

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

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Metody úpravy biologických vzorků před HPLC  
analýzou**

**PETRA ŠLOSÁRKOVÁ**

(bakalářská práce)

**HRADEC KRÁLOVÉ 2007**

Děkuji Doc. RNDr. Jiřímu Klimešovi, CSc. a MUDr. Josefu Klímovi, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracovávání bakalářské práce.

Dále děkuji RNDr. Janu Mackovi, CSc. a RNDr. Pavlu Ptáčkovi, CSc. za odborné rady a cenné připomínky, které mi poskytovali během mého zaměstnání, v průběhu studia a přípravy bakalářské práce. Rovněž děkuji společnosti Pharmakl spol. s r.o. v Praze, která mi umožnila realizovat bakalářské studium a poskytla mi data pro zpracování experimentální části práce.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	5
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	6
2.1 Literární část .....	6
2.2 Experimentální část .....	6
3. LITERÁRNÍ ČÁST .....	7
3.1 Biologický materiál .....	7
3.1.1 Plasma .....	7
3.1.2 Moč .....	8
3.2 Metody úpravy biologických vzorků před HPLC analýzou .....	8
3.2.1 Uvolnění látek vázaných do konjugátů .....	8
3.2.1.1 Hydrolýza .....	9
3.2.1.2 Enzymatické štěpení .....	9
3.2.2 Odstranění endogenních a balastních látek .....	9
3.2.2.1 Přímý nástřik .....	9
3.2.2.3 Deproteinace .....	10
3.2.2.4. Filtrace .....	12
3.2.2.5 Liquid-liquid extrakce (LLE) .....	12
3.2.2.6 Solid-phase extrakce (SPE) .....	14
3.2.2.7 Superkritická fluidní extrakce (SFE) .....	17
3.2.3 Zvýšení selektivity a citlivosti metody .....	18
3.2.3.1 Předkolonová derivatizace (pre-column derivatization) .....	18
3.2.3.2 Postkolonová derivatizace (post-column derivatization) .....	18
3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	19
3.3.1 Instrumentace .....	20
3.3.2 Detektory .....	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1 Charakteristika venlafaxinu a jeho metabolitu .....	23
4.2 Experimentální podmínky .....	24
4.2.1 Chemikálie .....	24

4.2.2 Standardní látky .....	24
4.2.3 Přístrojové vybavení .....	24
4.2.4 Použité chromatografické kolony .....	25
4.2.5 Laboratorní pomůcky .....	25
4.3 Vývoj metody .....	25
4.3.1 Úprava vzorku před HPLC analýzou .....	25
4.3.2 Validační podmínky .....	26
4.4 Validace metody .....	28
4.4.1 Specifita a linearita .....	28
4.4.2 Limit kvantifikace .....	30
4.4.3 Přesnost a správnost .....	31
4.4.4 Stabilita .....	33
4.5 Výsledky a diskuze .....	35
5. ZÁVĚR .....	37
6. ZKRATKY .....	39
7. LITERATURA .....	40

# 1. ÚVOD

Biologický materiál může obsahovat kromě endogenních komponent komplex různých exogenních látek a jejich metabolitů. Kvalitativní a kvantitativní analýza některých těchto látek je předmětem zájmu řady výzkumných i klinických laboratoří. Jedním z cílů výzkumu v oblasti farmakologie je sledování hladin účinné látky v organismu po podání léčivého přípravku. Farmakokinetické údaje a informace získané během těchto studií mohou sloužit k racionalizaci diagnostiky a terapie, ale také k registraci, která je nezbytná pro uvedení nového léčivého přípravku na trh.

Stanovení endogenních i exogenních látek v biologickém materiálu je kromě vlastní instrumentální analýzy různou měrou závislé na technice jeho odběru, zpracování a úpravě. Úprava vzorku biologického materiálu často rozhoduje o možnostech analýzy i limitech měření.

Pro volbu a vývoj vhodné metody úpravy biologického materiálu jsou rozhodující základní informace o požadavcích na výsledek analýzy, druhu biologické matrice, fyzikálně-chemických vlastnostech stanovované látky, typu analytické metody i volbě detekce. Mezi hlavní důvody pro úpravu biologického vzorku obecně patří:

- uvolnění látek vázaných do konjugátů
- odstranění endogenních a balastních látek z biomatrice
- zvýšení selektivity a citlivosti metody.

Exogenní látky a jejich metabolity jsou často (na rozdíl od látek endogenních) obsaženy v biologickém materiálu jen ve velmi nízkých koncentracích. Nízké hodnoty těchto koncentrací a přítomnost velkého množství balastních látek ve vzorku mohou analýzu dané látky rušit, popřípadě zcela znemožnit.

V případě úpravy biologického materiálu pro HPLC analýzu může vhodné odstranění nežádoucích látek výrazně ovlivnit separační vlastnosti chromatografické kolony i její životnost, zabránit interferencím, zvýšit rozlišení a reprodukovatelnost metody. Úprava biologického materiálu před HPLC analýzou tvoří důležitou součást vlastního stanovení. Na jejím výběru a kvalitě provedení závisí správnost i přesnost celého měření.

## **2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

### ***2.1 Literární část***

Cílem literární části bakalářské práce je rešeršní zpracování recentních literárních údajů o problematice úpravy biologického materiálu před HPLC analýzou.

Literární údaje jsou doplněny o informace a zkušenosti, které jsem získala při práci laborantky ve společnosti Pharmakl spol. s r.o., kde mou hlavní pracovní náplní byla úprava biologického materiálu s obsahem léčiv před vlastní instrumentální analýzou.

### ***2.2 Experimentální část***

Experimentální část bakalářské práce prezentuje výsledky získané při vývoji a validaci HPLC metody stanovení venlafaxinu a jeho aktivního metabolitu O-demethylvenlafaxinu vyvinuté v laboratoři společnosti Pharmakl spol. s r.o., na které jsme se spolupodílela jako laborantka při přípravě vzorků. Uvedené výsledky mi bylo umožněno prezentovat díky laskavosti vedení společnosti Pharmakl spol. s r.o. a mých spolupracovníků.

Cílem experimentální části je přiblížit problematiku úpravy biologického materiálu v rámci celého vývoje analytické metody, která pro potřeby studia farmakokinetiky musí splňovat potřebná validační kritéria.

## 3. LITERÁRNÍ ČÁST

### 3.1 *Biologický materiál*

Volba biologického materiálu závisí na požadavcích analytického hodnocení, vhodnosti i dostupnosti materiálu. Obecně platí, že technika zpracování biologického materiálu je tím snazší, čím více je materiál tekutý a složkově jednoduchý. Na tomto obecném poznatku je možné biologický materiál seřadit z hlediska náročnosti úpravy vzorku před vlastní analýzou v následujícím pořadí: mozkomíšní mok, synoviální tekutina, slzy, pot, sliny, moč, žluč, plasma, sérum, mléko, sperma, krev, stolice, vlasy, tkáň.<sup>[3]</sup> V případě histologického a toxikologického vyšetření jsou nejčastěji používány moč, krev, vlasy a zvratky.

V klinické praxi mohou být uplatňovány neinvazivní a invazivní postupy odběru biologického materiálu. Neinvazivní odběr (moč, sliny, pot) znamená pro pacienta minimální zátěž, ale získané koncentrační údaje o sledovaném léku mají pouze limitující možnosti klinicko-farmakologické interpretace. Invazivní postup, tedy žilní odběr krve, představuje hlavní metodický postup široce využívaný pro terapeutické monitorování a studium farmakokinetiky. Dle požadavků analytické metody stanovujeme léčivo v plné krvi (např.: cyklosporin A<sup>[19]</sup>), v plasmě za přítomnosti antikoagulačního činidla nebo v séru. Farmakokinetické studie nebo terapeutické monitorování určitých léků je vhodné doplnit o stanovení koncentrací v moči.

#### 3.1.1 Plasma

Plasma obsahuje vodu (92%), bílkoviny (7%) a ostatní anorganické i organické látky (1%). Je významným biologickým materiálem vhodným a dostupným pro řadu běžných i specializovaných vyšetření. Ve farmakologii lze měřit nejen celkový obsah podaného léčiva popřípadě jeho metabolitů v organismu, ale také rozlišit množství volné a vázané frakce.<sup>[3]</sup>

Plasmu připravujeme z plné krve centrifugací po přidání antikoagulačních látek. Pro potřeby farmakokinetických studií je nativní krev odebírána do sériově vyráběných originálních polypropylénových zkumavek obsahujících příslušnou antikoagulační látku a drobné plastové granule. Tímto je zajištěno důkladné promísení celého objemu vzorku krve již během odběru a je tak zabráněno nežádoucímu srážení fibrinogenu na fibrin. V klinické biochemii a hematologii se jako antikoagulační látka využívá nejčastěji K<sub>2</sub>EDTA, K<sub>3</sub>EDTA a citrát sodný. Lithiové a natriové soli heparinu jsou používány při stanovení léčiv v krvi. Využití

jiných antikoagulačních přísad je nutné ověřit pro případ interference v požadované analýze.

### **3.1.2 Moč**

Moč obsahuje konjugáty endogenních i exogenních látek. V rámci klinické farmakologie je moč využívána v situacích, kdy není možné danou látku stanovit v krvi a dále v analýzách pro detekci a kvantifikaci metabolitů. Látky, které nejsou vázány ve formě konjugátů nebo konjugáty látek podrobené hydrolýze, mají zpravidla méně polární charakter a jsou snadno extrahovatelné různými organickými rozpouštědly.

Hlavními problémy při použití moči jako biologického materiálu mohou být její objem a pH. Obě tyto hodnoty jsou velmi variabilní v závislosti na množství, způsobu a druhu přijímaných nápojů i potravy. S ohledem na měnící se objem moči a pH je nutný kvantitativní přepočít, který může být poměrně náročný.

Pro terapeutické sledování hladiny léku není obvykle moč biologickým materiálem první volby. Zdaleka největší využití nachází při základním toxikologickém screeningu. Jednoduché komerčně vyráběné testy založené na principu tenkovrstevné chromatografie s imunochemickou detekcí se v lékařských ordinacích běžně využívají ke kontrole pH, identifikaci endogenních, drogových i omamných látek.

## **3.2 Metody úpravy biologických vzorků před HPLC analýzou**

Úprava vzorků před vlastní HPLC analýzou významně ovlivňuje výsledek měření. Stanovovaná látka musí být uvolněna z matrice biologického materiálu, v některých případech je vhodné odstranění balastních látek nebo zvýšení selektivity a citlivosti metody. Jednotlivé techniky jsou založeny na fyzikálně - chemických vlastnostech analytu, chování exogenních i endogenních látek a rozdílných typech biomatrice. Uvedené metody tvoří základ v úpravě biologického materiálu, mohou být vzájemně kombinovány, optimalizovány a doplňovány o další speciální techniky.

### **3.2.1 Uvolnění látek vázaných do konjugátů**

Uvolnění stanovované látky je nezbytné v případech, kdy je analyt ve vzorku vázán do konjugátů s endogenními látkami jako jsou například glukuronidy, sulfáty a podobně. Dekonjugací reakce umožňují získat analyt v původní formě, brání nežádoucím procesům enzymatické degradace i vzniku artefaktů. Tato metoda je často využívána v toxikologické analýze při stanovení exogenních látek přítomných v moči.



### 3.2.1.1 Hydrolýza

Mezi nespecifické dekonjugační reakce patří hydrolýza. Látka podrobena hydrolýze musí být stabilní za poměrně extrémních podmínek reakce (pH, tlak, teplota). Vzorek je upraven vhodným přídatkem kyseliny nebo zásady, umístěn do příslušného zařízení (autokláv, inkubátor, extraktor) a vystaven reakčním podmínkám. Čas potřebný k hydrolytické dekonjugaci je obvykle nižší než u enzymatického štěpení a výsledek reakce není citlivý na menší změny reakčních podmínek.

