



**UNIVERZITA KARLOVA**  
Farmaceutická fakulta  
v Hradci Králové

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

## **HPLC STANOVENÍ RIFAMPICINU**

**MARTINA SALVOVÁ**

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. VLADIMÍR KUBÍČEK, Csc.

STUDIJNÍ PROGRAM: ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA

**HRADEC KRÁLOVÉ**

**2021**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

14.05.2021

Martina Salvová

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví, Csc. za pomoc při vykonání experimentální části. Rovněž mu děkuji za cenné rady, připomínky a odborné vedení této bakalářské práce.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE .....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1 Chromatografické metody .....	11
3.1.1 Princip chromatografie .....	11
3.1.2 Rozdělení chromatografických metod .....	12
3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	13
3.2.1 Úvod k HPLC.....	13
3.2.2 Základní chromatografické charakteristiky .....	14
3.2.3 Stacionární fáze .....	16
3.2.4 Mobilní fáze .....	18
3.2.5 Chromatografie s normálními fázemi.....	19
3.2.6 Chromatografie s reverzními fázemi .....	20
3.2.7 Isokratická, gradientová eluce.....	21
3.2.8 Instrumentace HPLC .....	22
3.2.9 Fluorescenční detekce .....	25
3.3 Rifampicin.....	26
3.3.1 Některé práce publikované o chromatografickém stanovení Rifampicinu....	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky .....	29
4.2 Pracovní postup.....	30
4.2.1 Příprava octanu amonného pro mobilní fázi.....	30
4.2.2 Příprava pracovních roztoků pro experimenty.....	30
4.2.3 Úprava vzorků biologického materiálu před HPLC.....	30
4.2.4 Chromatografické podmínky .....	31

5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	32
5.1 Použitá složení mobilní fáze .....	32
5.2 Testování možné velikosti nástřiku .....	34
5.3 Stanovení mrtvého retenčního času .....	37
5.4 Gradientová eluce .....	37
5.5 Analýza biologických vzorků.....	38
5.6 Slepý vzorek.....	39
5.7 Kalibrační přímka.....	40
5.8 Stanovení limitu kvantifikace .....	41
7. ZÁVĚR.....	42
8. POUŽITÁ LITERATURA .....	43

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$A$	plocha pod píkem
ACN	acetonitril
$b_g$	strmost gradientu
$c_m$	koncentrace analytu v mobilní fázi
$c_s$	koncentrace analytu ve stacionární fázi
$F_m$	průtok mobilní fáze
$h$	výška píku
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$k$	retenční faktor
$K_D$	distribuční konstanta
$k_e$	kapacitní faktor
KI	jodid draselný
$L$	délka kolony
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MTBE	methyl-terc-butylether
$N$	počet teoretických pater
$n$	kapacita separace
$\text{NH}_4\text{Ac}$	octan amonný
NP-HPLC	chromatografie na normálních fázích
ODS	oktadecylsilikagel
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RP-HPLC	chromatografie na reverzních fázích
$S$	konstanta pro eluční sílu rozpouštědla
SPE	extrakce na tuhé fázi
$t_0$	mrtvý retenční čas
$t_g$	doba trvání gradientové eluce
$t_R$	retenční čas
$t'_R$	redukovaný retenční čas
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast světla
$V_0$	mrtvý retenční objem
$V_m$	objem mobilní fáze
$V_R$	retenční objem
$V_s$	objem stacionární fáze
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
$w_b$	šířka píku v jeho základně
$\Delta\phi$	změna ve složení mobilní fáze

## ABSTRAKT

Práce se zabývá nalezením vhodných HPLC podmínek pro stanovení rifampicinu v buněčné tekutině se zaměřením na maximalizaci citlivosti fluorescenční detekce.

Byla použita kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18; 50x4,6 mm; 1,8  $\mu\text{m}$  a gradientová eluce mobilní fází voda/acetonitril. Detekční podmínky byly:  $\lambda_{\text{ex}} = 234 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 394 \text{ nm}$ .

Za uvedených podmínek bylo dosaženo kvantitativního limitu 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , což je hodnota velmi nízká.

Klíčová slova: HPLC, rifampicin, fluorescenční detekce, kalibrační křivka

## **ABSTRACT**

The thesis deals with finding suitable HPLC conditions for determination of rifampicine in a cell fluid with a focus to maximize the sensitivity of the fluorescence detection.

ZORBAX Eclipse XDB-C18; 50x4,6 mm; 1,8  $\mu\text{m}$  column was used and gradient elution with the mobile phase water/acetonitrile was applied. Detection conditions were:  $\lambda_{\text{ex}} = 234 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 394 \text{ nm}$ .

Under these conditions limit of quantitation was 0.1  $\mu\text{mol/l}$ , which represents a very low value.

Key words: HPLC, rifampicine, fluorescence detection, calibration curve



## 1. ÚVOD

Jelikož je vysokoúčinná kapalinová chromatografie poměrně velmi univerzální kvalitativní i kvantitativní metodou, tvoří nedílnou součást většiny analytických laboratoří. Díky velmi široké nabídce stacionárních fází, jsme při správném zvolení separačního mechanismu schopni analyzovat prakticky všechny typy molekul od nejmenších iontů až po makromolekuly. Další výhodou je, že se jedná o poměrně rychlou metodu, jelikož nejčastější jedna analýza trvá 10-30 min.

Ve farmaceutickém průmyslu a biochemických laboratořích nachází HPLC široké uplatnění. Díky vysoce citlivým detektorům lze v biologickém materiálu stanovit i velmi malé množství analytu. HPLC se využívá např. při stanovení hladin léčiv v organismu. V této práci se zaměřuji na chromatografickou separaci antibiotika rifampicinu.

## 2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Zadání této práce vychází z požadavku PharmDr. Tomáše Smutného, Ph.D. na nalezení vhodné separační metody pro stanovení rifampicinu v buněčné tekutině, případně v dalších biologických matricích, s velmi vysokou citlivostí (jednotky až stovky nmol/l). Přístrojové vybavení katedry biofyziky a fyzikální chemie poskytovalo jedinou šanci – vyzkoušet HPLC s fluorescenční detekcí.

Cílem této bakalářské práce s názvem HPLC stanovení rifampicinu proto je pokusit se nalézt takovou metodu s využitím výše zmíněného přístrojového vybavení katedry. Prvotní pokusy provedené na katedře s dlouhou (250 mm) kolonou byly neúspěšné, proto se tato práce zaměřila na použití kolony výrazně kratší (50 mm) s malou zrnitostí stacionární fáze (1,8  $\mu\text{m}$ ).

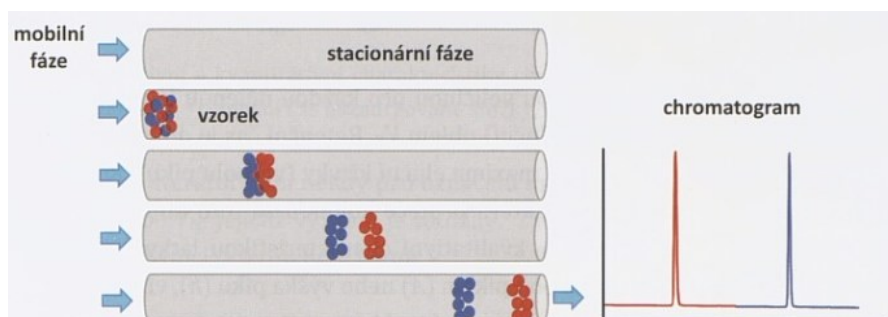
## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Chromatografické metody

#### 3.1.1 Princip chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody založené na rozdělení složek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Pohybem mobilní fáze se vzorkem přes stacionární fázi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi těmito dvěma fázemi a následné separaci měřeného analytu od ostatních molekul ve vzorku (Obr. 1). Vznikají interakce mezi fázemi a dělenými látkami, které jsou základním předpokladem pro separaci. Čím silněji se látka poutá ke stacionární fázi, tím více je v ní zadržována a dochází tak k její retenci. Retence je selektivní charakteristikou látek, každá látka je ve stacionární fázi zachytávána jinou silou a vytvoří se tak zóny jednotlivých složek ze směsi. Naopak při vyšší interakci látky s mobilní fází dochází k tzv. eluci. Mobilní fáze je pak charakterizována svou eluční silou, pomocí které dochází k vyplavování analytu ze stacionární fáze.

