedošlo k chemické degradaci stacionární fáze kolony, je většinou nutno odstranit ze vzorku vodu. Pro odstranění netěkavých složek směsi a vody se mohou použít různé druhy extrakce [28].

4.3.1 Extrakce plyn-kapalina

Jedná se o postupy, kterými se stanovují obsahy těkavých složek kondenzovaných materiálů analýzou plynné fáze, která je v rovnováze s analyzovaným materiálem. V klinické praxi je použitelná tzv. statická headspace, kdy se analyzuje vzorek plynu odebraný z prostoru nad hladinou kapaliny nebo nad povrchem pevného materiálu. Takový systém musí být uzavřený a fáze musí být v rovnováze (např. analýza těkavých látek v krvi) [32].



Obrázek 8 Headspace extrakce [32]

4.3.2 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je založena na rozdělovací rovnováze dvou navzájem nemísitelných kapalin. V takovém systému složka z větší části přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná. Podmínkou je ustanovení rovnováhy mezi těmito kapalinami, tj. výchozím vzorkem s analytem a rozpouštědlem, do kterého se má analyt v co největší míře převést. Cílem extrakce je vyextrahovat co nejvíce dané složky, a to s co nejmenší spotřebou rozpouštědla a s co nejmenším počtem kroků. Je proto velice důležité, zvolit rozpouštědlo

takové, ve kterém je extrahovaná látka mnohem více rozpustná než v rozpouštědle, ze kterého se extrahuje [27].

4.3.3 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je v současné době nejvýkonnější dostupná technika pro rychlou a selektivní přípravu vzorků. Extrakce využívá principy kapalinové chromatografie, dochází zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulárních interakcí (například van der Waalsových sil nebo vodíkové vazby) ulpívají na sorbentu. SPE má oproti extrakci kapalina-kapalina několik výhod, například lepší selektivitu a menší množství použitých organických rozpouštědel.

Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny ze vzorku jsou zachyceny materiálem sorbentu v koloně. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím vhodně zvolenými rozpouštědly. Nakonec jsou analyty z kolonky vymyty elučním rozpouštědlem, které eluuje analyty ze sorbentu. Průtok kapalin přes kolonku může být urychlen centrifugací nebo využitím vakua na výstupu z kolonky.

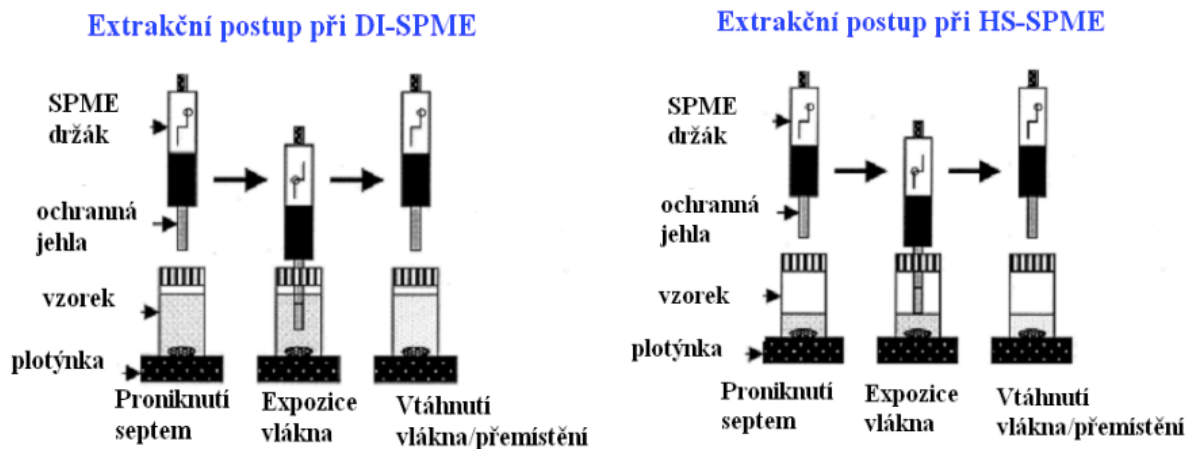
SPE kolonky obsahují nejčastěji sorbenty na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Při volbě vhodného sorbentu zvažujeme podstatu analytu, vyžadovaný stupeň jeho čistoty, vlastnosti matrice vzorku a hlavních kontaminantů [27].

4.3.4 Mikroextrakce tuhou fází

Principem mikroextrakce tuhou fází (SPME) je sorpce složky vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. Vlákno o délce 1 cm pokryté zakotvenou fází je nejdůležitější součástí zařízení. Jehla slouží k ochraně vlákna před mechanickým poškozením a k propíchnutí septa v zátce vialky, ve které se nachází matrice. Jehla s vláknem se zasune do vzorku, vlákno se z jehly při procesu vzorkování vysune pomocí pístu a nechá se po určitou dobu proběhnou sorpce na tuhou fázi. Následně se vlákno zatáhne zpět do jehly, jehla se vytáhne a vloží se do nástřikového prostoru chromatografu (plynového nebo kapalinového) a vlákno se opět vysune.

Metoda SPME umožňuje provádět dva způsoby extrakce (obr. 9). První způsob je přímá SPME, označovaná zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází přímo k ponoření vlákna do vzorku. Druhým způsobem je headspace SPME, označovaná zkratkou HS-SPME.

Tato druhá varianta využívá extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě a využívá se převážně pro extrakci těkavých látek.



Obrázek 9 Extrakce DI-SPME a HS-SPME [34]

K výhodám této metody patří rychlost stanovení, citlivost a také vysoká přesnost. Metoda SPME se obejde zcela bez organických rozpouštědel, jedná se tedy o „solvent free“ techniku [27, 34].

4.4 Derivatizace

Chemická derivatizace je proces přeměny chemické struktury separované látky, která je provedena za účelem zlepšení chromatografických vlastností pro analýzu plynovou chromatografií.

Vysokomolekulární látky s funkčními skupinami -OH, -COOH, -NH₂ apod. je obtížné stanovit přímo, protože jsou vlivem těchto skupin značně polární a málo těkavé. Obvykle dochází k jejich adsorpci v koloně a tím k chvostování elučních křivek. Tyto problémy lze odstranit přípravou vhodných derivátů. Při derivatizaci dochází k záměně aktivního vodíku polární skupiny nejčastěji za alkylovou, silylovou či acylovou skupinu. Blokováním protonu se zamezí tvorbě vodíkového můstku, což vede ke zvýšení těkavosti derivátů ve srovnání s původními nederivatizovanými látkami.