### 3.2.1.2 Enzymatické štěpení

Specifické štěpení konjugátů umožňuje použití enzymů jako jsou  $\beta$ -glukuronidáza (EC 3.2.1.31.) nebo arylsulfatáza (EC 3.1.6.1). Nevýhodou spojenou s využitím těchto dekonjugačních reakcí je zejména možnost inhibice enzymu látkami obsaženými ve vzorku. Pro zajištění reprodukovatelnosti enzymatické metody je nutné proces dekonjugační reakce standardizovat.

## **3.2.2 Odstranění endogenních a balastních látek**

Tyto metody patří v praxi k běžným a zdaleka nejčastějším úpravám biologických vzorků. Vlastní proces je založen na fyzikálně-chemických reakcích zaměřených na odstranění nežádoucích látek z biomatrice, případně zakoncentrování stanovované látky. Aplikace metod vyžaduje vzorek v kapalné fázi, tuto podmínku splňuje většina rutinně používaných biologických materiálů. Výběr konkrétní metody přípravy vzorku vhodné pro následnou chromatografickou analýzu závisí na struktuře, polaritě, rozpustnosti, ionizaci analytu a na požadovaném koncentračním rozmezí metody.

### 3.2.2.1 Přímý nástřik

V některých případech lze biologický vzorek zředit a bez dalších úprav použít pro přímý nástřik na chromatografickou kolonu. Tohoto způsobu můžeme využít v případech, kdy koncentrace stanovované látky v analyzované biologické matrici je relativně vysoká a vzorek neobsahuje látky nekompatibilní s HPLC systémem (tuky, bílkoviny, apod.). Při předpokladu výše uvedených podmínek může být metoda velmi jednoduchou a efektivní úpravou vzorku před HPLC analýzou.

Vzorek ředíme přídatkem vhodného rozpouštědla, obvykle vody nebo pufru, následuje protřepání a centrifugace s cílem odstranit pevné částice ze vzorku. Ředění analytu snižuje odezvu balastní látek v detektoru, viskozitu vzorku nebo působení iontových sil, zajišťuje kompatibilitu s mobilní fází nebo

ruší slabší vazby mezi analytem a proteiny obsaženými v biomatrici. Zředění se obvykle provádí v poměru 1:5 nebo 1:10 vzorku a pufru (vodě).

Tato metoda úpravy biologického materiálu byla publikována například pro stanovení nitrofurantoinu v moči před analýzou HPLC.<sup>[35]</sup>

Přímým nástřikem je možné na chromatografickou kolonu aplikovat pouze malé objemy vzorků a při opakovaném nástřiku dochází rychle k její degradaci. Nevýhody lze částečně odstranit aplikací on-line úpravy vzorku metodou označovanou jako „Column switching HPLC“. Využití této metody bylo publikováno například pro stanovení citalopramu a escitalopramu spolu s jejich hlavními metabolity v lidském séru.<sup>[11]</sup> Hlavním problémem širšího využití v praxi je přístrojová náročnost, rychlejší degradace předkolony i chromatografické kolony.

### 3.2.2.3 Deproteinace

Jednoduchým způsobem odstranění rušivých endogenních látek ze vzorku je precipitace a denaturace bílkovin. Tuto úpravu obvykle vyžaduje kvantitativní stanovení léčiv v plasmě. Deproteinace brání nežádoucímu srážení bílkovin na chromatografické koloně, ke kterému dochází při styku biologického materiálu s mobilní fází obsahující organická rozpouštědla nebo koncentrovanější pufr. Úpravu je možné provést ultracentrifugací na membránách, působením enzymů nebo srážením deproteinačními činidly.

Enzymová deproteinace je realizována prostřednictvím proteolytických enzymů. Její účinky jsou méně agresivní a v některých případech poskytuje vyšší výtěžnost a selektivitu reakce. Provedení metody je časově náročnější, vyžaduje přesné dodržení inkubační doby i teploty. Spolu s ultracentrifugací patří v praxi k málo využívaným metodám, určité uplatnění nacházejí ve specializovaných oblastech molekulární biologie,<sup>[44]</sup> potravinářství<sup>[9]</sup> nebo průmyslu.<sup>[17]</sup>

Nejčastěji jsou bílkoviny odstraňovány z biologického vzorku deproteinačními činidly, používají se organická rozpouštědla mísitelná s vodou, silné kyseliny a soli těžkých kovů. Organická rozpouštědla mísitelná s vodou jako aceton, methanol, ethanol a acetonitril snižují rozpustnost bílkovin, tím dochází jejich vysrážení ve vzorku. Aceton absorbuje záření při poměrně vysoké vlnové délce (330 nm), proto je nutné v případě spektrofotometrické detekce pomýšlet také na možnost interference s analytem.

K deproteinaci silnými kyselinami jsou běžně používány trichloroctová, chloristá a wolframová kyselina, méně často také molybdenová, sulfobenzoová, fosfowolframová, metafosforečná a pikrová kyselina. Tyto kyseliny tvoří s kationty bílkovin nerozpustné soli, nejvyšší výtěžnost poskytuje reakce při použití 5-20% roztoku kyseliny. Rozpustnost a extrahovatelnost analytu může zvýšit použití

organického rozpouštědla v kombinaci se silnou kyselinou (např.: methanol a dimethylsulfoxid).

Bílkoviny mohou být sráženy také měďnatou nebo zinečnatou soli v alkalickém roztoku. Před nástřikem na kolonu je obvykle nutné upravit pH supernatantu, aby bylo kompatibilní s HPLC systémem. Metoda není vhodná k úpravě látek, které mají s těžkými kovy tendenci k tvorbě komplexních sloučenin.

Volba deproteinačního činidla závisí mimo jiné na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovované látky, požadovaném koncentračním rozsahu stanovení a pH supernatantu, které by se nemělo výrazně lišit od hodnoty pH mobilní fáze.<sup>[30]</sup>

precipitační činidlo	pH supernatant	objem činidla (ml) při vysrážení >95% bílkovin v 0.5 ml plasmy	komentář
<i>kyseliny</i>			
trichlooctová kyselina (10%, m/V)	1.4 - 2.0	0,2	při nízké teplotě
chloristá kyselina (6%, m/V)	< 1.5	0,4	při nízké teplotě
wolframová kyselina	2.2 - 3.9	0,6	čerstvý roztok
metafosforečná kyselina (5%, m/V)	1.6 - 2.7	0,4	
<i>anorganické soli</i>			
hydroxid zinečnatý	6.5 - 7.5	1,5	
síran amonný (nasycený)	7.0 - 7.7	2,0	
<i>organická rozpouštědla</i>			
acetonitril	8.5 - 9.5	1,0	
aceton	9.0 - 10.0	1,0	$\lambda = 330 \text{ nm}$
ethanol	9.0 - 10.0	1,5	
methanol	8.5 - 9.5	1,5	

**Tabulka č. 1:** Přehled běžně používaných deproteinačních činidel.<sup>[30]</sup>

Deproteinace umožňuje rychlou, jednoduchou a levnou přípravu velkého množství vzorků. Vzorek je vysrážen přidávkem činidla a po krátkém protřepání (přibližně 30 sekund) odstředěn. Čirý supernatant se přenáší přímo do autosamplerové lahvičky, v případě, kdy není nutné upravovat pH, je vzorek připraven k přímému nástřiku na chromatografickou kolonu. Během srážení dochází k uvolnění léčiva vázaného na proteiny a výsledkem stanovení je tedy vždy informace o celkové koncentraci léčiva v daném biologickém materiálu.<sup>[3]</sup>

Metoda deproteinace pro úpravu biologického materiálu byla vyvinuta a prakticky aplikována ve farmakokinetické studii realizované společností Pharmakl spol s.r.o. při stanovení carvedilolu v lidské plasmě.<sup>[41]</sup>

### 3.2.2.4. Filtrace

Na rozdíl od deproteinace, kdy se po precipitaci bílkovin uvolňuje léčivo vázané na bílkoviny a supernatant tvoří složka volného i vázaného léčiva, filtrát může obsahovat pouze složku volnou a to v závislosti na volbě velikosti pórů použité filtrační či semipermeabilní membrány. Jednotlivé pracovní techniky se metodicky liší a umožňují dělit částice v určitém rozsahu. Reverzní osmóza zachycuje částice o velikosti 0,3 až 1 nm. Pomocí ultracentrifugace lze na membránách dělit částice od 1 až 10 nm, jedná se především o viry, proteiny a peptidy. Při mikrofiltraci lze zachytit molekuly od 10 nm výše, jsou to například různé bakterie.<sup>[3]</sup>

### 3.2.2.5 Liquid-liquid extrakce (LLE)

Klasické provedení liquid-liquid extrakce umožňuje připravit pro instrumentální analýzu jak stopové tak větší koncentrace analyzované látky. Příprava vzorku je přístrojově nenáročná a variabilní, proto má stále své uplatnění mezi moderními technikami přípravy vzorku.

Základním principem metody je extrakce látky mezi dvě nemísitelné kapaliny v rozdělovacím poměru podle Nernstova zákona<sup>[37]</sup>:

$$P = \frac{C_{org.}}{C_{aq.}}$$

P.....rozdělovací koeficient

C<sub>org.</sub>.....rovnovážná koncentrace látky v organické fázi

C<sub>aq.</sub>.....rovnovážná koncentrace látky ve vodné fázi

Pro účinnou extrakci volíme rozpouštědlo, ve kterém je extrahovaná látka rozpustná více než v rozpouštědle, ze kterého extrahujeme. Účinnost extrakce (f) lze vypočítat podle vztahů<sup>[37]</sup>:

$$f(org.) = \frac{P \cdot V}{P \cdot V + 1}$$

$$f(aq.) = \frac{1}{P \cdot V + 1}$$

P.....rozdělovací koeficient

V.....poměr V<sub>org.</sub>/V<sub>aq.</sub>

Návratnost u hydrofilních látek můžeme zvýšit blokadou hydrofilních skupin před extrakcí (derivatizací iontovými páry) nebo vyvázáním molekul vodné fáze (vysolováním). Solvatační obaly kolem molekul látky jsou odebrány ionty anorganických solí s vysokým stupněm disociace, tím je posílena ochota organických molekul analytu přecházet do organické fáze.

Je-li rozdělovací koeficient nižší než 1, musí být provedena víceúrovňová extrakce. Účinnost n-krát opakované extrakce definuje vztah: <sup>[18, 37]</sup>

$$f(\text{total}) = 1 - f(r)^n$$

f(r)..... frakce látky ve vodné fázi po 1. extrakci

Při extrakci z plasmy přechází stanovovaná látka do organického rozpouštědla, směs je odstředěna a organická fáze spolu s analytem přenesena do čisté zkumavky. V případě, že očištění od balastních látek je dostačující nebo je nutné zakoncentrování vzorku, organická fáze se odpaří pod proudem dusíku ve speciálním vyhřívaném bloku. Po odpaření je vzorek rozpuštěn ve vhodném objemu rozpouštědla, obvykle pufru, mobilní fázi nebo slabé kyselině. Takto upravený vzorek je přenesen do autosamplerové lahvičky a připraven k HPLC analýze. Aplikovat lze také zpětnou extrakci do vodného rozpouštědla. Tato úprava výrazně zvyšuje čistotu vzorku.