Pro chromatografickou separaci je nutné, aby platily základní podmínky. Jako první musí platit vzájemná nemísitelnost fází. Dále platí, že se vzorek aplikuje na začátek stacionární fáze a mobilní fáze pak musí nevyhnutelně protékat přes tuto stacionární fázi. Třetí obecnou podmínkou chromatografické separace jsou odlišné distribuční konstanty (viz dále) jednotlivých látek. Pokud mají látky totožnou distribuční konstantu není možné je od sebe odseparovat. Abychom dokázali zhodnotit, jak se jednotlivé složky směsi odseparovaly, musíme zajistit jejich detekci neboli vizualizaci.



Obr. 1: Princip separace dvou látek v chromatografickém systému

[4]

Podle účelu můžeme chromatografii rozdělit na preparativní a analytickou. Preparativní chromatografie slouží k izolaci čistých analytů využívaných pro další použití. Analytická chromatografie slouží ke stanovení množství těchto analytů a k měření relativních podílů jednotlivých látek ve směsi. Obecně je chromatografie vysoce účinná kvalitativní i kvantitativní analytická metoda, která nachází uplatnění v mnoha oborech. [2; 3; 4; 8]

### 3.1.2 Rozdělení chromatografických metod

Jelikož existuje velké množství chromatografických metod, je užitečné tyto metody rozdělit. Vzniká tak několik kategorií rozdělených podle následujících kritérií.

#### a) Rozdělení dle skupenství mobilní fáze

- Kapalinová chromatografie – mobilní fáze v podobě kapaliny
- Plynová chromatografie – mobilní fází je nosný plyn.

#### b) Rozdělení dle uspořádání stacionární fáze

- Kolonové uspořádání – stacionární fáze je v koloně.
- Plošné uspořádání:
  - papírová chromatografie – stacionární fáze je umístěna na chromatografickém papíru
  - tenkovrstvá chromatografie – stacionární fází je např. silikagel na hliníkové fólii.

#### c) Rozdělení dle separačního mechanismu

- Adsorpční chromatografie  
Stacionární fází je tuhá látka (tzv. adsorbent) a na její povrch se vážou dělené složky z mobilní fáze. Separace je založena na rozdílné afinitě látek ke stacionární fází, jako stacionární fáze se nejčastěji využívá silikagel.
- Rozdělovací chromatografie  
Zde je stacionární fáze kapalina přichycena na inertoním nosiči, nejčastěji se jako nosič používá celulóza a jako kapalina voda. Vlivem různých rozdělovacích koeficientů dochází k odlišné rozpustnosti látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn.

- Iontově-výměnná chromatografie  
Stacionární fází je iontoměnič, na jehož povrchu dochází k chemické reakci a následné výměně iontů. Samotnou separaci způsobují různě velké elektrostatické síly mezi iontoměničem a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie  
Jako stacionární fáze je použit gel s póry, který vyplňuje kolonu. Při separaci záleží na různé velikosti molekul, a vzniká tak molekulový síťový efekt. Menší molekuly prostupují hlouběji do gelu a jsou ve stacionární fází déle drženy. Je tak možné separovat i velké molekuly.

Výběr chromatografické metody závisí také na molekulové hmotnosti analyzovaných látek. Tabulka 1 udává přehled v jakých mezích molekulových hmotností jednotlivé metody pracují. [1; 2; 8; 9]

Metoda	Relativní molekulová hmotnost $M_r$
Plynová chromatografie	1 – 100
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	70 – 10 000
Papírová a tenkovrstvá chromatografie	100 – 2 000
Gelová chromatografie	800 – 1 000 000

Tabulka 1: Rozmezí molekulových hmotností analytů pro jednotlivé chromatografické metody

## 3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

### 3.2.1 Úvod k HPLC

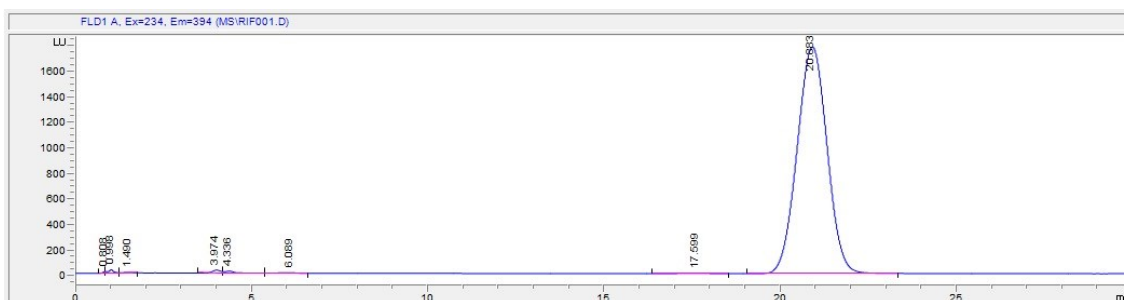
HPLC (*High-performance liquid chromatography*) představuje kolonový typ chromatografie, kdy stacionární fáze je umístěná v koloně. HPLC může využívat téměř všechny separační mechanismy, podle kterých má stacionární fáze pak mnoho podob (od ukotvených kapalin na nosiči, přes gely až po pevné částice). Mobilní fází je kapalina, nejčastěji voda a organické polární rozpouštědlo, která je do systému přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla a protéká přes kolonu.

V roce 1903 položil ruský botanik M. S. Cvet základy kapalinové adsorpční chromatografie. Jako první odseparoval listová barviva a podle toho metodu pojmenoval (řecky chroma = barva). Jako stacionární fází použil uhlíčan vápenatý z rozemleté křídly a podařilo se mu tak vytvořit jednotlivé barevné zóny z extraktu rostlin. Tyto zóny

se pohybovaly rozdílnou rychlostí díky interakci se stacionární fází a hybné síle rozpouštědla, a tak došlo k jejich odseparování. Po tomto významném objevu však chromatografie upadla v zapomnění a trvalo několik desítek let, než se opět dostala do popředí. [3; 6; 7]

### 3.2.2 Základní chromatografické charakteristiky

Po nástřiku vzorku na kolonu dochází k interakci jednotlivých složek se stacionární fází, tím dojde k odseparování a vytvoření zón. Následně jsou tyto zóny zaznamenány detektorem a dochází k převedení signálu do podoby chromatogramu. Chromatogram (Obr. 2) představuje závislost intenzity signálu na čase a je charakteristický elučními křivkami, tzv. píky.



Obr. 2: Ukázka chromatogramu

Základní charakteristickou kvalitativní veličinou, která popisuje retenci každého analytu ve stacionární fázi, je retenční čas  $t_R$  [min]. Jedná se o dobu, která uplyne mezi nástřikem vzorku na kolonu a maximem píku. Prakticky udává čas, který analyt stráví ve stacionární a mobilní fázi. Další obdobnou charakteristikou je tzv. retenční objem  $V_R$  [ml] a ten představuje množství mobilní fáze, která proteče kolonou za  $t_R$ . Je to tedy objem mobilní fáze potřebný pro eluci daného analytu při daném průtoku  $F_m$  [ml/min] a platí vztah 1.

$$V_R = F_m \cdot t_R. \quad (1)$$

Tzv. mrtvý retenční objem či čas  $V_0$ ,  $t_0$  je charakteristický pro látku, která se na koloně nezadržuje a je pouze unášena mobilní fází. Všechny složky ze vzorku stráví stejně dlouhou dobu v mobilní fázi, odlišný je pouze čas, který látka stráví ve stacionární fázi.