V reakční plynové chromatografii, je tedy systém doplněn o další prvek, reaktor, v němž dochází k reakci a tím i k přeměně původních látek. Derivatizační techniky využívající specifické reakce před chromatografickým procesem (pre-column), v jeho průběhu (on-column), nebo po jeho ukončení před vstupem do detektoru (post-column) [26, 35].

Chemická derivatizace molekuly vzorku často zlepšuje symetrii píku, těkavost a tepelnou stabilitu při separaci plynovou chromatografií a může poskytnout zlepšenou selektivitu a detekční limity. Na druhou stranu však představuje derivatizace další krok navíc a tím i další možný zdroj chyb [26, 36].

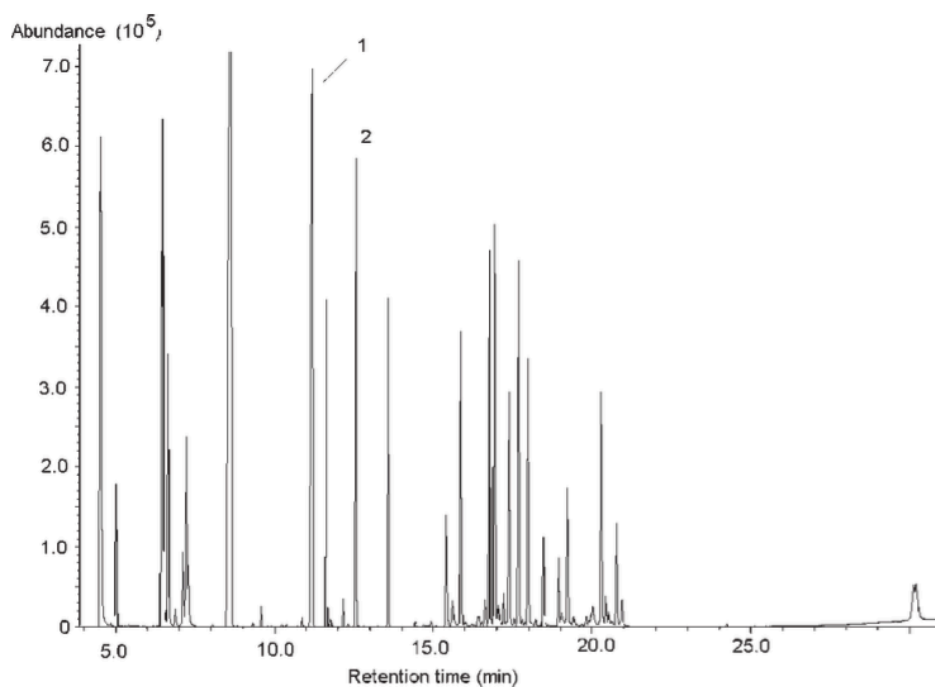
5 STANOVENÍ VALPROÁTU POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Jednotlivá stanovení VPA pomocí plynové chromatografie se nejčastěji liší druhem vzorku (plasma, krevní sérum, sliny), použitou extrakcí, derivatizací a jejich různou kombinací. Monitorování hladin VPA v plazmě pacienta je nezbytné, jestliže dochází ke změnám dávky VPA nebo klinického stavu pacienta. Bioanalytická část farmakokinetické studie vyžaduje, aby byl test jednoduchý, měl vysokou citlivost a malé požadavky na objem vzorku [37].

5.1 Stanovení VPA z plazmy

Íránská studie z roku 2015 [38] využila pro extrakci valproátu z plazmy disperzní mikroextrakci kapalina-kapalina, při které se do roztoku analytů přidává disperzní rozpouštědlo, mísitelné s vodou, a extrakční rozpouštědlo nemísitelné s vodou. Ve výsledném zakaleném roztoku bylo rychle dosaženo rovnovážného stavu. Jako disperzní rozpouštědlo byl použit aceton a jako extrakční rozpouštědlo chloroform. Po oddělení vzniklých fází byl obohacený analyt kyseliny valproové stanoven pomocí plynové chromatografie s využitím plamenově ionizačního detektoru. Derivatizace v tomto případě nebyla nutná. Velký vliv na výslednou separaci má výběr správného disperzního a extrakčního rozpouštědla a úprava pH.

Jednou z možností stanovení valproátu je využití derivatizace ve vodné fázi [37]. VPA v plazmě byla derivatizována směsí kyseliny benzoové, ethanolu, pyridinu a isobutylesteru kyseliny chloromravenčí za laboratorních podmínek. Výsledný ethylester kyseliny valproové byl okamžitě extrahován pomocí HS-SPME. Jak studie ukázala, teplota vzorku a doba extrakce mají vliv na účinnost extrakce. Zvýšením teploty vzorku na 80 °C může být doba extrakce zkrácena na 20 min oproti 50 min při laboratorní teplotě (25 °C). Extrakty byly analyzovány kolonovou plynovou chromatografií za použití helia jako nosného plynu. Jako detektor byl využit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací. Koncentrace VPA ve vzorcích plazmy byla kvantifikována metodou vnitřního standardu. Nevýhodou této metody stanovení by mohla být vysoká cena SPME vláken, jejich omezená životnost, a navíc je pro ně omezený výběr stacionárních fází [39].



Obrázek 10 Chromatogram vzorku plazmy ze zdravého subjektu po podání jednorázové 500 mg perorální dávky VPA. Pík 1, ethylester kyseliny valproové; pík 2, ethylester kyseliny benzoové (IS) [37]

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – rychlá, jednoduchá, levná, robustní a bezpečná) to je metoda extrakce která byla původně vyvinuta pro testování pesticidů v potravinách. Japonský tým v roce 2017 Využil tuto metodu pro extrakci valproátu z plazmy [40]. Zředěná plazma byla přidána do zkumavky naplněné extrakční solí (síran hořečnatý a octan sodný), dále byl přidán acetonitil a vnitřní standard. Po třepání a centrifugaci byla část vzorku přenesena do zkumavky obsahující síran hořečnatý a silikagel a po další centrifugaci byl extrakt analyzován s použitím systému kapilární GC-MS. Ani v tomto případě nebyla nutná derivatizace.