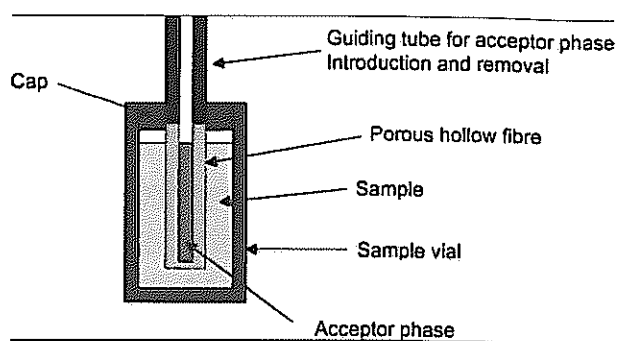
Použití klasické LLE pro stanovení různých lékových skupin bylo popsáno v řadě publikací. V rámci farmakokinetických studií realizovaných společností Pharmakl spol. s r.o. byly vyvinuty a prakticky prověřeny metody pro stanovení mirtazapinu,<sup>[40]</sup> tamsulosinu<sup>[24]</sup> nebo pseudoephedrinu.<sup>[26]</sup>

Nevýhodou klasického provedení extrakčních metod oproti moderním mikroextrakcím je pracovní riziko spojené s vyšší spotřebou biologického materiálu a organických rozpouštědel. Trendem poslední doby se stala minimalizace spotřeby biologického vzorku i organických rozpouštědel a omezení přímého styku s nimi.

### **Liquid Phase Micro Extraction (LPME)**

Jednoduchou, rychlou a bezpečnou úpravu vzorků před HPLC analýzou umožňují techniky LPME. V roce 1996 byla představena první z nich tzv. Single Drop Liquid Phase Micro Extraction (SD-LPME). Tato metoda je založena na extrakci analytu v kapce rozpouštědla vytlačené z jehly stříkačky se zkoseným hrotem. Jehla s kapkou o objemu 1-3  $\mu\text{l}$  může být umístěna do prostoru nad vzorkem (vhodné pro těkavé látky) nebo ponořena přímo do roztoku vzorku.<sup>[28]</sup> Po ukončení extrakce je kapka natažena zpět do jehly a následně upravena ředěním nebo použita k přímému nástřiku na kolonu. Ve spojení s HPLC byla technika SD-LPME využita například při stanovení hypericinu, pseudohypericinu a hyperforinu v lidské plasmě a moči.<sup>[10]</sup>

Na obdobném principu extrakce pracuje také technika Hollow Fibres Liquid Phase Micro Extraction (HF-LPME). Extrakční činidlo vyplňuje prostor uvnitř dutého porézního vlákna nebo vyplňuje pouze póry membrány (Supported Liquid Membrane Extraction, SLME) <sup>[13]</sup> ponořené do roztoku vzorku. Metoda HF-LME s následnou chirální separací byla aplikována při stanovení mirtazapinu v lidské plasmě. <sup>[46]</sup>



**Obr. 1:** Schéma LPME <sup>[46]</sup>

Popsán také dynamický režim LPME, při kterém je rozpouštědlo periodicky pumpováno ven a dovnitř stříkačky. V porovnání se statickou LPME poskytuje dynamická LPME vyšší výtěžnost i lepší reprodukovatelnost. <sup>[52]</sup>

### 3.2.2.6 Solid-phase extrakce (SPE)

Metoda SPE je založena na principu sloupcové chromatografie. Porézní sorbent může mít různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Nejčastěji používanými jsou silikagel, grafit a některé kopolymery modifikované fázemi jako nepolární C-18 (oktadecyl), C-8 (oktyl), polární CN (kyanopropyl) a NH<sub>2</sub> (aminopropyl). Extrakční kolonky vyrábí komerčně i na zakázku řada firem a kromě klasických sorbentů nabízí také výrobu Molecular Imprinting Polymers (MIP) pro dělení chirálních látek. <sup>[34]</sup> SPE poskytuje účinné nakoncentrování, očištění a izolaci stanovované látky ze vzorku, úprava je však náročnější na počet operací. V praxi je metoda využívána při extrakci složitějších látek z biologické matrice, kde deproteinace i LLE selhává. Použití metody bylo publikováno například při stanovení katecholaminů <sup>[45]</sup> a fenylefrinu <sup>[12]</sup> v lidské plasmě. Popsána a prakticky aplikována byla úprava metodou SPE také v rámci bioekvivalenční farmakokinetické studie realizované společností Pharmaki spol. s r.o. při stanovení alendronátu v lidské moči. <sup>[39]</sup>

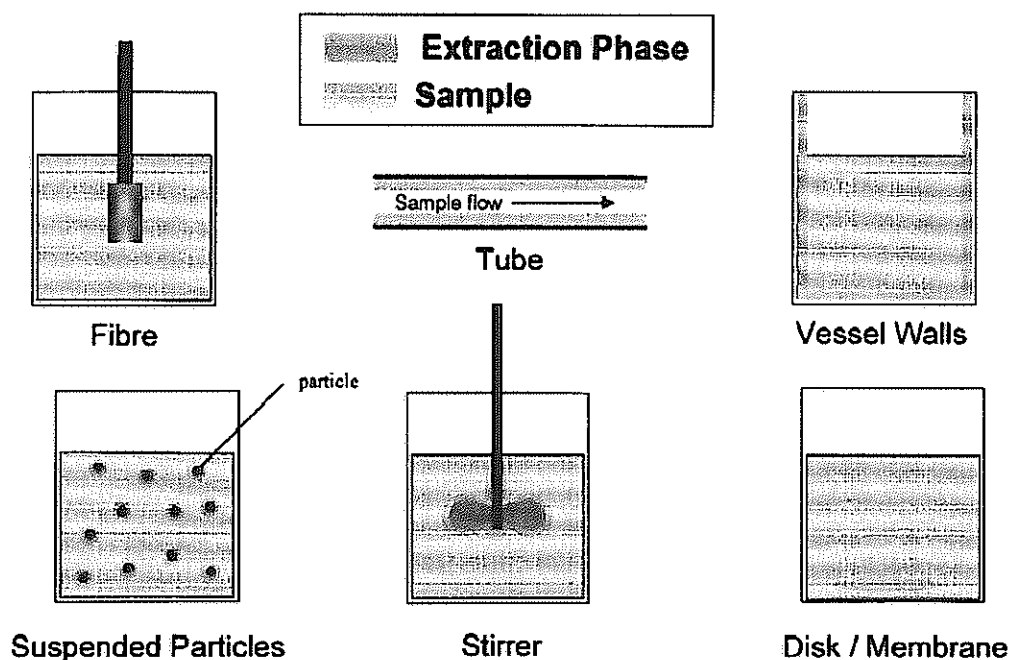
Na počátku roku 1990 vytvořili pracovníci v Pfizer's Sandwich UK Laboratories formát 96-ti SPE extrakčních kolonek (96-well solid-phase extraction), který umožnil on-line spojení s HPLC. <sup>[50]</sup> Automatizace jednotlivých operací a možnost přímého spojení významně snížily dobu analýzy a posunuly SPE na přední místo v oblasti moderních metod úpravy vzorku pro HPLC.

## Solid Phase Micro Extraction (SPME)

SPME je definována jako extrakční technika, kde objem vzorku výrazně převyšuje objem extrakční fáze. Separace se řídí fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu, matrice vzorku a pevné fáze. Protože proces dělení nezávisí na koncentraci stanovované látky ve vzorku, dosahují hodnoty výtěžnosti až 100%. Doba extrakce odpovídá požadavku na ustavení rovnováhy mezi fázemi. Její zvyšování nad hodnotu potřebnou k ustavení rovnováhy výtěžnost extrakce již dále neovlivňuje.

V roce 1990 představili SPME poprvé Arthur a Pawliszyn. O několik let později ve spojení s klasickou instrumentální chromatografií (GC, GC-MS, LC, LC-MS, CE) našla mikroextrakce široké uplatnění při analýze a stanovení léků v biologickém materiálu.<sup>[21]</sup>

První extrakce proběhly na pevné fázi vyrobené z 1 cm dlouhé silikagelové tyčinky potažené polymerem. Postupem času vznikaly další varianty pevných fází.



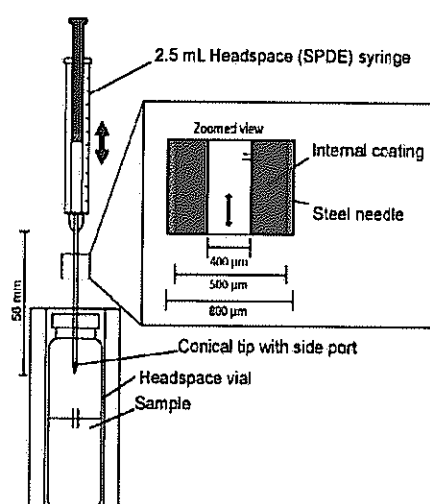
Obr. 2: Varianty pevných fází v SPME <sup>[23]</sup>

Techniky, kdy je stacionární fáze vkládána do roztoku vzorku jsou označovány jako techniky "přímého ponoření" (DI-SPME). Pevná fáze se dostává do přímého kontaktu s matricí analytu. Ve spojení SPME s GC lze namísto DI-SPME použít techniku označovanou jako "headspace" (HS-SPME). V tomto případě je pevná fáze umístěna do prostoru nad vzorkem. Použití je vhodné

pro plynné i více těkavé kapalné a pevné vzorky. Sorbent nepřichází do přímého styku s matricí analytu a jeho životnost je vyšší.

Metoda Solid Phase Dynamic Micro Extraction (SPDME) využívá sorbent vázaný uvnitř nosiče (např. jehly nebo kapiláry) a podobně jako u dynamického režimu LPME je rozpouštědlo během extrakce periodicky pumpováno dovnitř a ven.

Plocha pevné fáze SPDME je 5x větší než u SPME, což vede ke snížení doby potřebné k extrakci analytu. Dostupná je řada pevných polárních i nepolárních fází, které mohou být aplikovány v různých tloušťkách. Výsledky srovnávání ukázaly 3 až 4x větší citlivost měření.<sup>[28]</sup>



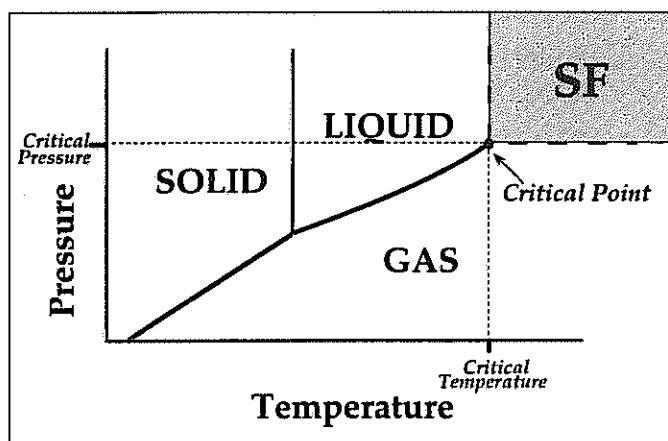
**Obr. 3:** schéma SPDME <sup>[15]</sup>

Metoda SPME je často mylně označována jako SPE nebo micro-SPE. Tyto techniky se však významně liší. SPE zahrnuje třífázový proces. V prvním kroku prochází analyt pevnou fází a fixuje se na ni. Ve druhém jsou promýváním odstraněny nežádoucí látky a nakonec je z pevné fáze vhodným rozpouštědlem uvolněna stanovovaná látka. Výsledný eluent může být zakoncentrován odpařením nebo použit pro přímý nástřik na chromatografickou kolonu. Metoda SPME zahrnuje pouze dva kroky. Stacionární fáze se dostává do kontaktu se vzorkem, analyty obsažené ve vzorku jsou na základě různé afinity selektivně extrahovány. Pevná fáze spolu se všemi látkami navázanými na sorbentu je přenesena do systému HPLC, kde jsou navázané látky desorpcí uvolněny. Metoda micro-SPE se od SPE liší pouze použitím menšího objemu sorbentu. U SPE a micro-SPE se ve srovnání s SPME využívá větší množství pevné fáze, to způsobuje zadržení látek, které nejsou na sorbent pevně navázané. Tento efekt často zvyšuje množství nežádoucích látek ve vzorku a snižuje citlivost metody.