Tuto dobu popisuje tzv. redukovaný retenční čas  $t'_R$ . Mezi jednotlivými časy platí následující vztah 2.

$$t_R = t'_R + t_0 \quad (2)$$

Chromatografický pík popisujeme pomocí jeho šířky a výšky. Šířka píku se může měřit v jeho základně ( $w_b$ ), avšak častěji se pracuje se šířkou píku v polovině jeho výšky ( $w_{1/2}$ ), která se udává ve stejných časových jednotkách jako  $t_R$ . Výška píku  $h$ , nebo plocha pod píkem  $A$ , slouží jako kvantitativní charakteristiky analytu. Pomocí kalibrační křivky, která udává závislost plochy či výšky píku na koncentraci, lze vypočítat neznámou koncentraci stanovovaného analytu.

Pomocí  $w_{1/2}$  vypočítáme účinnost kolony. Účinnost kolony, a tedy i celé separace, pak vyjadřuje tzv. počet teoretických pater  $N$ . Jedná se o bezrozměrnou veličinu a představuje míru rozmývání elučních zón. Čím vyšší je  $N$ , tím méně se jednotlivé zóny rozmývají a kolona je účinnější.  $N$  je pak závislé na délce dané kolony, teplotě, viskozitě mobilní fáze,  $t_R$ ,  $F_M$  a také na velikosti částic, které vyplňují kolonu. Pro praktické výpočty se nejčastěji používá vzorec 3.

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2. \quad (3)$$

K porovnání účinnosti kolon různých délek pak slouží tzv. výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  [ $\mu\text{m}$ ]. Ten se vypočítá jako poměr délky kolony ( $L$ ) a  $N$  (vzorec 4).

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

Rozdělení analytu mezi dvě fáze popisuje distribuční konstanta  $K_D$ . Vypočítá se jako podíl koncentrace analytu ve stacionární fázi a koncentrace analytu v mobilní fázi (vzorec 5).

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (5)$$

Pomocí  $K_D$  pak získáme retenční faktor  $k$  (vzorec 6). Jedná se o poměr objemů stacionární a mobilní fáze vynásobený právě  $K_D$ :

$$k = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (6)$$

Udává stupeň retence látky a díky němu pak můžeme vyjádřit  $t_R$  i  $V_R$  (vzorce 7,8).

$$V_R = V_0 \cdot (1+k) \quad (7)$$

$$t_R = t_0 \cdot (1+k) \quad (8)$$

V praxi představuje  $k$  podíl  $t'_R$  a  $t_0$ . Jednoduchou úpravou rovnic (7 a 8) získáme vztah (9) pro výpočet  $k$ :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \approx \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (9)$$

Požadované hodnoty  $k$  pro většinu analýz leží v rozmezí od 1 do 20. Hodnota  $k > 20$  naznačuje, že je analyt vysoce zadržován stacionární fází a jeho detekce je obtížná, neboť dochází k nadměrnému rozmývání píků. Analyt s nulovou hodnotou  $k$  naopak není zadržován stacionární fází vůbec. [3; 5; 8]

### 3.2.3 Stacionární fáze

V této práci byl využit adsorpční separační mechanismus. Dochází k zachycení neutrální rozpuštěné látky z mobilní fáze k povrchu tuhé stacionární fáze v tzv. aktivních centrech. Obecně platí, že polární analyt se bude vázat k polární stacionární fázi, a naopak nepolární analyt bude mít větší afinitu k nepolární stacionární fázi.

Jelikož HPLC pracuje za vysokého tlaku a různých pH, musí být stacionární fáze mechanicky i chemicky odolná. Dále by neměla bobtnat ani se zmenšovat při styku s mobilní fází. Sorbent je složen z porézních mikročastic. Velikost pórů hraje důležitou roli, neboť částice s malými póry představují velkou adsorpční plochu pro interakci s analytem, a tak zde dochází k větší retenci. Pro separaci velkých molekul, jako jsou např. proteiny, se však používají stacionární fáze s většími póry, aby nedocházelo k jejich vyloučení z malých pórů. U většiny HPLC analýz je důležité, aby velikost pórů byla v celé stacionární fázi rovnoměrná. Porézní mikročástice mohou mít kulový či nepravidelný tvar a jejich velikost je nejčastěji v rozmezí 3–5  $\mu\text{m}$ . Částice  $< 2 \mu\text{m}$  jsou typické pro UHPLC. Malé částice mají za následek vyšší účinnost a kratší dobu analýzy, na druhé straně u nich však dochází ke zvýšenému zpětnému tlaku, proto je u UHPLC nezbytně nutné pracovat za vyšších tlaků.



Nejrozšířenější stacionární fází je silikagel, což je forma oxidu křemičitého. Ten můžeme využívat jako nemodifikovaný pro NP-HPLC či pro HILIC, ale také modifikovaný pro RP-HPLC. Na slabě kyselém povrchu obsahuje silikagel silanolové skupiny Si-OH, které slouží pro interakci s polárními látkami a více interagují s bazickými látkami. Na tyto silanolové skupiny lze chemicky navázat jiné funkční skupiny. Při navázání alkylového řetězce na kyslík z OH skupiny vzniká nejčastější typ modifikovaného silikagelu využívaného pro RP-HPLC. Alkylový řetězec s 18 uhlíky navázaný na silikagel se nazývá ODS. Dále můžeme silikagel modifikovat pomocí fenylu či alkylfenylu, a tím zvýšit retenci aromatických látek na stacionární fázi.

Oxid křemičitý (silikagel) je mechanicky pevný a vydrží vysokotlaké podmínky v HPLC systému. Další výhodou je jeho snadná chemická modifikovatelnost, a díky tomu široké využití. Avšak hlavní nevýhodou silikagelových stacionárních fází je jejich nízká chemická stabilita. Silikagel je použitelný pouze v rozmezí pH 2–9 a teploty do 60 °C. V prostředí o pH menší než 2 může docházet k hydrolýze funkčních skupin navázaných na silikagelovém nosiči. Naopak při pH větším než 8 se začne oxid křemičitý rozpouštět, a to vede ke snížení až ztrátě účinnosti separace.

Dále jsou využívány stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého či zirkoničitého, polymerní pryskyřice na bázi polystyren-divinylbenzenu a hybridní stacionární fáze. Ty jsou použitelné prakticky v celém rozsahu pH a také při vyšších teplotách, i když jejich mechanická odolnost je nižší.

Oxid zirkoničitý má na svém povrchu mimo jiné Lewisovy kyseliny a ty silně reagují s hydroxylovými (OH<sup>-</sup>), fluoridovými (F<sup>-</sup>), fosfátovými (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) a karboxylovými (COO<sup>-</sup>) skupinami. Proto je nutný přídavek pufru do mobilní fáze. Polymerní fáze obsahují mikropóry o velikosti 1 nm a využívají se pro separaci větších molekul, jejichž separaci tyto mikropóry neovlivňují. Hybridní stacionární fáze využívají methylové a ethylenové skupiny k nahrazení OH skupin silikagelu, a tím se sníží poměr silanolových skupin. Vzniklá hybridní fáze má stejně vysokou účinnost jako silikagel, ale zároveň je chemicky i teplotně stabilní. [3; 5; 6]

### 3.2.4 Mobilní fáze

U HPLC používáme jako mobilní fázi směs rozpouštědel. Tok mobilní fáze představuje hybnou sílu, která posouvá analyty přes kolonu směrem k detektoru. Před samotnou separací je nutné mobilní fázi přefiltrovat, a tím ji zbavit mechanických nečistot. Čistota mobilní fáze je klíčová, neboť nečistoty snižují citlivost detekce a také mohou způsobovat interference. Dalším důležitým krokem je odplynění mobilní fáze, které probíhá buď přímo v HPLC systému v tzv. odplyňovači, nebo se u starších metod využívá odplynění pomocí probublávání inertním plynem, či ultrazvukem mimo HPLC systém.