5.2 Stanovení VPA ze séra

Kromě plazmy můžeme stanovení provádět také ze séra. Sérum je kapalnou složkou krve, která vznikne po srážení [41]. Sérum složením odpovídá krevní plazmě, ale neobsahuje fibrinogen a další srážecí faktory krve. Vzorky krve byly centrifugovány a poté bylo sérum uloženo při -20 °C. Vzorek byl připraven smícháním 200 μ l séra, 800 μ l okyselené vody a vložen do skleněné vialky se silikonovým septem. Extrakce byla provedena pomocí headspace mikroextrakce kapalnou fází [38]. Do mikrostříkačky bylo nataženo 2 μ l organického rozpouštědla obsahujícího 10 μ g/ml kyseliny butanové (IS). Injekční stříkačka byla zavěšena nad lahvičku pomocí kovového stojanu. Jehla stříkačky byla zasunuta tak, aby konec jehly byl

asi 1 cm nad hladinou roztoku. Píst byl úplně stlačen, aby tak vznikla 2 μ l kapka rozpouštědla. Mezitím byl roztok neustále míchán pro podpoření difúze VPA ze séra do kapky rozpouštědla. Po určité studované době extrakce byla kapka zasunuta zpět do jehly. Injekční stříkačka byla potom vyjmuta z injekční lahvičky a rozpouštědlo bylo nadávkováno do chromatografu. Pro analýzu byl použit kapilární plynový chromatograf s děličem toku, heliem jako nosným plynem a FID. Výhodou metody je použití mikroextrakce, která je rychlá a vyžaduje jednoduché laboratorní vybavení. Studie také zkoumala vliv pH vzorku, délky a teploty extrakce vzorku na velikosti píků.

5.3 Stanovení VPA z krve

Jednou z nových možností odebrání vzorků a následného stanovení valproátu je jejich testování pomocí suché krevní skvrny na papíru (DBS), které se získávají z krve z píchnutého prstu. Výhodou této metody je minimální invazivita, pohodlí pacienta pro čas i místo odběru vzorku a stabilita analytu. Brazílská studie z roku 2014 [42] využívá papírků Whatman 903 na které bylo napipetováno 50 μ l vzorku, po 3 h zaschnutí byl z každého vzorku získán, pomocí děrovačky, jeden 6 mm disk. Disk se vzorkem byl vložen do zkumavky a k němu přidáno 200 μ l extrakčního roztoku o složení acetonitril a methanol (1:3, v/v) spolu s cyklohexankarboxylovou kyselinou (1 mg/ml). Po 1 hodině v ultrazvukové lázni bylo vstříkováno 1 μ l vzorku do GC/MS s použitým polyethylenglykolem jako stacionární fází. Studie ukázala, že vzorky VPA v DBS jsou stabilní až po dobu 21 dní a to při skladování za teploty 45 °C (tyto podmínky simulovaly podmínky, kterým by byl vzorek podroben při poslání poštou v Brazílii), není tedy nutné skladovat vzorky v chladu. Studie také prokázala, že koncentrace v séru a DBS spolu vysoce korelují a je tedy možné koncentraci v séru odhadnout pomocí testování DBS a následným přepočtem pomocí faktoru ekvivalence. Nevýhodou této metody pro stanovení valproátu může být malé množství vzorku a těkavost testované látky.

5.4 Stanovení VPA z ústních tekutin

Jako alternativní biologickou maticí pro stanovení valproátu, a jiných léčiv, využívá španělská studie z roku 2007 ústní tekutiny (sliny) [43]. Výhodou slin nad tradičními maticemi, jako je moč a krev je, že sběr vzorků je téměř neinvazivní a relativně snadný. Nevýhodou metody je možné ovlivnění koncentrace léčiva díky změně pH slin nebo jejich průtoku. Při výběru vhodné

metodiky stanovení se také musí brát v úvahu omezené množství vzorku (1-3 ml) a požadavky na citlivost, jelikož koncentrace léčiv ve slinách mohou být nižší než v plazmě. Vzorky ústní tekutiny byly odebrány žvýkáním tamponu z neutrální vaty (Salivette®) po dobu 2 min, poté byl tampon přenesen do zkumavky a k němu byl přidán 1 ml směsi 1 M fosforečnanu draselného, 150 mM NaCl, 0,02 % thimerosalu a skladován 12 hodin při 4 ° C. Vzorek byl poté centrifugován a vzniklý výluh byl před samotnou analýzou pomocí plynové chromatografie uskladněn při -20 °C. Vzorky byly poté analyzovány pomocí GC-MS, kdy jako nosný plyn bylo použito helium. Přestože studie uvádí, že výsledky pro valproát nemohou být validovány, protože jsou závislé na stavu chromatografické kolony, jedná se o další možnost stanovení.

Stanovením valproátu ze slin se již zabývala studie z roku 1982 [44]. Bylo zjištěno, že problémem stanovení valproátu ze slin je špatná korelace buď s celkovými plazmatickými koncentracemi nebo s nevázanou frakcí nalezenou v séru. Špatná korelace může vyplývat z nízké hodnoty pK_a . Variabilita zjištěných údajů v rámci této studie naznačuje, že by byly nezbytné zvláštní protokoly pro odběr vzorků slin pro předpovídání koncentrací. Pro stanovení byla použita plynová chromatografie s heliem jako nosným plynem a hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Vzorky slin byly sbírány uplivnutím do scintilačních lahvíček a skladovány při -20 °C až do samotné analýzy. Ke 200 μ l vzorku bylo přidáno 200 μ l roztoku vnitřního standardu a 200 μ l extrakčního rozpouštědla (10 % ethylacetát v n-hexanu). Po promíchání a centrifugaci bylo do kolony nadávkováno 2 μ l horní organické fáze. Spolu se vzorkem slin byly podobně připraveny a analyzovány vzorky séra, aby mohly být údaje použity pro vyhodnocení. Pro analýzu bylo použito pouze 50 μ l a po kroku odstředování byl do odebrané horní organické vrstvy přidáván t-BDMCS (tetra-butyldimethylchlorosilanimidazol). Bylo zjištěno, že koncentrace valproátu ve slinách je 1% z celkové hladiny valproátu v séru.