### 3.2.2.7 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce separuje látky mezi dvě nemísitelné fáze na základě rozdílného rozdělovacího koeficientu. Extrakčním činidlem je látka uvedená pomocí nadkritických hodnot teploty a tlaku do zvláštního skupenského stavu. Tento stav označovaný jako "superkritický" spojuje jedinečné fyzikální i chemické vlastnosti plynu a kapaliny. V praxi se jako extrakční činidlo běžně používá oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), jeho nadkritické hodnoty (teplota =  $31^\circ\text{C}$ , tlak = 7,60 MPa) jsou snadno dostupné za laboratorních podmínek a výhodou jsou i jeho další vlastnosti. Oxid uhličitý je nehořlavý, netoxický, kompatibilní s řadou detektorů a snadno čistitelný. Menší nevýhodou může být nepolární charakter, který je nutné při extrakci polárních látek upravit použitím vhodných modifikátorů (acetonitril, voda, apod.).



Obr. 4: Fázový diagram <sup>[32]</sup>

SFE byla původně využívána při izolaci kofeinu z kávových zrn nebo extrakci stopových množství rozpouštědel a monomerů z polymerů. O několik let později našla široké uplatnění v kontrole potravin, životního prostředí, dopingových látek a pesticidů.<sup>[6]</sup> Extrakce za použití superkritického činidla poskytla nové možnosti při řešení problémů s úpravou tuhých biologických vzorků. V toxikologické a forensní analýze umožnila rychlé a levné stanovování drog a omamných látek ze vzorku vlasů.<sup>[1, 8]</sup> Zpracování kapalného biologického vzorku bylo popsáno při stanovení nitrofurantoinu v lidské moči.<sup>[2]</sup> Reakční podmínky SFE se pohybují v rozmezí teploty  $25\text{-}200^\circ\text{C}$  a tlaku  $7\text{-}60$  MPa. Použití extrakce je proto vhodné pouze pro látky, které jsou za těchto podmínek stabilní. Výhodou techniky je především vysoká účinnost extrakce, velmi malá spotřeba extrakčního činidla a šetrnost k životnímu prostředí.<sup>[37]</sup>

### 3.2.3 Zvýšení selektivity a citlivosti metody

Derivatizační reakce i výběr vhodného selektivního principu detekce se řadí mezi operační postupy zaměřené na zvýšení selektivity a citlivosti metody. Derivatizační reakce jsou uplatňovány v případech, kdy je nutné zajistit detekovatelnost látky v ultrafialové nebo fluorescenční oblasti, zamezit nežádoucí sorpci látky na chromatografické koloně a zvýšit účinnost extrakce nebo stabilitu stanovovaného analytu. Podle způsobu provedení rozlišujeme derivatizace na předkolonovou a postkolonovou derivatizaci.

#### 3.2.3.1 Předkolonová derivatizace (pre-column derivatization)

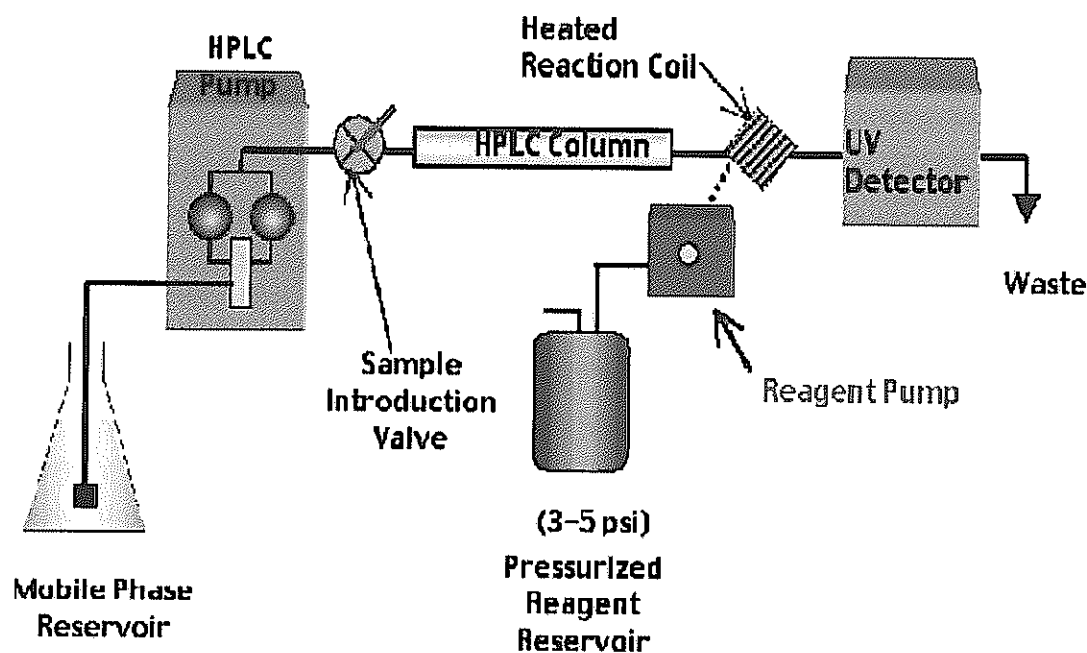
Úprava vzorku se provádí před nástřikem na chromatografickou kolonu. V praxi je tento typ derivatizace používán zhruba v 95% případů. Běžné tzv. "off-line" provedení umožňuje variabilní nastavení i možnost využití extrémních reakčních podmínek. Úprava vzorku není časově omezena, nutná je stabilita derivátu, výtěžnost a selektivnost reakce. Derivatizační činidlo musí být mísitelné s mobilní fází, popřípadě snadno odstranitelné.

Předkolonová derivatizace v režimu "on-line" vyžaduje mnohem menší objemy vzorků a umožňuje rychlou a přesnou analýzu. Na druhou stranu její použití není univerzální a největší překážkou je samozřejmě přístrojová náročnost.

#### 3.2.3.2 Postkolonová derivatizace (post-column derivatization)

Derivatizační reakce probíhá za chromatografickou kolonou po separaci analytu před vstupem do detektoru. Jímání frakcí se používá zřídka. Hlavní výhody umožňuje automatizace, která zachovává separační účinnost použité analytické metody.

On-line postkolonová derivatizace je založena na principu průtokové injekční analýzy (FIA). Systém HPLC je obvykle doplněn o zásobník derivatizačního činidla, pumpu a reakční celu. Reakce probíhá kontinuálně při přestupu látky z chromatografické kolony do detektoru. Derivatizační činidlo musí být kompatibilní s detektorem, jeho nadbytek může způsobit rozmývání píků spojené se snížením účinnosti separace a detekce.



Obr. 5: Základní schéma on-line postkolonové derivatizace.

Postkolonová úprava vzorku narozdíl od předkolonové derivatizace nevyžaduje vysokou selektivitu ani výtěžnost, rozhodující je reprodukovatelnost a rychlost reakce. On-line zapojení klade vyšší nároky na instrumentaci a spotřebu činidel. Určitou optimalizaci metody nabízí použití sekvenční injekční analýzy (SIA).<sup>[47]</sup>

### 3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

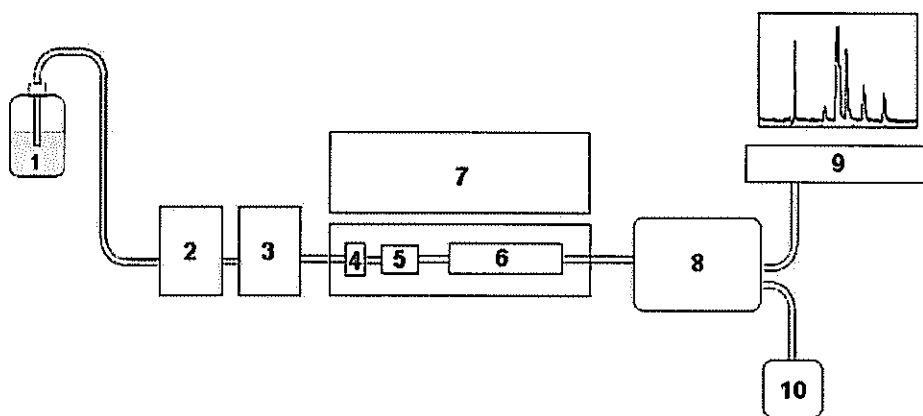
Princip chromatografie objevil v roce 1903 ruský chemik a botanik M.S. Cvet při studiu pigmentů chloroplastů. V uspořádání kapalina-adsorbent jako první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva a nazval tuto metodu chromatografickou. Počátkem čtyřicátých let, po objevení rozdělovací chromatografie, se kolonová chromatografie začala rozvíjet ve své klasické podobě. V roce 1952 byla autorům Martinovi a Syngeovi udělena Nobelova cena za práci v oboru kapalinové chromatografie (Liquid Chromatography, HPLC).

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělení složek směsi mezi stacionární a pohyblivou fází. Podle procesu, který za separaci odpovídá byly metody rozříděny na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní chromatografii.<sup>[7, 31]</sup>

### 3.3.1 Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá z několika samostatných jednotek zajišťujících uchování a transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci a zařízení pro detekci látek. Obecné blokové schéma chromatografu je znázorněno na obrázku č. 6.

Zařazení jednotlivých komponent systému HPLC je variabilní. Mobilní fáze je vedena ze zásobní lahve (1) přes degasér (2) do směšovače s vysokotlakým čerpadlem (3). V případě gradientové eluce se zde mísí kapaliny ze dvou až čtyř zásobních lahví. Na výstupu je mobilní fáze pod vysokým tlakem vháněna do chromatografické kolony (6) uložené ve vyhřívaném bloku s volitelným nastavením teploty. Pro zvýšení ochrany a životnosti chromatografické kolony bývá zařazen filtr (4) nebo předkolona (5). Vzorky připravené k analýze jsou uloženy v autosampleru (7), který pomocí dávkovacího zařízení zajišťuje nástřik na kolonu. Za detektorem (8) je umístěn sběrač frakcí nebo odpadní nádoba (10). Signál detektoru zaznamenává počítač (9) vybavený softwarem pro zpracování chromatografických dat.



**Obr. 6:** Blokové schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

1) Zásobníky mobilní fáze - tvoří 1 až 4 skleněné uzavíratelné láhve. Při čerpání prochází mobilní fáze jemným filtrem, který slouží k zachycení pevných částic a nečistot.

2) Degasér - zajišťuje odplynění mobilní fáze a brání průniku vzduchové bubliny do systému. Odplynění lze realizovat také jemným probubláváním inertního plynu (např. helium, dusík) přímo v zásobní lahvi. V omezené míře je možné použít při přípravě mobilní fáze také ultrazvuk, účinnost však není vysoká. Plyny rozpuštěné v mobilní fázi mají negativní vliv na funkci vysokotlakého čerpadla. Dochází k uvolňování bublin v sacích ventilech, zavzdušnění hlavy pumpy, průtok mobilní fáze se stává pulzní, nereprodukovatelný a dochází ke kolísání tlaku na koloně.