Mezi vlastnosti, které by měla ideální mobilní fáze mít, patří nízká viskozita, nízká toxicita a nízká těkavost. Těkavé látky jsou často vysoce hořlavé a také u nich dochází k většímu vzniku bublin. Mobilní fáze musí sloužit jako dobré rozpouštědlo pro analyty, ale zároveň nesmí ovlivňovat jejich detekci. Interakce s analytem je tím větší, čím větší má mobilní fáze eluční sílu, a tím dochází ke zkrácení  $t_R$ .

Výběr mobilní fáze záleží na typu chromatografického módu. Eluční síla rozpouštědla a jeho selektivita pak závisí na jeho polaritě. U NP-HPLC pracujeme s nepolární mobilní fází a dochází k hydrofobním interakcím mezi rozpouštědlem a analytem. U RP-HPLC naopak používáme polární rozpouštědla a vznikají hydrofilní interakce.

Další důležitou charakteristikou mobilní fáze, která ovlivňuje analýzu, je její pH. Zejména pH vodné složky mobilní fáze může mít velmi zásadní vliv na retenci ionizovatelných analytů. V RP-HPLC, která je v praxi daleko více využívána, se ionizovatelná forma analytu hůře separuje. Nedochozí k interakci se stacionární fází a tyto analyty se eluují v  $t_0$ . Využívají se pufry, které jsou nutné pro kontrolu pH mobilní fáze. Mezi běžně používané pufry patří trifluoroctová kyselina, fosfátové, amoniové či uhličitanové soli. Nesmíme zapomenout, že pufry jsou účinné pouze v rozmezí  $\text{pH} \pm 1,0$ – $1,5$  od jejich hodnot  $\text{pK}_a$ . Pro slabě kyselé analyty požadujeme  $\text{pH} = 2$ – $5$ , u slabých bází naopak zvyšujeme pH na hodnotu  $7$ – $8$ . Tím zvýšíme retenci analytu. [3; 5]

### 3.2.5 Chromatografie s normálními fázemi

Na základě mechanismu retence existuje mnoho separačních módů. Jedním typem chromatografické separace je NP-HPLC. Při tomto módu pracujeme s polárnější stacionární fází, zatímco mobilní fáze je méně polární či nepolární. Neutrální látky jsou zde od sebe separovány na základě své polarity. Dochází k polárním interakcím mezi povrchem stacionární fáze a analytem. Čím je analyt polárnější, tím je jeho retence na koloně větší.

U NP-HPLC je možný rozdělovací mechanismus separace, avšak dominantní je mechanismus adsorpční. Adsorpce je zde popsána dvěma způsoby. První způsob představuje kompetici molekul analytu a molekul mobilní fáze o adsorpční místo na stacionární fázi. Druhý způsob je založen na existenci dvojvrstvy mobilní fáze kolem stacionární fáze. V této dvojvrstvě pak dochází k interakci s molekulami analytu.

Typickými stacionárními fázemi pro NP-HPLC jsou porézní adsorbenty. Nejrozšířenější jsou silikagel a oxid hlinitý. Silikagel je upřednostňován, neboť je snadno dostupný a levný. Také se používá modifikovaný silikagel s navázanými polárními funkčními skupinami, jako např. diolové či nitro ( $\text{NO}_2$ ) skupiny. Kyano (CN) a aminoskupiny ( $\text{NH}_2$ ) jsou slabě polární a jsou využívány pro normální i reverzní mód.

Jako mobilní fáze se využívají nepolární organická rozpouštědla, jejichž výběr se řídí dle tzv. eluotropní řady rozpouštědel. Používá se např. pentan, isooktan, tetrachlormethan či benzen a toluen. K těmto nepolárním rozpouštědlům je však přidáno malé množství polárnější kapaliny, jako např. 2-propanol. Tato aditiva určují selektivitu mobilní fáze.

Pomocí NP-HPLC lze separovat zejména polární látky, avšak dnes už je tato metoda nahrazována HILIC. Mezi nevýhody NP-HPLC patří práce s těkavými nepolárními rozpouštědly a nemožnost pracovat s vodnými vzorky. Další nevýhodou je nežádoucí účinek vody na stacionární fázi. Dochází k adsorpci vody z atmosféry do stacionární fáze, a tím se snižuje retence daného analytu. S touto technikou se pracovalo zejména do 70. let minulého století, poté se začala rozvíjet RP-HPLC. [3; 6]

### 3.2.6 Chromatografie s reverzními fázemi

RP-HPLC je nyní nejpoužívanější chromatografický režim využívající polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi. K separaci neutrálních látek v tomto režimu dochází na základě jejich hydrofobicity. Molekula analytu se váže na povrch stacionární fáze a je v ní zadržována prostřednictvím hydrofobních interakcí. Mezi molekulami analytu a molekulami mobilní fáze dochází naopak k hydrofilním interakcím. Nejdříve se eluují polární látky, poté látky nepolární, které silně interagují s hydrofobními skupinami navázanými na stacionární fázi.

Nejpoužívanějším typem stacionární fáze u RP-HPLC je modifikovaný silikagel s chemicky navázanými nepolárními funkčními skupinami na silanolových skupinách. Nejčastěji dochází k navázání uhlíkových řetězců, typicky C<sub>8</sub> či C<sub>18</sub>, přičemž retence exponenciálně roste s délkou řetězce. Také se ale může použít kyano či amino skupina. Ovšem ze sterických důvodů není možné, aby zreagovaly všechny silanolové skupiny, proto dochází k modifikaci nezreagovaných silanolů např. trimethylchlorsilanem. Tento proces se nazývá end-capping. Dále se mohou používat polymerní stacionární fáze, jako je polystyren, polymethakrylát, nebo pevné stacionární fáze jako např. porézní grafitový uhlík.

Jako mobilní fáze je využívána směs velmi polárního rozpouštědla, typicky vody, a dalšího méně polárního organického rozpouštědla mísitelného s vodou, nejčastěji methanolu či ACN. Tato přidaná rozpouštědla opět určují selektivitu mobilní fáze. Voda jako dobrý donor protonů přednostně interaguje s bazickými látkami (např. aminy). Naproti tomu alkoholy jsou dobrými akceptory protonů, a reagují tak s hydroxylovými sloučeninami (např. kyselinami a fenoly). Platí, že čím polárnější mobilní fázi použijeme, tím více se analyt bude vázat ke stacionární fázi a dojde ke zvýšení  $t_R$ .

Přestože byla RP-HPLC zavedena do praxe později, dnes je daleko více využívána. Používá se u více než 70 % všech HPLC analýz. RP-HPLC je vhodná pro separaci nepolárních neionizovaných látek. Mezi nevýhody patří chemická nestabilita silikagelu vůči pH menším než 2 a větším než 8. Její výhodou je práce s polárními mobilními fázemi a možnost práce s vodným roztokem vzorku. [3; 5; 6]

### 3.2.7 Isokratická, gradientová eluce

Veličiny a vzorce (1–9) uvedené v kapitole 3.2.2 platí pouze pro isokratickou eluci. Jedná se o uspořádání chromatografického systému, kdy se nemění složení mobilní fáze. Mobilní fáze se většinou skládá ze dvou rozpouštědel a při isokratické eluci jejich vzájemný poměr zůstává po celou dobu analýzy konstantní. Tento typ eluce se využívá zejména u látek s podobným  $K_D$ , a tedy i s podobnými vlastnostmi.

U složitějších vzorků, ve kterých jednotlivé složky mají široké rozmezí  $K_D$ , rozdílnou polaritu a odlišné fyzikální i chemické vlastnosti, se uplatňuje tzv. gradientová eluce. U takových látek by isokratická eluce byla příliš zdlouhavá. Při gradientové eluci se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze, resp. se mění vzájemný poměr jejich složek. Mobilní fáze se skládá z kapalin, které mají odlišnou eluční sílu a během separace se zvyšuje podíl složky s vyšší eluční silou, a tím se zkracuje  $t_R$ .