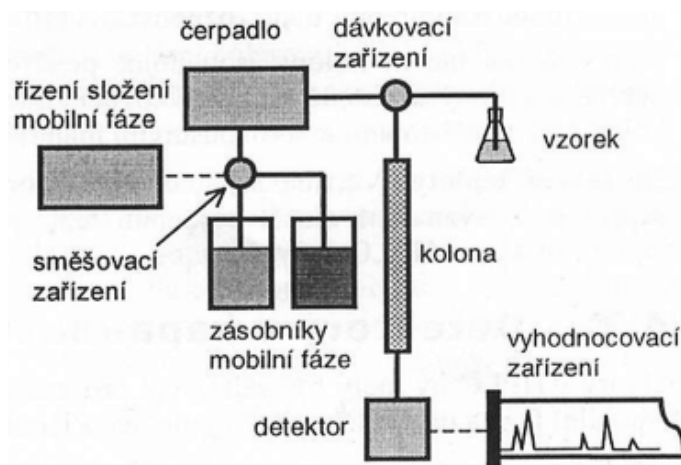
6 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Další využitelnou moderní separační technikou pro stanovení valproátu je kapalinová chromatografie (Liquid chromatography-LC). Na rozdíl od GC je u kapalinové chromatografie mobilní fází vždy kapalina a o separaci složek rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází ale také použitá mobilní fáze. Může být využito různých druhů mechanismů separací – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulový síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Na základě uspořádání rozdělujeme kapalinovou chromatografii na kolonovou a v plošném uspořádání (tenkovrstvá a papírová chromatografie).

V dnešní době se nejčastěji využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Vysokých účinností se dosahuje pomocí stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinnosti řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony. Mobilní fáze je čerpána vysokotlakými čerpadly [27, 45].

6.1 Instrumentace v kolonové LC

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, směšovacího zařízení, čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku 11.



Obrázek 11 Schéma kapalinového chromatografu [27]

6.1.1 Směšovací zařízení

Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení vzniklé mobilní fáze v průběhu separace.

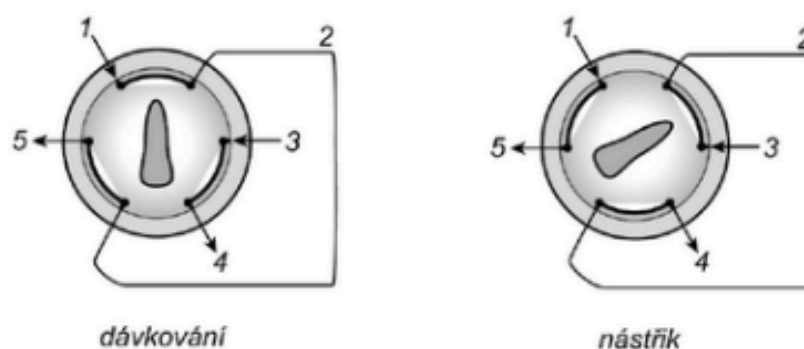
6.1.2 Čerpadlo

Mobilní fáze se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo dosahuje průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1 % kolísáním průtoku a při tlaku 20-60 MPa, v některých případech až 130 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) musí být odolný mechanicky i chemicky, aby nereagoval s mobilní fází.

Jednočinné pístové čerpadlo by způsobovalo rušivé tlakové rázy. Proto jsou používána dvojčinná čerpadla či dvě jednočinná čerpadla pracující proti sobě. Řízení čerpadla mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulzů [27, 46, 47].

6.1.3 Dávkovací zařízení

Pro dávkování vzorku do systému se v dnešní době nejčastěji využívá šesticestného dávkovacího ventilu. Dávkování probíhá bez přerušování toku mobilní fáze mezi čerpadlem a kolonou. Při dávkování dochází k naplnění smyčky vzorkem. Rychlým otočením dávkovacího ventilu začne mobilní fáze vytlačovat vzorek uvnitř smyčky směrem do kolony (nástřik). Smyčky jsou vyměnitelné a jejich objem se pohybuje od jednotek po desítky mikrolitrů. Schéma dávkovacího ventilu je na obrázku 11 [48].



Obrázek 12 Schéma šesticestného dávkovacího ventilu 1 – nástřik vzorku, 2 – dávkovací smyčka, 3 – přívod mobilní fáze z čerpadla, 4 – odtok mobilní fáze do kolony, 5 – odpad [48]

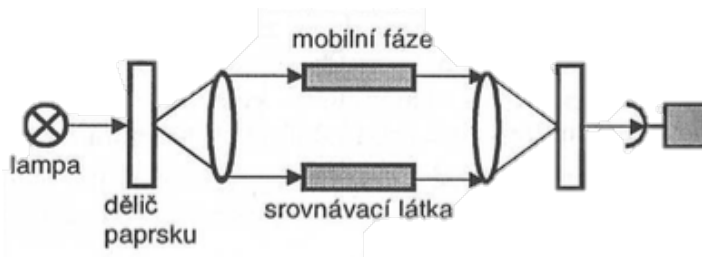
6.1.4 Kolony

Pro většinu analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli, která dokáže odolat vysokým tlakům a jsou poměrně krátké (zpravidla 10, 15 nebo 25 cm). Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází definovaného průměru a velikosti pórů. Materiály pro plnění jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na niž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze. Alternativou mohou být kolony monolitické. Jedná se o jednolitý kus materiálu, který zcela zaplňuje vnitřní část kolony. Výhodou oproti částicovým typům kolon je absence mezičásticových prostor, mobilní fáze je tedy nucena protékat póry monolitu. Vysoká pórovitost a mimořádně nízký odpor vůči proudění kapaliny je předpokladem vysokých průtokových rychlostí, vhodných k velmi rychlým separacím.

Jako ochrana hlavní kolony, před nečistotami a nerozpustnými materiály, jsou používány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu.

6.1.5 Detektory

- Spektrofotometrický detektor – patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluentu vycházejícího z kolony. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové a viditelné (VIS) oblasti (například 254 nm – rtuťová výbojka), složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem a kontinuálně se snímá signál eluovaných složek. V současnosti se často používá detektor s diodovým polem, který je schopen okamžitého záznamu celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek.
- Refraktometrický detektor – měří rozdíly mezi indexem lomu eluentu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát cizí složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho použití je nutné dodržování konstantní teploty. Jeho schéma je znázorněno na obr. 12.