3) Vysokotlaké čerpadlo (pumpa), tlumič tlakových pulsů a směšovač - zajišťují konstantní průtok a mísení mobilní fáze bez nežádoucích tlakových pulsů. Výstupní tlak na čerpadle se pohybuje od 1 do 60 MPa a umožňuje regulovat průtok mobilní fáze v rozsahu 0,1 až 10 ml za minutu. Součástí pumpy je zpravidla samostatná programovací jednotka, kterou lze jednoduše a rychle využít při ručním nastavení požadovaných parametrů. Tvorbu gradientu zajišťuje směšovač. Při nízkotlakém gradientu se jednotlivé složky mobilní fáze mísí za atmosférického tlaku před vysokotlakým čerpadlem. V případě vysokotlakého gradientu má každá složka mobilní fáze své vlastní vysokotlaké čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou.

4,5) Filtr, předkolona - chrání chromatografickou kolonu před znečištěním pevnými cizorodými částicemi (útržky sept, nečistoty mobilní fáze) a vysokomolekulárními balastními látkami z biologické matrice (například bílkoviny). Předkolona má délku 0,3 – 2 cm a bývá naplněna stejným sorbentem jako chromatografická kolona.

6) Chromatografická (separační) kolona – je nejčastěji vyrobena z nerezové oceli, vnitřní průměru 3 - 5 mm a délce 5 - 25 cm. Náplň kolony tvoří různé druhy sorbentů o velikosti částic 1,8 -10  $\mu\text{m}$ . Během měření je kolona temperována na požadovanou teplotu, která by neměla kolísat o více než 0,1  $^{\circ}\text{C}$ . Komerční nabídka kolon se v současné době poměrně široká. Uživatel si volí rozměry kolony, druh sorbentu i velikost částic. Pro účely HPLC jsou nejčastěji využívány nepolymerizované sorbenty (nejčastěji  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nebo  $\text{ZrO}_2$ ), jejichž povrch je modifikován reverzní (nepolární), normální (polární) nebo iontovou fází. Náplně kolon obsahující reverzní fázi tvoří částice oxidu křemičitého, na které jsou chemicky navázány alifatické uhlovodíkové řetězce o velikosti 8 nebo 18 uhlíkových atomů (C8, C18). V praxi často používané středně polární stacionární fáze obsahují sorbenty s ukotvenými tříuhlíkatými řetězci skupinami -  $\text{NH}_2$ , -CN.

7) Autosampler, dávkovací zařízení – pro potřeby HPLC i řadu dalších moderních chromatografických metod byly vyvinuty speciální injekční jehly, dávkovací ventily, smyčky i zásobníky vzorků (pevné, otočné, apod.). Systém umožňuje také volbu techniky nástřiku.

### 3.3.2 Detektory

Jednou z nejdůležitějších součástí kapalinového chromatogramu je detektor. Typy používaných detektorů lze rozdělit do dvou skupin a to na selektivní, jejichž signál je úměrný koncentraci detekované látky a univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti efluentu, tj. mobilní fázi a detekované látky. Selektivní detekce je obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýze složek přítomných v komplikovaných maticích.

Na detektory jsou kladeny určité ideální požadavky:

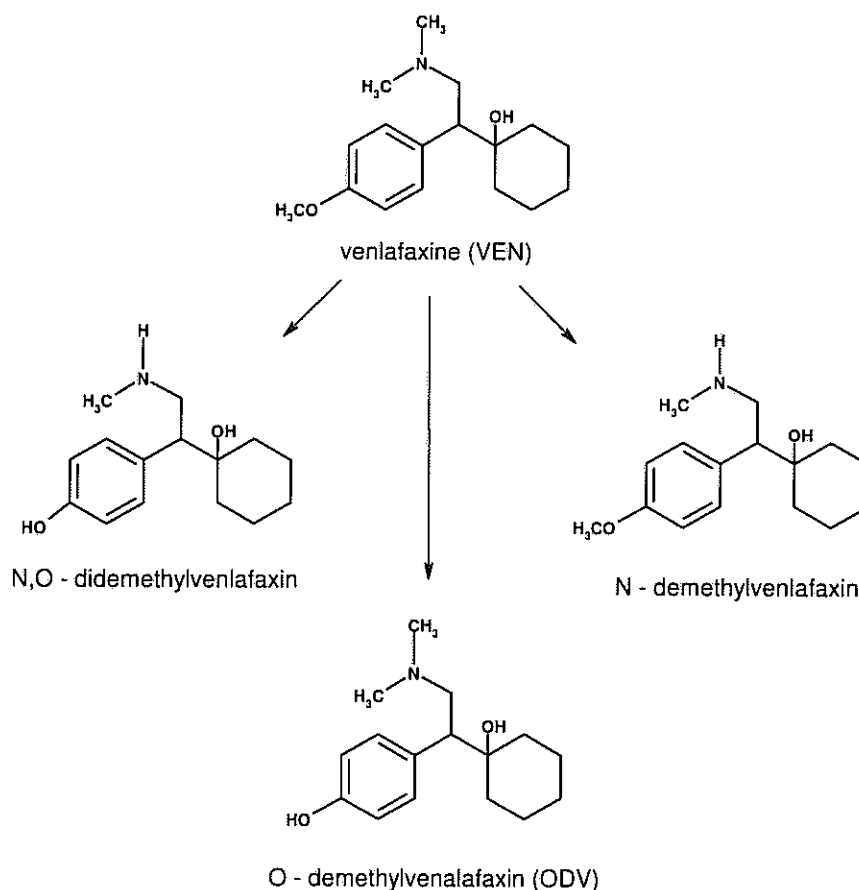
- možnost detekce všech přítomných komponent
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozsahu
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teplotě
- malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- možnost gradientové eluce

V praxi takový detektor samozřejmě neexistuje, ale různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně blíží. Mezi běžně používané detektory v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, hmotnostní a refraktometrické detektory.<sup>[7, 48]</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Charakteristika venlafaxinu a jeho metabolitů

Venlafaxin je tvořen směsí dvou stereoizomerů (levotočivé a pravotočivé formy), jejich farmakodynamické účinky jsou prakticky stejné. V lékových formách je látka obsažena ve formě hydrochloridu venlafaxinu (VEN), (1-[2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]cyclohexanol hydrochloride).



**Obr. 7:** Struktura venlafaxinu (VEN) a jeho metabolitů.

VEN patří do čtvrté generace antidepresiv označovaných jako NSRI (noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors) neboli inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Protože tato skupina léků narozdíl od svých předchůdců současně ovlivňuje jak vychytávání serotoninu tak noradrenalinu, k nástupu účinku dochází rychleji a odpovídá na něj také značná část pacientů, u nichž léčba nebyla dříve dostatečně účinná. VEN se neváže na muskarinové, adrenergní ani histaminergní receptory a nemá proto nežádoucí

účinky některých jiných thymoleptik. VEN je indikován k terapii depresí spojených s úzkostnými stavy, sociálními fóbiemi, obsedantními a panickými poruchami.

VEN je metabolizován převážně v játrech cytochromem P-450. Přibližně 56% VEN přechází demethylací na O-demethylvenlafaxin (ODV); 1% na N-demethylvenlafaxin a 16% na N,O-demethylvenlafaxin. Metabolit ODV má přibližně stejný farmakodynamický účinek jako VEN, proto je vhodné v průběhu farmakokinetické studie měřit hladiny obou látek současně.<sup>[42]</sup>

## **4.2 Experimentální podmínky <sup>[27]</sup>**

### **4.2.1 Chemikálie**

Methanol (čistota min 99,8%, kvalita „pro LC“), acetonitril (pro LC, Riedel de Haen) toluen (Merck, p.a.), hexan (Merck, p.a.), isoamylalkohol (Fluka, puriss. p.a.), butylacetát (Fluka, puriss. p.a.), tert-butylnmethyletherhydroxid (Fluka, puriss. p.a.), hydroxid sodný (Fluka, p.a.), dihydrogenfosforečnan draselný (Fluka, p.a.), kyselina fosforečná (Fluka, p.a.), chloroform (Lachema, p.a.), triethylamin (Fluka, puriss. p.a) a deionizovaná voda.

### **4.2.2 Standardní látky**

Venlafaxin hydrochlorid (čistota nad 99%), O-demethylvenlafaxin fumarát (čistota nad 93 %, příměs venlafaxinu méně než 0.05%), metoprolol (přípravek Vasocardin 50, Slovakoфарма, Hlohovec, Slovenská Republika), celiprolol (přípravek Tenoloc, Léčiva, Praha, ČR), verapamil (přípravek Isoptin® injekce, Knoll AG, Německo), zolpidem (přípravek Hypnogen, Léčiva, Praha, ČR), citalopram (Seropram, H. Lundbeck A/S, Copenhagen-Vally, Dánsko), naftidrofuryl (Enelbin 100 retard, Léčiva, Praha, ČR), propranolol (Léčiva, ČR), timolol maleát (Léčiva, ČR).

### **4.2.3 Přístrojové vybavení**

Autosampler AS 3000 (Thermo Separation Products), pumpa CM 4100 (Thermo Separation Products), fluorescenční detektor FL 2000 (Thermo Separation Products), analytické váhy ER-182A (Electronic Balance), centrifuga MPW-340 (Polsko), třepačka Shaker R5 (ÚOCHB).



#### 4.2.4 Použité chromatografické kolony

předkolona

Purospher STAR RP-18e, 55 x 4 mm, 3  $\mu$ m

Supelcosil LC-CN, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m

Supelcosil LC-CN, 50 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m

Supelcosil LC 1, 50 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m

Biopher PSI 120 Phenyl, 50 x 4 mm, 7  $\mu$ m

#### 4.2.5 Laboratorní pomůcky

Mikrostříkačka 10  $\mu$ l (výrobce Hamilton), dávkovač Varispenser plus (výrobce Eppendorf), automatické pipety (výrobce Finnpiquette, Labsystem, Eppendorf), skleněné pipety, laboratorní sklo, nesterilní polyethylenové zkumavky 10 ml (výrobce Gamedium).

### 4.3 Vývoj metody <sup>[27]</sup>

Metodu jsme vyvíjeli pro potřeby farmakokinetické studie s očekávaným rozsahem koncentrací pro ODV 8-400 ng/ml a VEN 4-200 ng/ml. Stanovení ODV a VEN v lidské plasmě HPLC analýzou bylo publikováno pro použití fluorometrického,<sup>[51]</sup> UV,<sup>[29, 43]</sup> coulometrického,<sup>[5]</sup> hmotnostního<sup>[4, 16, 22, 53]</sup> a diode array<sup>[36, 49]</sup> detektoru. S ohledem na koncentrační rozsah a dostupnost jsme volili použití fluorescenčního detektoru.

#### 4.3.1 Úprava vzorku před HPLC analýzou

První testovanou metodou byla denaturace bílkovin. Plasmu jsme sráželi přidavkem 0,25 ml kyseliny chloristé (1:10). Ve vzorku slepé plasmy byla detekována řada rušivých píků. Pro odstranění nežádoucích interferencí jsme zvýšili hodnotu emisní vlnové délky z 308 nm na 600 nm. Úprava neměla požadovaný efekt a denaturace bílkovin se proto pro zpracování vzorku ukázala jako nevhodná.

Dále jsme ověřovali možnost použití metody zpětné liquid-liquid extrakce. K 1 ml plasmy jsme přidali 50  $\mu$ l NaOH 0,1 mol/l a směs krátce protřepali. Vzorek jsme extrahovali přidavkem 4 ml extrakčního činidla po dobu 2 min a centrifugovali 3 min při 2000 rpm. Horní organickou fází jsme přenesli do čisté zkumavky, protřepávali po dobu 2 min s přidavkem 200  $\mu$ l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o koncentraci 0,01 mol/l a opět 3 min centrifugovali. Spodní vodná fází vzorku byla přenesena

do autosamplerové lahvičky. Pro optimalizaci volby extrakčního činidla jsme provedli orientační srovnání výtěžnosti několika extrakčních činidel (Tab. 2).