K vytvoření gradientu mobilní fáze slouží tzv. směšovač, který míchá mobilní fázi dle předem naprogramovaných pokynů. Na rozdíl od isokratické eluce, kde dochází k postupnému rozšiřování píků, mají všechny eluční křivky u gradientové eluce v ideálním případě stejnou šířku, jelikož dochází k jejich eluci stále silnější mobilní fází. Další výhodou této metody je lepší citlivost detekce pro později eluované látky. Mezi nevýhody však patří časová náročnost při vývoji gradientu, jelikož musí docházet ke stabilizování kolony. Pro gradientovou eluci je také vyžadován složitější přístroj s binárním až kvartérním čerpadlem.

U gradientové eluce platí jiné vzorce a rovnice, než tomu bylo u isokratické eluce. Namísto  $k$  zde používáme faktor  $k_e$ . Jedná se o kapacitní faktor složky při daném složení mobilní fáze a vyjadřujeme ho pomocí strmosti gradientu  $b_g$ , která by měla zůstat po celou dobu stejná (vzorec 10).

$$k_e = \frac{1}{2,3 \cdot b_g} \quad (10)$$

Strmost gradientu pak závisí na době trvání gradientové eluce  $t_g$ , změně ve složení mobilní fáze  $\Delta\varphi$ , konstantě pro eluční sílu rozpouštědla  $S$  a také  $t_0$  (vzorec 11).

$$b_g = \frac{t_0 \cdot \Delta\varphi \cdot S}{t_g} \quad (11)$$

Změna ve složení mobilní fáze se vypočítá jako rozdíl procentuálního finálního a počátečního obsahu mobilní fáze. Narozdíl od isokratické eluce má na retenci v gradientu velký vliv také  $F_m$ . Při zvyšujícím se průtoku se tak zvyšuje  $k_e$ .

Také účinnost separace vyjádřená pomocí  $N$ , je zde popsána novou veličinou – tzv. kapacita separace  $n$ . Dovoluje popis účinnosti separace jak pro isokratickou, tak i pro gradientovou eluci a udává maximální počet píků, které mohou být v chromatogramu s rozlišením rovným jedné. Vypočítá se podle vzorce 12. [3; 5]

$$n = 1 + \frac{t_g}{w_b}, \quad (12)$$

### 3.2.8 Instrumentace HPLC

Na konstrukci HPLC jsou dnes kladeny požadavky zejména ve smyslu citlivosti detektorů a mechanické odolnosti vůči vyššímu tlaku. Při použití co nejmenších částic sorbentu v koloně dochází ke zkrácení analýzy a zvýšení separační účinnosti. Malý rozměr částic sorbentu s sebou nese ale omezení, neboť čím menší částice jsou, tím větší kladou odpor a musí se tak využít vyšší tlak mobilní fáze. Na tomto principu je založena UHPLC. Dalším požadavkem při konstrukci chromatografu je, aby mrtvé objemy byly minimální, jinak dochází k rozmývání elučních křivek.

Chromatograf pro HPLC je složen z těchto základních částí: zásobníky mobilních fází, odplyňovač mobilní fáze, směšovač (pro případ gradientové eluce), vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku, předkolona, analytická kolona, kolonový termostat a detektor. Celá analýza je programovaná a zaznamenávaná pomocí počítače a vhodného softwaru.

Zásobníky neboli rezervoáry mobilních fází jsou nejčastěji skleněnými nádobami, musejí být dobře uzavřené, zejména při používání těkavých a hořlavých rozpouštědel, a také kvůli zamezení kontaminace z okolí. Zároveň však musí být zajištěn dobrý průtok mobilní fáze z nádob. Rezervoáry musí být umístěny výše než vysokotlaké čerpadlo. Pomocí teflonových hadiček je mobilní fáze čerpána přes filtr do odplyňovače. Filtr propouští částice menší jak 0,20  $\mu\text{m}$ , a dochází tak k zabránění vstupu mechanických nečistot do náplně kolony.

Odplyňovač neboli degaser slouží k odstranění bublinek vzduchu z mobilní fáze. Bublinky vzduchu jinak vyvolávají změny tlaku či přímo snižují citlivost detekce, jako např. kyslík u fluorescenčního stanovení. Pravděpodobnost vzniku bublin se zvyšuje při gradientové eluci, jelikož dochází ke změnám poměru dvou složek mobilní fáze. Nejčastěji se používá tzv. vakuový degaser, který je složen z kapiláry s polopropustnou membránou umístěnou ve vakuové komoře. Díky rozdílu tlaku a selektivitě membrány procházejí přes membránu pouze plyny, a dochází tak k jejich odstranění z mobilní fáze. Další technikou, avšak dražší, pro odplynění mobilní fáze je tzv. probublávání heliem. Helium je přiváděno přímo do zásobníků mobilních fází, a jelikož je rozpustnost helia ve většině rozpouštědel velmi malá, dochází k vytěsnění ostatních běžných plynů.

Při použití gradientové eluce se využívá tzv. směšovač. Ten míchá složení mobilní fáze v předem nastaveném poměru a v průběhu analýzy toto složení mění. Mobilní fáze je pak poháněna vysokotlakým čerpadlem. Objemový průtok mobilní fáze musí být bezpulsní a v širokém rozmezí, od 0,1 až 10,0 ml/min. Čerpadlo vytlačuje mobilní fázi z rezervoárů pomocí membrány nebo pístu. Rozdíl je však v tom, jakým způsobem dochází k rozpočívání pístu a podle toho pak čerpadla rozdělujeme na čerpadla pracující s konstantním tlakem a čerpadla pracující s konstantním objemovým průtokem.

Vzorek je před samotnou analýzou upraven, a to zejména LLE nebo SPE. Tím dochází ke zkoncentrování vzorku, čímž se zvyšuje citlivost detekce, a také dochází k odstranění balastů, čímž se zvyšuje selektivita metody. Vzorek je dále rozpuštěn buď v mobilní fázi, nebo v organickém rozpouštědle z mobilní fáze. Vzorek je dávkován ze skleněné či plastové vialky, která má objem cca 1–2 ml. Jestliže máme k dispozici menší objem vzorku, použijeme inserty o objemu stovek  $\mu\text{l}$ , které se vloží do vialky, aby došlo ke správnému nástřiku.

Vialky se umístí do zásobníku v chromatografu a pomocí autosampleru dochází k dávkování vzorku, nejčastěji v jednotkách či desítkách  $\mu\text{l}$ . Dávkovače využívají dávkovací jehly, šesticestného ventilu a pístu injekční stříkačky. Mobilní fáze neustále protéká přes šesticestný ventil a dávkovač, tím dochází k promytí dávkovací jehly. Při dávkování se změní poloha šesticestného ventilu a píst injekční stříkačky, poháněný krokovým motorem, nasaje požadované množství vzorku do dávkovací jehly. Poté se

opět změni poloha ventilu a vzorek je nastříknut na kolonu s minimálním porušením toku mobilní fáze.

Další nedílnou součástí chromatografu je tzv. předkolona. Je naplněná stejnou stacionární fází jako analytická kolona, je však mnohem kratší a slouží k ochraně a prodlužování životnosti analytické kolony. Analytická kolona spolu s předkolonou jsou umístěny v kolonovém termostatu chromatografu. Nejčastěji je kolona vyrobena z nerezové oceli, aby nedocházelo ke korozi. Kolona bývá nejčastěji 50–150 mm dlouhá a má průměr 3–4,5 mm. Délka kolony má vliv na účinnost i rychlost separace. Delší analytické kolony vedou k delší době analýzy, proto je snaha používat krátké kolony. Separaci také ovlivňuje průměr kolony. Platí, že čím větší průměr kolona má, tím je vyšší průtok mobilní fáze. Kolony s průměrem 2 mm a menší se používají pro separaci, kde je nutná vysoká citlivost. Základním požadavkem na kolonu je její mechanická i chemická odolnost. Kolona se skládá z rovné trubice a koncovky, která zajišťuje těsnost, udržuje uvnitř stacionární fázi a také zajišťuje stejný průtok mobilní fáze v celém prostoru kolony.