Obrázek 13 Schéma refraktometrického detektoru [27]

- Fluorescenční detektor – je založen na principu fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce. Vysílané záření se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor má detekční limit až 10^{-12} g.ml⁻¹ analytu a je vysoce selektivní. Jako zdroj záření se nejčastěji používá vysokotlaká xenonová výbojka nebo laser.
- Elektrochemický detektor – detektory vodivostní a voltametrické lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty, respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizované elektrodě. Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu.
- Hmotnostní spektrometr – jako detektor je použitelný nejen v plynové, ale i kapalinové chromatografii. Při spojení s kapalinovou chromatografií se nejčastěji využívají měkké ionizační techniky, jako elektrospreje nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku. U těchto technik nedochází k výrazné fragmentaci a jsou pozorovány protonované či deprotonované ionty v závislosti na polaritě vloženého napětí [27, 46, 47].

6.2 Druhy kapalinové chromatografie

6.2.1 Adsorpční kapalinová chromatografie

Adsorpční kapalinová chromatografie (LSC) využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem.

Jako absorbenty v LSC se používají zrnité materiály na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého. Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch těchto sorbentů – kulovité části absorbentu v sobě obsahují póry. Adsorpční aktivita adsorbentu je dána jeho polaritou a počtem adsorpčních míst. Rozpouštědlo i rozpuštěné látky soutěží o místa na povrchu stacionární fáze. Na začátek kolony naplněné adsorbentem se vnese vzorek a při promývání kolony eluentem se složky vzorku pohybují ve směru eluentu tím rychleji, čím méně jsou adsorbovány. Proto je vhodná volba rozpouštědla důležitá pro eluci analytu. Adsorpční chromatografie je užitečná pro separaci nízko a středně polárních vzorků o relativní molekulové hmotnosti do 1000.

Obecně platí, že nepolární analyty jsou eluovány nepolárními rozpouštědly a polární polárními. Mobilní fáze by neměla mít příliš velkou viskozitu, aby nekladla velký odpor proti převodu

hmoty a protékala kolonou při určitém tlaku s dostatečnou rychlostí. Neměla by chemicky narušovat nebo vymývat stacionární fázi [27, 49].

6.2.2 Rozdělovací kapalinová chromatografie

Podstatou rozdělovací kapalinové chromatografie (LLC) je distribuce složek mezi kapalnou mobilní fází a kapalnou stacionární fází, která je mechanicky či chemicky vázána na pevném podkladu. Látky se rozdělují podle jejich rozpustností, přičemž obě kapaliny (mobilní i stacionární) musí být nerozpustné.

Chromatografie hydrofilních interakcí je druh chromatografie s normálními fázemi, která využívá mobilní fáze mísitelné s vodou. Stacionární fáze je polární (silikagel, kyano, amino polární polymerní fáze) a mobilní fáze musí obsahovat vysoké procento organické složky a malé množství vody. Na povrchu polární stacionární fáze se adsorbuje vrstva bohatá na vodu. Analyt se rozdělí mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi s nízkým obsahem vody. Polárnější sloučeniny mají vyšší afinitu ke stacionární fázi. Látky se separují na základě polarit [50, 51].

6.2.3 Chromatografie v systému s obrácenými fázemi

Téměř 85 % všech aplikací v LC využívá chromatografii v systémech s obrácenými fázemi, kde se využívá nepolární stacionární fáze (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagel) a polární mobilní fáze (voda, acetonitril). Růst polarit mobilní fáze v systému s obrácenými fázemi (stává se méně podobnou stacionární fázi) vede k růstu retenčních časů analytů [27].

6.2.4 Iontově-výměnná chromatografie

Stacionární fázi v iontově – výměnné chromatografii je měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celuloza, dextran aj.) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Ten je vyměňován iontem obsaženým v mobilní fázi.

Iontoměniče (ionexy) se dělí na:

- **Anexy** – jejich funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů.
- **Katexy** – jejich funkční skupiny jsou kyselé a slouží k výměně kationtů.

Iontově-výměnná chromatografie je hojně využívána jak k separaci slabých organických kyselin a zásad, tak i anorganických iontů. Obecně platí pravidlo, že ionty s větším nábojem

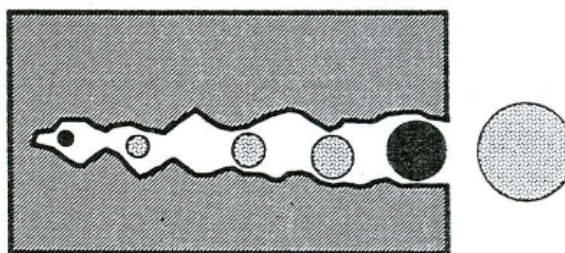
jsou zadržovány více než ionty s nábojem menším. Při stejných nábojích platí další pravidlo, že větší retenci má ion s větší hmotností [27, 49].

6.2.5 Chromatografie sterické vyluky

U chromatografie sterické vyluky jsou molekuly separovány podle své velikosti. Stacionární fázi jsou malé kulovité částice, které obsahují značné množství pórů o definovaném průměru. Póry, právě tak jako celý ostatní prostor mezi částicemi, jsou vyplněny mobilní fází. Mobilní fáze nemá jinou úlohu než transportovat složky kolonou.

Chování složek podle jejich průměru:

- při průchodu kolonou jsou molekuly složek zadržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly
- do pórů se pro svou velikost nedostanou a tím pádem postupují kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze [27, 49, 52].

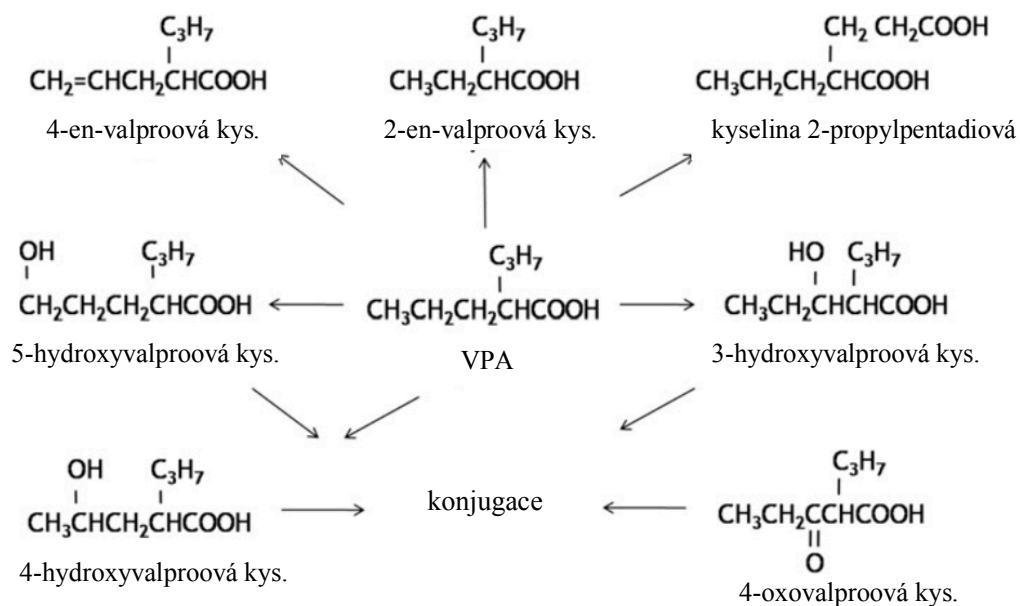


Obrázek 14 Permeace molekul různé velikosti do póru [27]