<i>extrakční činidlo</i>	<i>výtěžnost ODV (%)</i>	<i>výtěžnost VEN (%)</i>
<i>hexan-2% isoamyl</i>	50	100
<i>hexan-5% isoamyl</i>	50	100
<i>butylacetát</i>	100	50
<i>toluen-5% isoamyl</i>	100	100
<i>chloroform</i>	90	80
<i>tert-butylmethylether</i>	-	-

**Tab. 2:** Srovnání výtěžnost extrakčních činidel.

Použití extrakčního činidla tert-butylmethyletheru deformovalo píky VEN.

Vzhledem k výsledkům měření a výtěžnosti jednotlivých extrakčních činidel jsme rozhodli pro použití toluen-5% isoamylu. Následoval vývoj chromatografických podmínek a volba vhodného vnitřního standardu. Po optimalizaci chromatografických podmínek jsme testovali možnost snížení spotřeby biologického materiálu. Výsledky byly uspokojivé, proto jsme přistoupili k validaci metody.

#### 4.3.2 Validační podmínky

Metoda stanovení venlafaxinu a jeho metabolitu O-desmethylvenlafaxinu v lidské plasmě byla vyvinuta a optimalizována pro potřeby farmakokinetické studie v daném koncentračním rozsahu za následujících podmínek.

**Validované zařízení pro HPLC:** pumpa, automatický dávkovač vzorků a fluorimetrický detektor.

**Kolona:** Lichrocart 55-4 Purospher Star RP-18e 3 µm, (Merck), předkolona C18 4x3 mm.

**Složení mobilní fáze:** 20% acetonitrilu a 80% 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH konečné mobilní fáze 7,2.

**Průtok mobilní fáze:** 2 ml/min, teplota kolony: 35 °C.

**Detekce:** excitační a emisní vlnová délka 230 a 308 nm.

**Časová konstanta detektoru:** 2 s.

**Objem nástřiku vzorku:** 20  $\mu$ l.

**Příprava vzorku:** 0,5 ml zkoumané plasmy, přidá se 10  $\mu$ l vnitřního standardu (koncentrace přesně asi 25 ng metoprolol tartrát / $\mu$ l) a krátce se protřepe. Dále se přidá 0,25 ml 0,1 M NaOH a znovu se protřepe. Dávkočepem se přidají 3 ml směsi 95% toluen 5% isoamylalkohol a třepe se 2 minuty při 2000 rpm. Směs se odstředí při 3000 rpm po dobu 2 minut, horní organická fáze se přenese do čisté zkumavky, přidá se 200  $\mu$ l 0,05 M  $H_3PO_4$  a směs se třepe se 2 minuty při 2000 rpm. Vzorky se centrifugují 3 minuty při 3000 rpm a 150  $\mu$ l spodní vodné fáze se přenese do autosamplerové plastové lahvičky.

## 4.4 Validace metody

### 4.4.1 Specifita a linearita

Specifitu metody jsme prověřili analýzou slepé plasmy, která byla použita pro přípravu standardních roztoků. Pro testování linearity metody jsme připravili šest standardních roztoků plasmy o různé koncentraci VEN a ODV.

Tab.4: Linearita a specifita pro venlafaxin.

koeficienty kalibrační křivky - VEN			
	b	c	r
série 1	1.076	0.0001	0.9999
série 2	1.033	0.0007	1.0000
série 3	1.077	-0.0001	1.0000
série 4	1.054	0.0011	0.9999
série 5	1.082	0.0011	0.9998
série 6	1.074	0.0006	1.0000
průměr	1.066	0.0006	0.9999
směrodatná odchylka (SD)	0.019	0.0005	
přesnost (RSD)	1.8%		

kalibrační řada - VEN						
vzorek	K1	K2	K3	K4	K5	K6
<i>nominální hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>						
	2.190	5.161	13.1	31.5	80.8	219.0
dolní limit	1.752	4.387	11.1	26.8	68.7	186.2
horní limit	2.628	5.935	15.0	36.2	92.9	251.9
<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>						
série 1	2.164	5.324	13.02	31.28	79.10	221.8
série 2	2.262	4.699	13.31	32.45	80.54	221.7
série 3	2.187	5.097	13.71	30.99	80.97	214.7
série 4	2.279	4.804	12.02	31.45	86.09	229.0
série 5	2.262	4.785	12.65	32.49	84.70	217.5
série 6	2.198	5.113	13.02	31.86	81.29	217.4
průměr	2.225	4.970	12.96	31.75	82.11	220.3
správnost (bias)	1.6%	-3.7%	-0.9%	0.7%	1.6%	0.6%
přesnost (RSD)	2.2%	4.9%	4.4%	2.0%	3.3%	2.3%

Tab.5: Linearita a specifita pro O-demethylvenlafaxin.

koeficienty kalibrační křivky - ODV				
	b	c	r	
série 1	1.395	0.0001	1.0000	
série 2	1.351	0.0009	1.0000	
série 3	1.347	0.0008	0.9998	
série 4	1.388	0.0004	0.9999	
série 5	1.347	0.0009	0.9998	
série 6	1.350	0.0019	0.9999	
průměr	1.363	0.0009	0.9999	
směrodatná odchylka (SD)	0.022	0.0006		
přesnost (RSD)	1.6%			

kalibrační řada - ODV						
vzorek	K1	K2	K3	K4	K5	K6
<i>nominální hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>						
	2.996	7.575	17.93	45.11	138.8	402.0
dolní limit	2.397	6.439	15.24	38.34	118.0	341.7
horní limit	3.595	8.712	20.62	51.88	159.6	462.3
<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>						
série 1	2.990	7.566	17.94	47.07	135.4	395.4
série 2	3.029	7.189	18.95	45.02	138.4	397.3
série 3	2.964	7.659	18.68	44.79	139.8	385.0
série 4	3.001	7.417	18.71	44.58	140.2	392.8
série 5	3.023	7.411	17.95	44.03	145.2	397.7
série 6	2.999	7.473	18.48	44.43	141.4	393.3
průměr	3.001	7.453	18.45	44.99	140.1	393.6
správnost (bias)	0.2%	-1.6%	2.9%	-0.3%	0.9%	-2.1%
přesnost (RSD)	0.8%	2.1%	2.3%	2.4%	2.3%	1.2%

#### 4.4.2 Limit kvantifikace

Limit kvantifikace byl definován jako nejmenší koncentrace ODV nebo VEN, kterou lze měřit. Hodnoty naměřené pod limitem kvantifikace byly označeny za nulové. Limit kvantifikace pro ODV byl 2,996 ng/ml; pro VEN 2,190 ng/ml.

Tab.6: Limit kvantifikace pro venlafaxin.

limit kvantifikace - VEN		
koncentrace [ng/ml]		
<i>nominální hodnota</i>	2.190	
vzorek		správnost
LOQ1	2.343	7.0%
LOQ2	2.020	-7.8%
LOQ3	2.590	18.3%
LOQ4	2.129	-2.8%
LOQ5	2.147	-2.0%
LOQ6	2.392	9.2%
průměr	2.270	3.7%
přesnost (RSD)	9.2%	

Tab.7: Limit kvantifikace pro O-demethylvenlafaxin.

limit kvantifikace		
koncentrace [ng/ml]		
<i>nominální hodnota</i>	2.996	
vzorek		správnost
LOQ1	3.329	11.1%
LOQ2	2.588	-13.6%
LOQ3	3.388	13.1%
LOQ4	3.159	5.4%
LOQ5	3.257	8.7%
LOQ6	3.496	16.7%
průměr	3.203	6.9%
přesnost (RSD)	10.1%	

#### 4.4.3 Přesnost a správnost

Hodnocení přesnosti a správnosti metody jsme provedli uvnitř série a mezi sériemi (série 1, 2, 3, 4, 5 a 6) pro vzorky QC o třech různých koncentracích pro VEN i ODV.

Správnost jsme vyjádřili jako bias (%) =  $[(C_{\text{průměr}} - C_{\text{nominální}})/C_{\text{nominální}}] * 100$   
 a přesnost jako RSD (%) = (směrodatná odchylka/ $C_{\text{průměr}}$ ) \* 100

Tab.8: Přesnost a správnost uvnitř série pro venlafaxin.

vzorek	nominální hodnota koncentrace [ng/ml]	naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]						průměr	správnost (bias)	přesnost (RSD)
QC1	4.192	4.077	4.059	4.021	4.6926	4.3549	4.100	4.217	0.6%	6.2%
QC2	23.49	24.04	23.47	23.53	23.24	23.36	23.24	23.48	-0.1%	1.3%
QC3	188.8	186.14	187.0	188.8	190.3	189.9	189.0	188.5	-0.2%	0.9%

Tab.9: Přesnost a správnost uvnitř série pro O-demethylenlafaxin.

vzorek	nominální hodnota koncentrace [ng/ml]	naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]						průměr	správnost (bias)	přesnost (RSD)
QC1	5.878	5.732	6.094	6.021	6.1171	5.6508	6.262	5.979	1.7%	4.0%
QC2	37.96	38.09	38.59	38.67	37.76	37.33	36.47	37.82	-0.4%	2.2%
QC3	332.3	320.08	319.4	322.6	320.9	317.3	325.0	320.9	-3.5%	0.8%

Tab.10: Přesnost a správnost mezi sériemi pro venlafaxin.

vzorek	QC1			QC2			QC3		
	<i>nominální hodnota koncentrace [ng/ml]</i>								
	4.192			23.49			188.8		
dolní limit	3.354			18.8			151.1		
horní limit	5.029			28.19			226.6		
	<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>								
			průměr			průměr			průměr
série 1	4.077	4.059	4.068	24.04	23.47	23.75	186.1	187.0	186.6
série 2	4.332	4.487	4.409	23.97	23.32	23.65	190.4	188.6	189.5
série 3	4.231	3.838	4.034	23.45	22.41	22.93	183.4	188.0	185.7
série 4	3.709	3.712	3.711	23.88	23.50	23.69	198.6	195.0	196.8
série 5	3.688	4.001	3.844	24.14	23.13	23.63	191.1	192.2	191.6
série 6	3.675	4.130	3.903	23.64	23.94	23.79	184.0	185.0	184.5
průměr			3.995			23.57			189.1
správnost (bias)			-4.7%			0.3%			0.2%
přesnost (RSD)			6.0%			1.4%			2.4%

Tab.11: Přesnost a správnost mezi sériemi pro O-demethylvenlafaxin.

vzorek	QC1			QC2			QC3		
	<i>nominální hodnota koncentrace [ng/ml]</i>								
	5.878			37.96			332.3		
dolní limit	4.703			30.38			265.9		
horní limit	7.053			45.55			398.7		
	<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>								
			průměr			průměr			průměr
série 1	5.732	6.094	5.913	38.09	38.59	38.34	320.1	319.4	319.7
série 2	6.152	5.852	6.002	37.83	37.97	37.90	318.8	313.9	316.4
série 3	5.863	5.508	5.685	36.74	38.94	37.84	324.5	326.0	325.2
série 4	5.639	6.214	5.927	37.87	37.33	37.60	328.8	314.8	321.8
série 5	5.420	5.448	5.434	38.25	37.19	37.72	328.0	330.2	329.1
série 6	5.657	5.635	5.646	38.78	38.40	38.59	318.9	327.5	323.2
průměr			5.768			38.00			322.6
správnost (bias)			-1.9%			0.1%			-2.9%
přesnost (RSD)			3.8%			1.0%			1.4%



#### 4.4.4 Stabilita

Stabilitu ODV a VEN v plasmě jsme testovali na vliv opakovaného rozmrazení a krátkodobě, kdy jsme vzorky plasmy před extrakcí uchovávali 24 hod ve tmě při laboratorní teplotě. Stabilitu u připravených vzorků umístěných v autosampleru jsme ověřovali při laboratorní teplotě po dobu 6 dní.