Ihned za analytickou kolonou je umístěno detekční zařízení. Detektor zaznamenává jednotlivé odseparované složky a slouží k jejich indikaci, proto musí být schopný rychle reagovat. Je kladen velký důraz na vysokou citlivost, ale také univerzálnost a linearitu detektoru. Dále nesmí být odezva detektoru závislá na složení mobilní fáze. Nejstarším typem detektoru je refraktometrický, ten je však málo citlivý. Nejvíce se v praxi využívá spektrofotometrického detektoru. Dalšími příklady jsou fluorescenční, elektrochemické, vodivostní či chemiluminiscenční detektory. Velmi citlivým a v poslední době hojně využívaným detektorem je hmotnostní detektor, který může poskytnout také spektrální informace o dané látce. Je však poměrně drahý a náročný na údržbu i obsluhu.

Z detektoru dále putují informace do počítačového zařízení, které slouží k řízení celého analytického procesu a ke zpracování dat. Pomocí speciálního softwaru pak zaznamenáváme a vyhodnocujeme dané chromatogramy. [3; 5; 6; 8]



### 3.2.9 Fluorescenční detekce

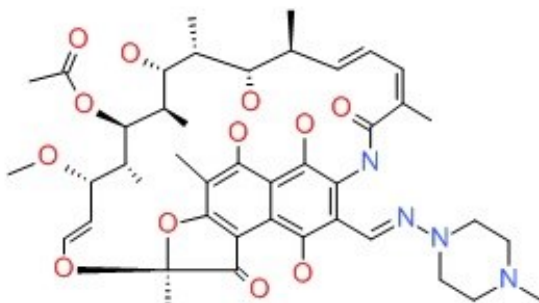
Fluorescence je optický děj založený na emisi sekundárního záření po absorpci primárního záření molekulou analytu. Primární záření se nazývá excitační, sekundární emisní. Jakmile látka absorbuje elektromagnetické záření z UV oblasti dochází k excitaci elektronu ze základního singletového stavu do energeticky vyššího excitovaného singletového stavu. Molekula vlivem srážek s jinými molekulami ztrácí vibrační energii a dostává se na základní vibrační hladinu excitovaného stavu. Při následném přechodu do základního elektronového stavu molekula přebytek energie vydá v podobě záření, které je detekováno. Sekundární záření má nižší energii a tím vyšší vlnovou délku než záření primární.

Zdrojem primárního UV záření bývá rtuťová či xenonová výbojka. Primární záření pak prochází přes monochromátor, který propouští pouze vybranou část spektra podle nastavených vlnových délek. Dále záření prochází přes štěrbinu a dopadá na průtokovou celu, která je zabudovaná v cut-off filtrech. Cut-off filtry redukuje množství emisního záření, které vzniká po rozptylu a odrazu na částicích. Slouží tedy také k přesnému výběru vlnové délky. Průtokovou celou postupně protékají odseparované složky vzorku z kolony a dochází k absorpci primárního záření, excitaci molekuly a následné emisi fluorescenčního záření. Fluorescence je měřena kolmo ke směru primárního záření, prochází přes mikročočky, štěrbinu a monochromátor do fotonásobiče. Fotonásobič detekuje fluorescenci a propojením s počítačem zaznamenáme detekci analytu.

Fluorescenční detektory jsou citlivé a lineární závislost fluorescence na koncentraci analytu platí pouze u nízkých koncentrací. Tato linearita umožňuje stanovení koncentrace analytu. Fluorimetrické detektory jsou také velmi selektivní, což může být považováno za výhodu, ale i nevýhodu. Stanovované látky musejí obsahovat tzv. fluorofory (části molekul zodpovědné za emisi záření). Pokud tyto látky fluorofory neobsahují, musíme je derivatizovat, aby vznikly fluoreskující deriváty. Obecně platí, že schopnost fluoreskovat mají molekuly obsahující systém konjugovaných dvojných vazeb. Při fluorescenční detekci je velmi důležité, aby mobilní fáze byla řádně odplyněná, jelikož kyslík je zhasičem fluorescence. [1; 3; 8]

### 3.3 Rifampicin

RIF (Obr. 3) je makrocyklické antibiotikum získané z bakterie *Amycolaptosis rifamycinica* (dříve pojmenované jako *Streptomyces mediterranei*). Má baktericidní účinek zejména na mykobakterie *Mycobacterium tuberculosis* (způsobující tuberkulózu) a *Mycobacterium leprae* (způsobující lepru). Mechanismem působení tohoto léčiva je blokáda RNA polymerázy bakterií. Při léčbě lepry se RIF kombinuje s dalšími dvěma antibiotiky, a to dapsonem a clofaziminem. Používá se také jako preventivní lék u lidí, kteří se setkali s pacienty trpícími meningitidou způsobenou bakteriemi *Haemophilus influenzae B* a *Neisseria meningitidis*.



Obr. 3: Struktura RIF [10]

*Mycobacterium tuberculosis* je původce infekčního onemocnění tuberkulózy, RIF je tedy jedno z antituberkulotik. Léčba tuberkulózy je zdlouhavá a namáhavá, antituberkulotika se používají téměř vždy v kombinaci. Konkrétně RIF se kombinuje s isoniazidem a pyrazinamidem. Tyto látky jsou však hepatotoxické, proto zde může docházet k poškození jater, které může být až smrtelné. Léčba je také spojená se zvýšenou hladinou bilirubinu a u 10–20 % pacientů také se zvýšenou hladinou aminotransferáz v séru. Mezi nežádoucí účinky u rifampicinové terapie patří horečka, vyrážka, zvracení, nevolnost, nechutenství, bolest kloubů a svalů. Oranžové zbarvení RIF typicky způsobuje také oranžové zbarvení tělesných tekutin, jako moči, potu a slz.

Při léčbě musíme dbát zvýšené opatrnosti na lékové interakce, jelikož RIF je silným induktorem cytochromu P450, což je hlavní jaterní enzym metabolismu 1. fáze xenobiotik. Při léčbě se tedy sleduje jaterní funkce a při její změně dochází k přerušování dávkování. RIF se používá perorálně nebo intravenózně a vylučuje se zejména žlučí.

Molekulová hmotnost RIF je 822,94 a je tedy vhodný pro HPLC analýzu. Jedná se o látku rozpustnou ve vodě, methanolu i ethylacetátu. Maximální absorpce UV záření molekulou RIF nastává při vlnové délce 237, 255, 334 a 475 nm. RIF je nestabilní vůči světlu, teplu a vlhkosti, proto je nutné vzorky uchovávat v lednici. Kapsle tohoto léku je vhodné uchovávat v tmavých obalech při teplotě 15–30 °C a neměly by být vystavovány nadměrnému teplu. [10; 11; 12]

### **3.3.1 Některé práce publikované o chromatografickém stanovení**

#### **Rifampicinu**

RIF byl objeven na přelomu 50. a 60. let 20. století a za tu dobu se stal předmětem mnoha vědeckých prací v oboru analytické chemie. Byla vyvinuta řada chromatografických metod za účelem stanovení RIF pomocí UV detekce.

Například v roce 2003 autoři Mohan, Sharda a Singh [13] testovali tři typy kolon v gradientové HPLC metodě s UV detekcí. Cílem bylo kvantitativní stanovení RIF ve farmaceutických formulacích a také určení schopnosti metody rozlišit hlavní produkty degradace. Bylo zjištěno, že rozlišovací schopnost metody byla mimo jiné závislá na značce separační kolony. Jednou z testovaných kolon byla kolona Zorbax XDB C18, která byla použita v experimentální části této bakalářské práce.