7 STANOVENÍ VALPROÁTU POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

7.1 Stanovení VPA z plazmy

Většina studií, které se zabývají stanovováním pomocí kapalinové chromatografie, stanovují nejen samotný valproát ale i jeho metabolity, které můžeme v plazmě nalézt. Těmito metabolity mohou být například 3-OH-VPA, 4-OH-VPA, 3-keto-VPA, 2-en VPA nebo 4-en-VPA.



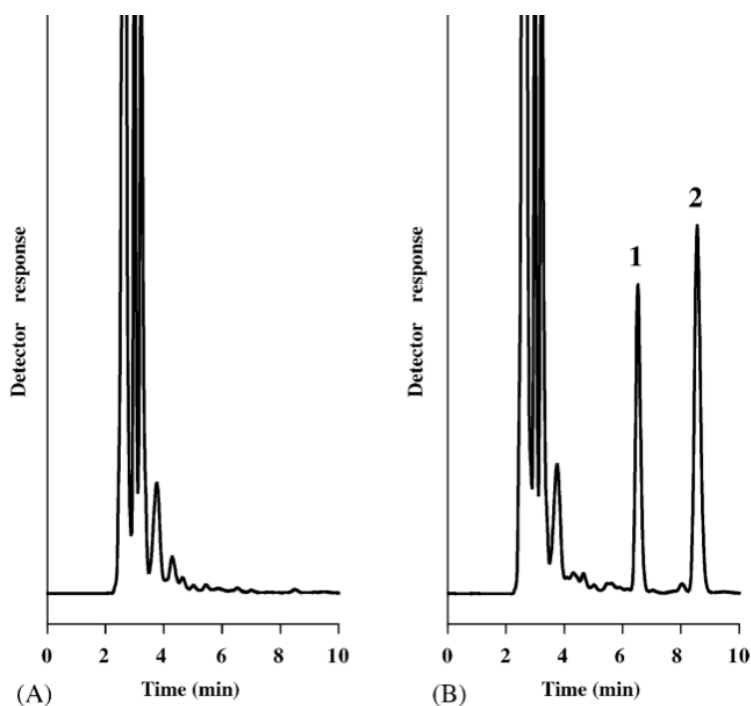
Obrázek 15 Metabolické cesty kyseliny valproové [53]

Systému HPLC-MS využívá čínská studie z roku 2017 [54], kde byla stanovena kyselina valproová a pět jejích metabolitů. 100 μl vzorku plazmy, 50 μl 9% kyseliny mravenčí a 10 μl benzoové kyseliny (která byla použita jako vnitřní standard IS) bylo odměřeno do 1,5 ml mikrozkušavky a promícháno. Poté bylo do zkumavky přidáno 500 μl ethyl acetátu a směs byla centrifugována. Vzniklá organická fáze byla odsáta a následně odpařena do sucha. Poté bylo přidáno 100 μl roztoku acetonitril:10 mM octan amonný (90:10, v/v) a vzniklá organická fáze byla opět odpařena do sucha za použití vakuového koncentrátoru při pokojové teplotě. Výsledný zbytek byl nakonec rozpuštěn ve 100 μl acetonitrilu. Vzniklá organická fáze byla použita pro analýzu pomocí kapalinové chromatografie s mobilní fází acetonitril:10 mM octan amonný (90:10, v/v) při teplotě 40 $^\circ\text{C}$.

Další čínská studie z roku 2001 [55] využila mikroextrakce tuhou fází pro odstarnění proteinů a dalších složek z plazmy. Do 200 μl vzorku bylo přidáno 20 μl vnitřního standardu kyseliny benzoové (2,5 g/ml) a 50 μl kyseliny chlorovodíkové (10 %, v/v). Směs byla promíchána

aeextrahována s využitím SPE extrakce na Oasis® HLB patronce. Po promytí vodou a 10 % methanolem byla VPA eluována 90 % methanolem. Vzniklý roztok byl analyzován v LC-MS s mobilní fází methanol:10 mM octan amonný (80:20, v/ v) obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí. Studie zjistila, že koncentrace valproátu v plazmě je několikanásobně vyšší oproti jeho metabolitům.

V práci Lin a kol. [56] byla studována možnost využití fluorescenční detekce při stanovení VPA. K 10 µl plasmy bylo přidáno 50 µl vody, 20 µl kyseliny pelagonové (vnitřní standard) a HCl pro okyselení. Vzniklý roztok byl extrahován 0,5 ml toluenu a po centrifugaci byla vzniklá organická fáze použita pro derivatizaci. 200 µl roztoku bylo přidáno do zkumavky obsahující 200 µl derivatizačního činidla (NOEPES, 2-(2-naftoxy)ethyl-2-(piperidin)ethansulfonát) v toluenu. Po dalších úpravách byl vzorek analyzován pomocí HPLC s mobilní fází methanol-voda. Výhodou metody je využití toluenu jako rozpouštědla jak pro extrakci, tak derivatizaci.



Obrázek 16 Chromatogram (A) čistá plasma, (B) plasma pacienta, pík 1 - derivát kyseliny valproové, pík 2 – vnitřní standard [55]

7.2 Stanovení VPA z krve

Portugalská studie z roku 2011 [53] se zabývala nejen stanovením valproátu v krvi ale v ledvinách a játrech z důvodu toxikologické studie. K 0,5 ml vzorku krve bylo přidáno 50 ml standardního roztoku hydrochlorothiazidu a 50 ml 10 % kyseliny fosforečné. Poté následovala

SPE extrakce a vysušení. Vysušený extrakt byl poté rozpuštěn v 200 μl vody a 10 μl bylo použito pro analýzu za použití ultra vysokoučinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií s mobilní fází acetonitril: octan amonný. Výhodou této metody je rychlá extrakce bez nutnosti chemické derivatizace.