Tab.12: Stabilita pro venlafaxin.

vliv opakovaného rozmrazení plasmy - VEN				
vzorek		cyklus 1	cyklus 2	cyklus 3
FTL	<i>nominální hodnota koncentrace [ng/ml]</i>	<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>		
	7.87	7.564	7.476	7.648
		8.141	7.464	7.469
		7.817	7.607	7.361
průměr		7.840	7.52	7.49
správnost (bias)		-0.4%	-4.5%	-4.8%
FTH		<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>		
	188.80	185.7	200.7	204.3
		184.3	191.6	199.4
		183.3	191.7	202.5
průměr		184.5	194.7	202.0
správnost (bias)		-2.3%	3.1%	7.0%

#### krátkodobá stabilita v plasmě - VEN

vzorek	doba skladování	teplota	počet	c [ng/ml]	správnost	přesnost
4.192	24 hodin	+20 °C	3	3.940	6.0%	6.3%
188.8	24 hodin	+20 °C	3	190.5	0.9%	1.2%

#### stabilita připravených vzorků v autosampleru - VEN

vzorek	doba skladování	počet	c [ng/ml]	přesnost	rozdíl
4.192	čerstvé	6	4.217	6.2%	
	6 dní	6	4.756	6.9%	13.5%
11.80	čerstvé	6	1029		
	6 dní	6	999.6		-2.9%
188.8	čerstvé	6	188.5	0.9%	
	6 dní	6	194.3	1.4%	2.9%

Tab.13: Stabilita pro O-demethylvenlafaxin.

vliv opakovaného rozmrazení plasmy - ODV				
vzorek		cyklus 1	cyklus 2	cyklus 3
FTL	<i>nominální hodnota koncentrace [ng/ml]</i>	<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>		
	11.41	11.50	10.827	11.443
		11.60	10.716	11.200
		11.45	11.448	11.437
průměr		11.52	11.00	11.36
správnost (bias)		0.9%	-3.6%	-0.4%
FTH		<i>naměřené hodnoty koncentrace [ng/ml]</i>		
	332.30	313.7	332.0	325.2
		315.3	325.0	315.9
		320.0	322.9	320.7
průměr		316.3	326.6	320.6
správnost (bias)		-4.8%	-1.7%	-3.5%

krátkodobá stabilita v plasmě - ODV

vzorek	doba skladování	teplota	počet	c [ng/ml]	správnost	přesnost
5.878	24 hodin	+20 °C	3	5.786	1.6%	5.2%
332.3	24 hodin	+20°C	3	325.8	2.0%	1.4%

stabilita připravených vzorků v autosampleru - ODV

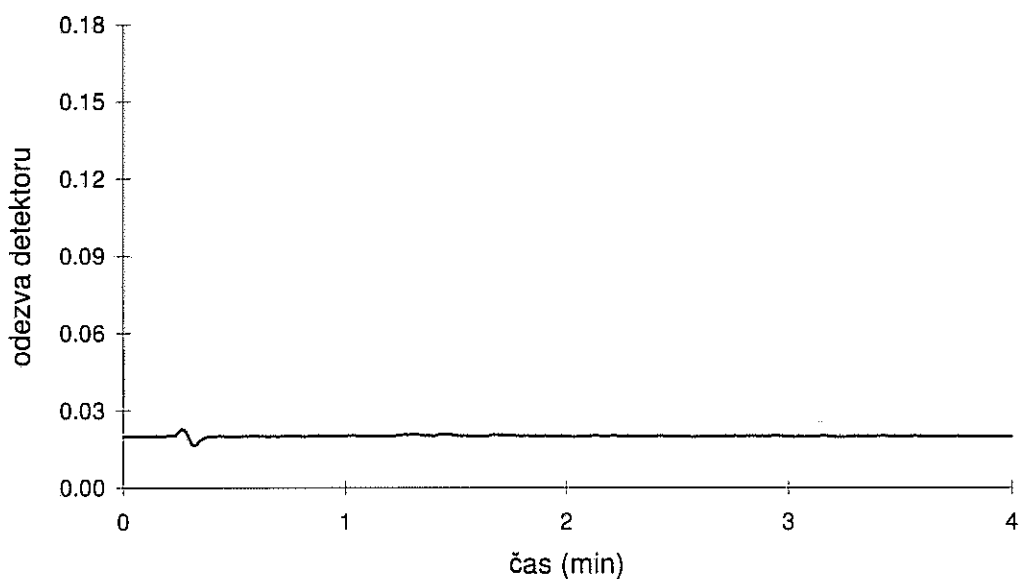
vzorek	doba skladování	počet	c [ng/ml]	přesnost	rozdíl
5.878	čerstvé	6	5.979	4.0%	
	6 dní	6	5.751	5.4%	-2.2%
11.80	čerstvé	6	1029		
	6 dní	6	999.6		-2.9%
332.3	čerstvé	6	320.9	0.8%	
	6 dní	6	334.9	1.4%	0.8%

## 4.5 Výsledky a diskuze

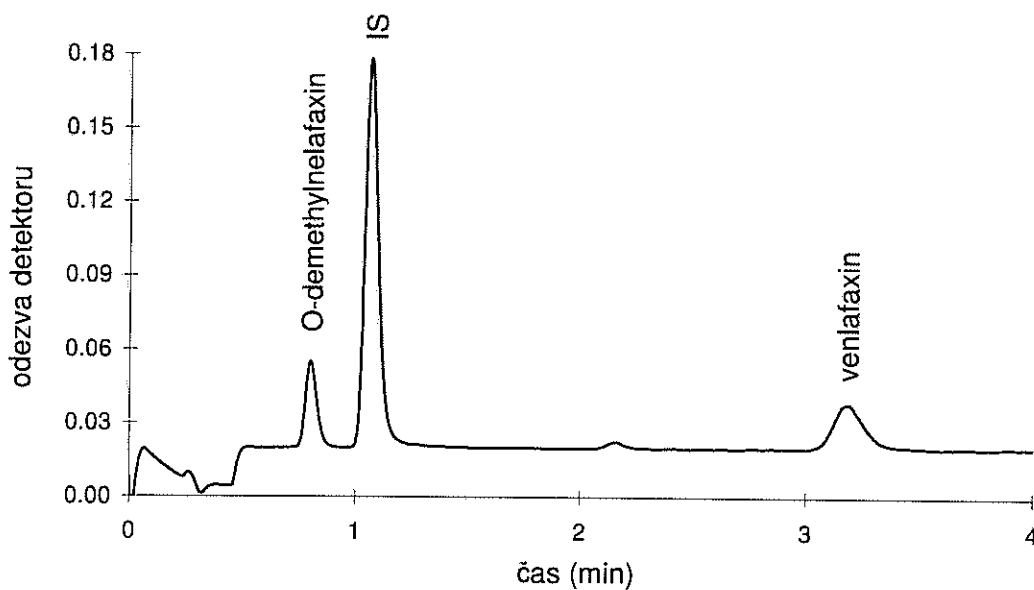
Během vývoje metody pro stanovení VEN a ODV v lidské plasmě jsme otestovali vhodnost použití dvou metod úpravy vzorku před vlastní HPLC analýzou. Jednalo se o deproteinaci a zpětnou liquid-liquid extrakci. Analýzy ukázaly nemožnost využití jednoduché a rychlé metody deproteinace, proto jsme dále vyvíjeli a optimalizovali podmínky pro aplikaci zpětné liquid-liquid extrakce. Postupně jsme prověřili návratnost a možnosti extrakce šesti různými rozpouštědly (viz. Tab. 2). Konečné podmínky úpravy vzorků před HPLC analýzou jsme v závěru vývoje metody validovali (viz. kap. 4.3.2 Validací podmínky).

Metoda byla úspěšně validována v rozsahu 2,190 - 219,0 ng/ml pro VEN a 2,996 - 402,0 pro ODV. Přesnost a správnost nepřesáhly v žádném z hodnocených validačních parametrů hodnotu 15%. Rychlé a přesné stanovení ODV a VEN v lidské plasmě bylo později prakticky ověřeno v rámci farmakokinetické bioekvivalenční studie.

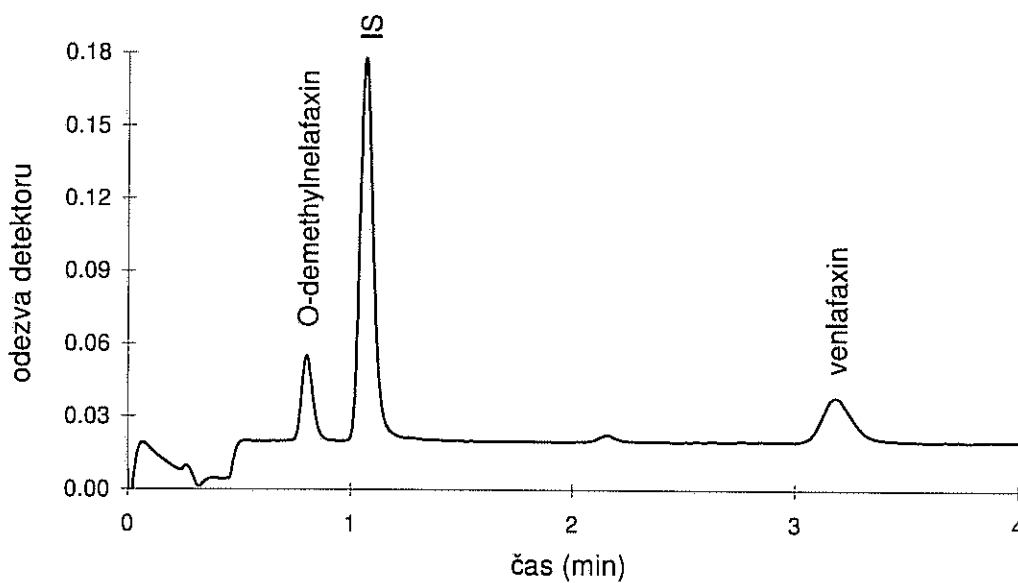
Chromatografické záznamy ukazují průběh analýzy u slepé plasmy, plasmy spikované VEN a ODV a plasmy zdravého dobrovolníka zařazeného v bioekvivalenční studii.



**Obr. 11:** Chromatografický záznam - slepá plasma



**Obr. 12:** Chromatografický záznam - spiked plasma ODV = 128,44 ng/ml;  
VEN = 223,62 ng/ml



**Obr. 13:** Chromatografický záznam - plasma zdravého dobrovolníka po podání léku, koncentrace v plasmě ODV = 108,89 ng/ml; VEN = 42,052 ng/ml

## 5. ZÁVĚR

Literární část bakalářské práce zpracovává přehlednou formou recentní informace o problematice úpravy biologického materiálu před vlastní instrumentální analýzou (HPLC), popisuje systémy používané pro přípravu vzorků, charakteristiku a jednotlivé komponenty HPLC systému. Některé techniky jsou doplněny o odkazy na publikace metod vyvinutých a prakticky prověřených ve farmakokinetických studiích společnosti Pharmakl spol. s r.o.