O pět let později byla vyvinuta autory Liu a spol. [14] rychlá, citlivá a reprodukovatelná metoda HPLC-UV využívající monolitickou kolonu Chromolith Performance RP-18e pro analýzu RIF a jeho čtyř příbuzných sloučenin.

V roce 2016 Goutal a spol. [15] vyvinuli HPLC-UV metodu s použitím kolony AtlantisT3®C18. Účelem práce bylo srovnání kinetiky RIF ve venózní a arteriální plazmě u paviánů. Byl prokázán významný arteriovenózní koncentrační gradient v jeho farmakokinetice.

Velmi citlivého stanovení RIF bylo dosaženo pomocí hmotnostních spektrometrů. V roce 2007 publikovali Hartkoon a spol. [16] přesnou metodu kvantifikace RIF v plazmě i mononukleárních buňkách s použitím Betasil Phenyl-Hexyl kolony a MS detekce. V práci Prasada a Singha [17] v roce 2009 bylo identifikováno celkem 21 biotransformačních produktů RIF. Analýza probíhala na koloně Zorbax C18

a byl využit detektor s diodovým polem a hmotnostní detektor spolu s analyzátozem doby letu (UV-DAD a MS/TOF).

V roce 2011 autoři Oswald a spol. [18] stanovovali RIF, klarithromycin a jejich hlavní metabolity na koloně XTerra® MS C18 pomocí MS/MS detekce. Komedikace těchto dvou léků může představovat zvýšené riziko lékových interakcí v organismu, a tím může docházet k nežádoucím účinkům. RIF i klarithromycin byly extrahovány pomocí MTBE. MTBE byl použit jako extrakční činidlo při přípravě biologického vzorku v experimentální části této bakalářské práce.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

#### Chemikálie

- Roztok RIF (připraveno na katedře farmakologie a toxikologie, FaF)
- ACN (VWR Chemicals BDH®)
- NH<sub>4</sub>AC (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o.)
- CH<sub>3</sub>COOH (Erba Lachema, s.r.o.)
- MTBE (Merck spol. s r.o.)
- KI PhEur (RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové)
- Ultra čistá voda (FaF)

#### Kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies)

- Vakuový mikrodegaser
- Binární čerpadlo 1200 SL
- Autosampler 1200 SL plus
- Termostat autosampleru
- TCC cluster tvořený dvěma kolonovými termostaty TCC Infinity 1290 a dvěma osmipozicovými devíticestnými ventily
- Detektor s diodovým polem 1200 SL
- Fluorescenční detektor 1200
- Software: Agilent ChemStation, verze B. 04.02.

#### Kolona

- ZORBAX Eclipse XDB-C18; 50x4,6 mm; Ø1,8 µm

#### Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Sartorius)
- pH metr inoLab 720 (WTW Series)
- Centrifuga (Hermle Z100M)
- Laboratorní třepačka Vibramax 110 (Heidolph)
- Automatické pipety Finnpiquette (Thermo Labsystems)
- Vialky (Agilent Technologies)

- Inerty 300  $\mu\text{l}$  (Agilent Technologies)
- Aparatura pro vakuovou filtraci
- Laboratorní sklo
- Mikrozkušavky, typ Eppendorf

## 4.2 Pracovní postup

### 4.2.1 Příprava octanu amonného pro mobilní fázi

Navážku (0,5788 g)  $\text{NH}_4\text{AC}$  jsem rozpustila v cca 450 ml  $\text{H}_2\text{O}$  v kádince. K úpravě pH jsem použila  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a pomocí pH metru inoLab 720 jsem připravila roztok o pH = 4,0. Roztok jsem přelila do 500 ml odměrné baňky a doplnila po rysku ultra čistou vodou a promíchala. Takto připravenou mobilní fázi o koncentraci 0,015 ml/l jsem vakuovou filtrací zbavila mechanických nečistot a uchovávala v lednici pro další použití.

### 4.2.2 Příprava pracovních roztoků pro experimenty

Měla jsem k dispozici připravený roztok RIF v ACN o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ . Dále jsem při měření pracovala s koncentracemi 10  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$  a 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , které jsem si připravila desetinásobným ředěním.

### 4.2.3 Úprava vzorků biologického materiálu před HPLC

Jelikož biologický materiál tvoří komplexní matici, je nutné před vlastní HPLC takový vzorek upravit. V této práci jsem pracovala s buněčnou tekutinou obsahující RIF. Vzorek jsem upravovala LLE: V mikrozkušavce Eppendorf jsem smíchala 200  $\mu\text{l}$  buněčné tekutiny se 100  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (50 mmol/l; pH = 5,5) a se 300  $\mu\text{l}$  MTBE. Zkušavka byla poté 10 min. třepána pomocí mechanické třepačky Vibramax 110 a následně 3 min. odstředována na centrifuze Hermler Z100M. MTBE vrstva byla odebrána pipetou do čisté mikrozkušavky a MTBE ponechán odpařit v digestoři. Odparek byl rekonstituován 100  $\mu\text{l}$  mobilní fáze a převeden do vialky s inzertem.

#### 4.2.4 Chromatografické podmínky

V rámci analýzy RIF pomocí HPLC byly postupně měněny chromatografické podmínky pro získání co nejvíce informací o chování RIF v HPLC. Získané optimální podmínky analýzy byly využity pro stanovení RIF v biologickém materiálu.

Nejdříve byly měřeny všechny koncentrace RIF v režimu isokratické eluce s nástřikem 20  $\mu$ l,  $F_m$  0,5 ml/min a při teplotě kolony 25 °C. V každém měření byl zvyšován podíl organické složky mobilní fáze – ACN. Druhou složkou mobilní fáze byla ultra čistá voda.

Dále byl využit  $\text{NH}_4\text{Ac}$  jako složka mobilní fáze místo vody. Opět analýza probíhala u všech koncentrací RIF v režimu isokratické eluce s nástřikem 20  $\mu$ l,  $F_m$  0,5 ml/min a při teplotě 25 °C. Docházelo k obdobnému zvyšování méně polární složky v každém měření.

Následně byl zkoumán nástřik vzorku na kolonu za účelem zjistit, jaký největší možný objem RIF je kolona schopna změřit. Nástřik vzorku byl postupně zvyšován o 20  $\mu$ l. Počáteční nástřik byl 20  $\mu$ l a koncový 100  $\mu$ l. Složení mobilní fáze bylo konstantní, a to 35 %  $\text{H}_2\text{O}$  a 65 % ACN. Měření se provádělo u nejvyšší a nejnižší koncentrace RIF, s  $F_m$  0,5 ml/min a při teplotě 25 °C.

Jako další byla zkoumána separace gradientovou elucí u vzorků s koncentrací 1  $\mu$ mol/l, 10  $\mu$ mol/l a 100  $\mu$ mol/l. Prvních pět minut bylo složení mobilní fáze nastaveno na 45 %  $\text{H}_2\text{O}$  a 55 % ACN. Poté se na dalších pět minut složení změnilo a došlo ke zvýšení poměru ve prospěch organické složky, tedy na 15 %  $\text{H}_2\text{O}$  a 85 % ACN. Posledních pět minut docházelo k vyrovnání složení mobilní fáze opět na 45 %  $\text{H}_2\text{O}$  a 55 % ACN. Nástřik byl 20  $\mu$ l,  $F_m$  0,5 ml/min a teplota kolony 25 °C. Gradientová eluce byla také použita pro měření mrtvého času, kalibrace a u analýzy biologických vzorků.

Pro gradientovou eluci byly nalezeny tyto detekční podmínky:  $\lambda_{\text{ex}} = 234 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 394 \text{ nm}$ .

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Použitá složení mobilní fáze

Při práci v isokratickém modu byla nejdříve použita mobilní fáze složená z ACN a vody. Každý roztok o dané koncentraci byl měřen 4x, vždy s jiným procentuálním složením mobilní fáze. Při zvyšování podílu organické složky mobilní fáze docházelo ke zkracování  $t_R$ , které jsou zahrnuty v tab. 2–5. Tabulka 5 také poukazuje na to, že při zvyšování podílu ACN byly zaznamenány  $t_R$  i u nejnižší koncentrace RIF.