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zpracovat rešerši, která se zabývá možnostmi stanovení valproátu pomocí moderních separačních metod.

Valproát patří mezi antikonvulzivní léčiva a je používán nejen při léčbě epilepsie, ale také dalších chorob jako migrény nebo bipolární poruchy. Přesný mechanismus účinku není i přes množství studií na toto téma, znám. Nejčastěji se však hovoří o zvýšení hladiny γ -aminomáselné kyseliny, tím dochází k inhibici přenášeného nervového vzruchu.

Samotné stanovení valproátu může být prováděno plynovou chromatografií. Při ní se nejčastěji využívá plamenově ionizačního detektoru nebo hmotnostního spektrometru. Výhodou MS je možnost porovnání vzniklého spektra s knihovou. Pro extrakci vzorku bylo často využito mikroextrakce ať už pevnou nebo kapalnou fází.

Další možností je využití kapalinové chromatografie, nejčastěji HPLC ve spojení s jednoduchou nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií. Stejně jako u GC je využíváno často mikroextrakce. Její výhodou je nutnost pouze malého množství vzorku a rozpouštědel.

Při mnoha analýzách musel být vzorek derivatizován a to například ethanolem nebo NOEPES v toluenu pro využití fluorescenčního detektoru. Je nutno říci, že jakýkoli krok navíc během analýzy s sebou nese riziko vzniku chyby a tím znehodnocení výsledku. Proto jsou postupy neobsahující derivatizaci vhodnější.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LÖSCHER, Wolfgang, ed. *Valproate* [online]. Basel: Birkhäuser Basel, 1999 [cit. 2018-02-28]. ISBN 978-3-0348-9761-7.
- [2] Valproic acid. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2018-06-07]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v0033000?lang=en&ion=CZ&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-1
- [3] Valproic acid. *PubChem* [online]. [cit. 2018-06-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3121#section=Top>
- [4] Databáze léků. *SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2018-06-07]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Batc_group%5D=N03AG01&data%5Bwith_adv%5D=0
- [5] Epilepsy. *World Health Organization* [online]. 2018 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>
- [6] FISHER, Robert S., Carlos ACEVEDO, Alexis ARZIMANOGLOU, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* [online]. 2014, **55**(4), 475-482 [cit. 2018-06-07]. DOI: 10.1111/epi.12550. ISSN 00139580. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12550>
- [7] LÖSCHER, Wolfgang. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology* [online]. 1999, **58**(1), 31-59 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/S0301-0082(98)00075-6. ISSN 03010082. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000756>
- [8] FISHER, Robert S., J. Helen CROSS, Jacqueline A. FRENCH, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* [online]. 2017, **58**(4), 522-530 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1111/epi.13670. ISSN 00139580. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13670>
- [9] Epilepsy. *Mayo Clinic* [online]. [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/epilepsy/symptoms-causes/syc-20350093>
- [10] TRINKA, E. Ideal characteristics of an antiepileptic drug: how do these impact treatment decisions for individual patients?. *Acta Neurologica Scandinavica* [online]. 2012, **126**,

- 10-18 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1111/ane.12015. ISSN 00016314. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ane.12015>
- [11] NEWTON, Herbert B., Marta MASCHIO a Lesley Michelle PRITIKIN. *Epilepsy and brain tumors*. Boston: Elsevier, Academic Press is an imprint of Elsevier, [2015]. ISBN 978-0-12-417043-8.
- [12] SVOBODA, Mojmír, Eva ČEŠKOVÁ a Hana KUČEROVÁ. *Psychopatologie a psychiatrie: pro psychology a speciální pedagogy*. Vydání třetí. Praha: Portál, 2015. ISBN 978-80-262-0976-8.
- [13] KESSING, Lars Vedel, Gunnar HELLMUND, John R. GEDDES, Guy M. GOODWIN a Per Kragh ANDERSEN. Valproate v. lithium in the treatment of bipolar disorder in clinical practice: observational nationwide register-based cohort study. *British Journal of Psychiatry* [online]. 2011, **199**(01), 57-63 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1192/bjp.bp.110.084822. ISSN 0007-1250. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000255839/type/journal_article
- [14] JOHANNESSEN, C. *Mechanisms of action of valproate: a commentary* [online]. [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1016/S0197-0186(00)00013-9. ISBN 10.1016/S0197-0186(00)00013-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018600000139>
- [15] LAGACE, Diane C., W. TIMOTHY O'BRIEN, Nadia GURVICH, Mark W. NACHTIGAL a Peter S. KLEIN. Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research* [online]. 2004, **4**(3-4), 215-225 [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1016/j.cnr.2004.09.013. ISSN 15662772. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156627720400074X>
- [16] ORNOY, Asher. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus?. *Reproductive Toxicology* [online]. 2009, **28**(1), 1-10 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.02.014. ISBN 10.1016/j.reprotox.2009.02.014. ISSN 08906238. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623809000422>
- [17] *Neurotransmission and Chemistry* [online]. [cit. 2018-06-07]. Dostupné z: <http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/APFallLect18.html>
- [18] DRUGA, Rastislav, Miloš GRIM a Petr DUBOVÝ. *Anatomie centrálního nervového systému*. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-706-6.
- [19] PETROVICKÝ, Pavel. *Klinická neuroanatomie CNS s aplikovanou neurologií a neurochirurgií*. Praha: Triton, 2008. ISBN 978-80-7387-039-3.