Ve stručném přehledu klasických i novějších metod je zřetelný směr vývoje vedoucí k úplné nebo alespoň částečné automatizaci. Základní principy zpracování zůstávají zachovány, k posunu dochází především na úrovni instrumentace. Nové techniky (SPME, SPDME, atd.) přinášejí rychlé a přesné zpracování velkého množství vzorků, možnost eliminace lidského faktoru, snížení nároků na objemy vzorků i nákladů na analýzu. Největším přínosem jsou tyto metody zejména pro běžnou klinickou laboratorní praxi, terapeutické sledování hladin léků a obecně pro všechny provozy, kde počet analýz je vyšší a jednotlivé metody stanovení se příliš nemění. Efektivita i ekonomická úspornost automatizace však klesá s klesajícím počtem analýz a zanedbatelné nejsou ani pořizovací náklady. Proto v oborech, ve kterých převládá výzkumná část nad rutinní analýzou, nacházejí nové technologie uplatnění pouze částečně. Menší laboratorní zařízení s poměrně nízkým obratem vzorků zabývající se například bioekvivalenčními studii nadále využívají klasické ruční zpracování biologického materiálu a jejich úsilí je obráceno spíše k vývoji robustní a kvalitní metody stanovení.

Metody vyvíjené pro účely bioekvivalenčních farmakokinetických studií společnosti Pharmakl spol. s r.o. využívají pouze neautomatizované techniky k úpravě biologického materiálu (převážně plazmy). Z celkového objemu validovaných metod činí 36% liquid-liquid extrakce, 29% zpětná liquid-liquid extrakce, 17% srážení methanolem, 6% solid-phase extrakce, 6% srážení kyselinou chloristou a 3% srážení acetonitrem. Ve zbývajících 3% je technika úpravy složitější (například kombinace deproteinace, SPE a derivatizace).

Výběr vhodné metody úpravy biologického materiálu úzce souvisí s vlastní instrumentální analýzou (HPLC). V tomto pohledu je problematika úpravy vzorků dílčí součástí celého vývoje metody stanovení daného analytu. Správnost výběru i kvalitu provedení úpravy biologického materiálu je možné posuzovat spolu s chromatografickou metodou v rámci validačních kritérií.

Experimentální část bakalářské práce popisuje praktickou aplikaci vybraných metod úpravy biologického materiálu před HPLC analýzou při vývoji

stanovení venlafaxinu a jeho aktivního metabolitu O-demethylvenlafaxin v lidské plasmě. Prezentace postupů vývoje a validace metody měla za úkol přiblížit vzájemné souvislosti mezi úpravou biologického materiálu a optimalizací chromatografických podmínek. Pro úplnost byly prezentovány také data validační zprávy.

Závěrem je možné shrnout, že určujícím momentem při výběru vhodné metody úpravy vzorku biologického materiálu je použitá chromatografická metoda, požadovaný limit citlivosti a nároky na množství analyzovaných vzorků.

## 6. ZKRATKY

DI-SPME	ozn. techniky přímého ponoření metody SPME
FTH	freeze and thaw stability high concentration
FTL	freeze and thaw stability low concentration
HF-LPME	Hollow Fibres Liquid Phase Micro Extraction
HS-SPME	ozn. techniky headspace metody SPME
K1-6	kalibrační vzorky
K <sub>2</sub> EDTA	didraselná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
K <sub>3</sub> EDTA	tridraselná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
LLE	Liquid-Liquid Extrakce
LOQ	limit of quantification
LPME	Liquid Phase Micro Extraction
LTH	long term stability high concentration
LTL	long term stability low concentration
NSRI	Noradrenaline and Serotonin Reuptake Inhibitors
ODV	O-demethylvenlafaxin
QC	quality control
SD-LPME	Single Drop Liquid Phase Micro Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SLME	Supported Liquid Membrane Extraction
SPDME	Solid Phase Dynamic Micro Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
VEN	venlafaxin

## 7. LITERATURA

1. Allen D. L., Oliver J.S.: The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Science International*, 2000, 107, 191-199.
2. Arancibia V., Valderrama M., Madariaga A., Zuniga M.C., Segura R.: Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection. *Talanta*, 2003, 61, 377-383.
3. Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: *Bioanalytika léků*, Avicenum, Praha 1990.
4. Bhatt J., Jangid A., Venkatesh G., Subbaiah G., Singh S.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2005, 829, 75-81.
5. Clement E.M., Odontiadis J., Franklin M.: Simultaneous measurement of venlafaxine and its major metabolite, oxydesmethylvenlafaxine, in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection and utilisation of solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 1998, 705, 303-308.
6. Danaher M., O'Keeffe M., Glennon J.D.: Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO<sub>2</sub> with in-line trapping 2 on basic alumina. *J. Chromatogr. B*, 2001, 761, 115-123.
7. Douša M.: *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2002.
8. Edder P., Staub C., Veuthey J. L., Pierroz I., Haerdi W.: Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J. Chromatogr. B*, 1994, 658, 75-86.
9. Gagné G.: Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, 1993.
10. Gioti E. M., Skalkos D.C., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D.: Single-drop liquid phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1093, 1-10.



11. Greiner Ch., Hiemke Ch., Bader W., Haen E.: Determination of citalopram and escitalopram together with their active main metabolites desmethyl(es)citalopram in human serum by column-switching high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B.*, 2006, article in press.
12. Gumbhir K., Mason W.D.: High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and its conjugates in human plasma using solid-phase extraction and electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996, 14, 623-630.
13. Hylton K., Mitra S.: Automated, on-line membrane extraction. *J. Chromatogr. A*, 2007 (article in press).
14. Chromý V., Fischer J., Havel J., Votava M.: *Bioanalytika*, Masarykova Univerzita, Brno 2002.
15. Jochmann M. A., Kmiecik M. P., Schmidt T.C.: Solid-phase dynamic extraction for the enrichment of polar volatile organic compounds from water. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1115, 208-216.
16. Juan H., Zhiling Z., Huande L.: Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J. Chromatogr. B*, 2005, 820, 33-39.
17. Kawahara S., Ruangdech J., Isono Y., Hikosaka M., Tanaka Y.: Effects of nonrubber components on the crystallization behavior of natural rubber. *Journal of Macromolecular science (část B)*, 2003, 42, 761-771.
18. Klíma J., Grafnetterová J.: *Pokroky ve farmacii 7*, Avicenum, Praha 1987.
19. Klíma J., Petrásek R., Kočandrle V.: Abstract from tenth Internat. Symposium on Column Liquid Chromatography, San Francisco, USA, May 18.-23., 1986.
20. Klimeš J. a kolektiv: *Kontrola léčiv I.*, Karolinum, Praha 2002.
21. Kumazawa T., Lee X., Sato K., Suzuki O.: Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 492, 49-67.
22. Liu W., Cai H., Li H.: High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of venlafaxine and its three metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2007 (article in press).
23. Lord H., Pawliszyn J.: Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A*, 2002, 902, 17-63.
24. Macek J., Klíma J. and Ptáček P.: Rapid determination of tamsulosin in human plasma by high-performance liquid chromatography using extraction with butyl acetate, *J. Chromatogr. B.*, 2004, 809, 307-311.

25. Macek J., Klíma J., Ptáček P.: Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 2006, 832, 169-172.
26. Macek J., Ptáček P. and Klíma J.: Rapid determination of pseudoephedrine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 2002, 766, 289-294.
27. Macek J., Ptáček P., Klíma J.: Stanovení venlafaxinu v lidské plasmě. Validační zpráva. Pharmakl spol. s r.o., Praha, 2004.
28. Marojs R. E.: Miniaturized Approaches to Conventional Liquid-Liquid Extraction, LCGC Europe, 2006 May 1.
29. Matoga M., Pehourcq F., Titier K., Dumora F., Jarry C.: Rapid high performance liquid chromatographic measurement of venlafaxine and O desmethylvenlafaxine in human plasma. Application to management of acute intoxications. *J. Chromatogr. B*, 2001, 760, 213-218.
30. McDowall R.D.: Sample preparation for biomedical analysis. *J. Chromatogr.*, 1989, 492, 3-58.
31. Mikeš O. a kolektiv: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
32. Morrison J. F., Sniegowski L. T., Yoo W. J.: Evaluation of analytical methodologies for non-intrusive drug testing: supercritical fluid extraction of cocaine from hair. National Institute of Standards and Technology, Analytical Chemistry Division, 1998, NIJ Report 601-98.
33. Mullett W. M., Levsen K., Lubda D., Pawliszyn J.: Bio-compatible in-tube microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. *J. Chromatogr. A*, 2002, 963, 325-334.
34. Mullett W. M., Wallis M., Levsen K., Borlak J., Pawliszyn J.: Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2004, 801, 297-306.
35. Muth P., Metz R., Slems B., Bolten W., Vergin H.: Sensitive determination of nitrofurantoin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1996, 729, 251-258.
36. Nageswara R. R., Narasa A. R.: Simultaneous separation and determination of process-related substances and degradation products of venlafaxine by reversed-phase HPLC. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2733-2744.
37. Nobilis M., přednáška Analýza exogenních látek v biologickém materiálu, Hradec Králové, 2006.

38. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K. E.: Bioanalysis of drugs by liquid phase microextraction coupled to separation techniques. *J. of Chromatogr.B*, 2005, 817, 3-12.
39. Ptáček P., Klíma J. and Macek J. : Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 2002, 767, 111-116.
40. Ptáček P., Klíma J. and Macek J.: Determination of mirtazapine in human plasma by liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, 2003, 794, 323-328.
41. Ptáček P., Macek J. and Klíma J. : Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma, *Journal of Chromatography B* 2003, 789, 405-410.
42. Raboch J.: Venlafaxinum. *Remedia*, 2005, 23-31.
43. Raut B.B., Kolte B. L., Deo A. A., Bagool M. A., Shinde D. B.: A rapid and sensitive HPLC method for the determination of venlafaxine and O demethylvenlafaxine in human plasma with UV detection. *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 2003, 26, 1297-1313.
44. Ross W. R., Glaubiger D. L. and Kohn K.W.: Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1978, 519, 23-30.
45. Sabbioni C., Saracino M.A., Mandrioli R., Pinzauti S., Furlanetto S., Gerra G., Raggi M.A.: Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma Comparison of amperometric and coulometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1032, 65-71.
46. Santana F. J. M., Oliveira A. R. M., Bonato P. S.: Chiral liquid chromatographic determination of mirtazapine in human plasma using two phase liquid-phase microextraction for sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 549, 96-103.
47. Šatínský D., Serralheiro H.S., Solich P., Araújo A. R., Montenegro M. C.B.S.M. : On-line coupling of sequential injection extraction with restricted access materials and post-column derivatization for sample clean up and determination of propranolol in human plasma. *Analytica chimica acta*, 2007 (article in press).
48. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005.
49. Tournel G., Houdret N., Hédouin V., Deveaux M., Gosset D., Lhermitte M.: High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven serotonin reuptake inhibitors in human serum. *J. Chromatogr. B*, 2001, 761, 147-158.

50. Venn R. F., Merson J., Cole S., Macrae P.: 96-Well solid-phase extraction: a brief history of its development. *J. Chromatogr. B*, 2005, 817,77-80.
51. Vu R. L., Helmeste D., Albers L., Reist Ch.: Rapid determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. B*, 1997, 703, 195-201.
52. Wu J., Lee H. K.: Ion-pair dynamic liquid-phase microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of long-chain fatty acids in water samples. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1133,13-20.
53. Zhang W., Xiang B. , Wang C.: Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of venlafaxine in human plasma and application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 2007, 21, 266-272.
54. [http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper\\_32261.htm](http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper_32261.htm)
55. <http://rum.bf.jcu.cz/>
56. <http://www.analyt.wz.cz/>
57. <http://www.chromatography-online.org>
58. <http://www.labicom.cz/Upload/665.pdf>
59. <http://www.micropump.com/pdfs/literature/AppNoteHPLC.pdf>
60. <http://www.natur.cuni.cz/~suchan/>