- [20] KOMÁREK, Vladimír, Pavla STOPKOVÁ, Josef SUCHOPÁR, Lucia ZAHRADNÍKOVÁ a Ondřej VENDULKA. Acidum valproicum/natrii valproas. *Remedia* [online]. 2006, **16**(1), 14-26 [cit. 2018-06-28]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Psychiatrie/Acidum-valproicum-natrii-valproas/8-1n-ed.magarticle.aspx>
- [21] LÖSCHER, Wolfgang. Basic pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS drugs*. 2002, **16**(10), 669-94.
- [22] VAJDA, Frank J., G.A. DONNAN, J. PHILLIPS a P.F. BLADIN. Human brain, plasma, and cerebrospinal fluid concentration of sodium valproate after 72 hours of therapy. *Neurology*. 1981, **31**(4), 486-487. DOI: 10.1212/WNL.31.4_Part_2.486. ISSN 0028-3878.
- [23] WHITTLE, S. R. a A. J. TURNER. Effects of the anticonvulsant sodium valproate on Q-aminobutyrate and aldehyde metabolism in ox brain. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1978, **31**(6), 1453-1459 [cit. 2018-06-28]. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1978.tb06572.x. ISSN 0022-3042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1978.tb06572.x>
- [24] MAITRE, M., L. OSSOLA a P. MANDEL. In vitro studies into the effect of inhibition of rat brain succinic semialdehyde dehydrogenase on GABA synthesis and degradation. *FEBS Letters* [online]. 1976, **72**(1), 53-57 [cit. 2018-06-28]. DOI: 10.1016/0014-5793(76)80811-3. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2876%2980811-3>
- [25] TERBACH, Nicole a Robin S.B. WILLIAMS. Structure–function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2009, **37**(5), 1126-1132 [cit. 2018-06-07]. DOI: 10.1042/BST0371126. ISSN 0300-5127. Dostupné z: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0371126>
- [26] SMOLKOVÁ, Eva a Ladislav FELTL. *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, 1991. ISBN 80-030-0604-X.
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [28] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- [29] *Plynová chromatografie* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [30] KÖHLEROVÁ, Veronika. *Identifikace proteinových pojiv obsažených v uměleckých dílech pomocí plynové chromatografie*. Praha, 2010. Diplomová práce. Pedagogická fakulta Univerzity Karlovy. Vedoucí práce Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D.

- [31] *Extrakční metody* [online]. Brno, 2011 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/zs-2013-2014/h3cp1/index/h3cp1---extrakcni-metody---studijni-material-zs-13-14.pdf>
- [32] *Chromatografické metody* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAOF.htm>
- [33] *Head space* [online]. Praha, 2014 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-2%20HEADSPACE%20092014.pdf>
- [34] *SPME (Solid phase microextraction)* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie_spme.pdf
- [35] NOVÁKOVÁ, Petra. *Derivatizace v plynové chromatografii*. Olomouc, 2011. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
- [36] GROB, Robert Lee. a Eugene F. BARRY. *Modern practice of gas chromatography*. 4th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2004. ISBN 978-047-1229-834.
- [37] DENG, Chunhui, Ning LI, Jie JI, Bei YANG, Gengli DUAN a Xiangmin ZHANG. Development of water-phase derivatization followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of valproic acid in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2006, **20**(8), 1281-1287 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1002/rcm.2451. ISSN 0951-4198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.2451> [33]
- [38] FAZELI-BAKHTIYARI, Rana, Vahid PANAHI-AZAR, Mohammad Hossein SOROURADDIN a Abolghasem JOUYBAN. Determination of valproic acid in human plasma using dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. 2015, **18**(10), 979-988 [cit. 2018-06-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4686582/>
- [39] SHAHDOUSTI, Parvin, Abdorreza MOHAMMADI a Naader ALIZADEH. Determination of valproic acid in human serum and pharmaceutical preparations by headspace liquid-phase microextraction gas chromatography-flame ionization detection without prior derivatization. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **850**(1-2), 128-133 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.11.013. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023206009470>
- [40] MIZUNO, Shun, Xiao-Pen LEE, Masaya FUJISHIRO, et al. High-throughput determination of valproate in human samples by modified QuEChERS extraction and

- GC-MS/MS. *Legal Medicine* [online]. 2018, **31**, 66-73 [cit. 2018-06-05]. DOI: 10.1016/j.legalmed.2018.01.002. ISSN 13446223. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1344622317304145>
- [41] Difference between Serum and Plasma. *Microbiology info* [online]. 2016 [cit. 2018-06-09]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/difference-between-serum-and-plasma/>
- [42] RHODEN, Liliane, Marina Venzon ANTUNES, Paulina HIDALGO, Cleber Álvares da SILVA a Rafael LINDEN. Simple procedure for determination of valproic acid in dried blood spots by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **96**, 207-212 [cit. 2017-10-30]. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.03.044. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170851400171X>
- [43] PUJADAS, Mitona, Simona PICHINI, Ester CIVIT, Elena SANTAMARIÑA, Katherine PEREZ a Rafael DE LA TORRE. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **44**(2), 594-601 [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.022. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507001379>
- [44] ABBOTT, Frank S., Roland BURTON, James ORR, Diana WLADICHUK, Sheila FERGUSON a Ting-Hui SUN. Valproic acid analysis in saliva and serum using selected ion monitoring (electron ionization) of the tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1982, **227**(2), 433-444 [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)80396-5. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434700803965>
- [45] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [46] Vysokoučinná kapalinová chromatografie. Ministerstvo zdravotnictví [online]. [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJALB.htm>
- [47] Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Informační systém Masarykovy univerzity [online]. [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf?lang=cs
- [48] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.

- [49] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [50] CVAČKA, Josef. *Trendy v moderní HPLC* [online]. 2011 [cit. 2018-06-28]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf>
- [51] *Separace vybraných frakcí kyselých proteinů z hlíz bramboru (solanum tuberosum l.) pomocí chromatografických technik* [online]. České Budějovice, 2013 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: https://theses.cz/id/pr9oo3/Diplomov_prce.pdf. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
- [52] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [53] PROENÇA, Paula, João Miguel FRANCO, Carla MUSTRA, Mariana MARCOS, Ana Rita PEREIRA, Francisco CORTE-REAL a Duarte Nuno VIEIRA. An UPLC–MS/MS method for the determination of valproic acid in blood of a fatal intoxication case. *Journal of Forensic and Legal Medicine* [online]. 2011, **18**(7), 320-324 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1016/j.jflm.2011.06.003. ISSN 1752928X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1752928X11001211>
- [54] WEN, Dingsheng, Ziyi CHEN, Chao YANG, et al. A rapid and simple HPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of valproic acid and its five metabolites in human plasma and application to study pharmacokinetic interaction in Chinese epilepsy patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **149**, 448-456 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.042. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708517319751>
- [55] GAO, Shouhong, Haijun MIAO, Xia TAO, et al. LC–MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, **879**(21), 1939-1944 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.05.022. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023211003278>
- [56] LIN, Ming-Chun, Hwang-Shang KOU, Cheng-Chung CHEN, Shou-Mei WU a Hsin-Lung WU. Simple and sensitive fluorimetric liquid chromatography method for the determination of valproic acid in plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **810**(1), 169-172 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.07.025. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023204006002>