Mobilní fáze	$t_R$ [min]
45 % H <sub>2</sub> O, 55 % ACN	20,1
40 % H <sub>2</sub> O, 60 % ACN	14,5
35 % H <sub>2</sub> O, 65 % ACN	10,1
15 % H <sub>2</sub> O, 85 % ACN	3,4

Tabulka 2: Hodnoty  $t_R$  RIF o  $c = 100 \mu\text{mol/l}$  pro dané složení mobilní fáze

Mobilní fáze	$t_R$ [min]
45 % H <sub>2</sub> O, 55 % ACN	20,1
40 % H <sub>2</sub> O, 60 % ACN	14,4
35 % H <sub>2</sub> O, 65 % ACN	10,1
15 % H <sub>2</sub> O, 85 % ACN	3,5

Tabulka 3: Hodnoty  $t_R$  RIF o  $c = 10 \mu\text{mol/l}$  pro dané složení mobilní fáze

Mobilní fáze	$t_R$ [min]
45 % H <sub>2</sub> O, 55 % ACN	21,1
40 % H <sub>2</sub> O, 60 % ACN	14,4
35 % H <sub>2</sub> O, 65 % ACN	10,1
15 % H <sub>2</sub> O, 85 % ACN	3,5

Tabulka 4: Hodnoty  $t_R$  RIF o  $c = 1 \mu\text{mol/l}$  pro dané složení mobilní fáze



<b>Mobilní fáze</b>	<b>t<sub>R</sub> [min]</b>
45 % H <sub>2</sub> O, 55 % ACN	X
40 % H <sub>2</sub> O, 60 % ACN	14,4
35 % H <sub>2</sub> O, 65 % ACN	10,1
15 % H <sub>2</sub> O, 85 % ACN	3,5

Tabulka 5: Hodnoty t<sub>R</sub> RIF o c = 0,1 μmol/l pro dané složení mobilní fáze

Dále byla použita jako mobilní fáze směs ACN a NH<sub>4</sub>Ac. Opět byly roztoky o různých koncentracích měřeny 4x a docházelo k obdobnému zvyšování podílu méně polární složky mobilní fáze jako v předchozích pokusech, což vedlo také ke zkracování t<sub>R</sub> (tab. 6–9).

<b>Mobilní fáze</b>	<b>t<sub>R</sub> [min]</b>
45 % NH <sub>4</sub> Ac, 55 % ACN	21,3
40 % NH <sub>4</sub> Ac, 60 % ACN	14,2
35 % NH <sub>4</sub> Ac, 65 % ACN	10,2
15 % NH <sub>4</sub> Ac, 85 % ACN	3,3

Tabulka 6: Hodnoty t<sub>R</sub> RIF o c = 100 μmol/l pro dané složení mobilní fáze

<b>Mobilní fáze</b>	<b>t<sub>R</sub> [min]</b>
45 % NH <sub>4</sub> Ac, 55 % ACN	21,0
40 % NH <sub>4</sub> Ac, 60 % ACN	14,3
35 % NH <sub>4</sub> Ac, 65 % ACN	10,1
15 % NH <sub>4</sub> Ac, 85 % ACN	3,5

Tabulka 7: Hodnoty t<sub>R</sub> RIF o c = 10 μmol/l pro dané složení mobilní fáze

<b>Mobilní fáze</b>	<b>t<sub>R</sub> [min]</b>
45 % NH <sub>4</sub> Ac, 55 % ACN	21,0
40 % NH <sub>4</sub> Ac, 60 % ACN	14,3
35 % NH <sub>4</sub> Ac, 65 % ACN	10,1
15 % NH <sub>4</sub> Ac, 85 % ACN	3,4

Tabulka 8: Hodnoty t<sub>R</sub> RIF o c = 1 μmol/l pro dané složení mobilní fáze

Mobilní fáze	$t_R$ [min]
45 % NH <sub>4</sub> Ac, 55 % ACN	20,8
40 % NH <sub>4</sub> Ac, 60 % ACN	14,3
35 % NH <sub>4</sub> Ac, 65 % ACN	10,0
15 % NH <sub>4</sub> Ac, 85 % ACN	3,4

Tabulka 9: Hodnoty  $t_R$  RIF o  $c = 0,1 \mu\text{mol/l}$  pro dané složení mobilní fáze

Z hodnot vyplývá, že pro obě varianty mobilní fáze vycházely  $t_R$  pro určitá složení mobilní fáze téměř shodně.

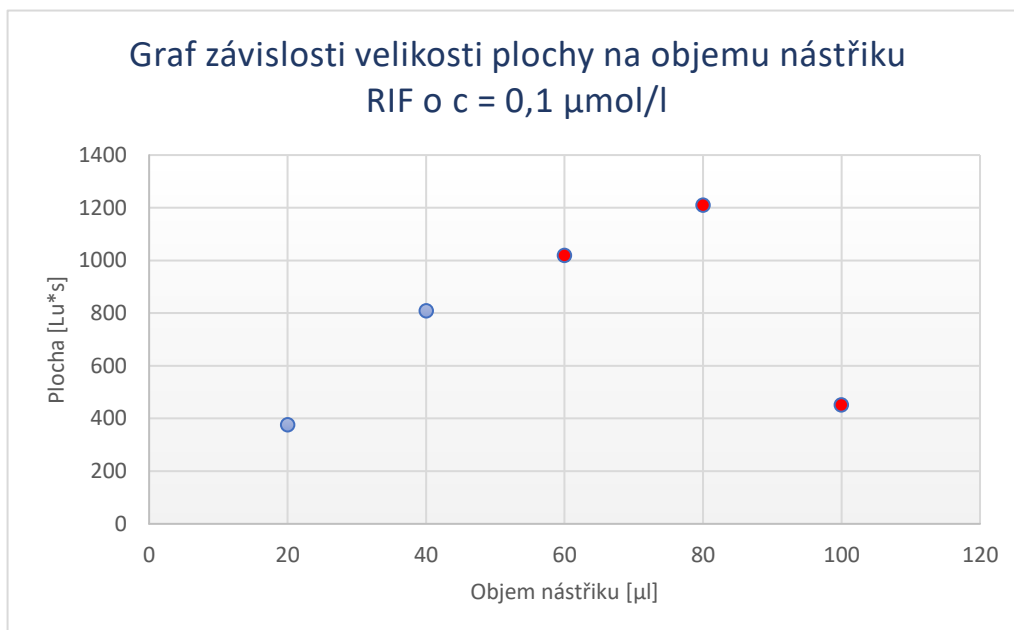
## 5.2 Testování možné velikosti nástřiku

Při testování nejvyššího možného objemu nástřiku vzorku na kolonu byla použita mobilní fáze složená z 35 % H<sub>2</sub>O a 65 % ACN. Byly použity pracovní roztoky RIF o koncentracích 0,1  $\mu\text{mol/l}$  a 100  $\mu\text{mol/l}$ .

Pro koncentraci 0,1  $\mu\text{mol/l}$  byly zjištěny hodnoty  $A$  v závislosti na objemu nástřiku vzorku. Tyto údaje jsou zahrnuty v tab. 10. Z grafu 1 je patrné, že do objemu nástřiku přibližně 50  $\mu\text{l}$  platila mezi těmito dvěma veličinami lineární závislost. Nad touto hodnotou přestala být závislost lineární. Nejvyšším možným nástřikem pro koncentraci RIF 0,1  $\mu\text{mol/l}$  je tedy patrně 50  $\mu\text{l}$ .

Nástřik [ $\mu\text{l}$ ]	$t_R$ [min]	$A$ [Lu*s]
20	10,2	376
40	10,1	808
60	10,0	1 019
80	10,0	1 209
100	10,0	451

Tabulka 10: Hodnoty  $t_R$  a  $A$  RIF o  $c = 0,1 \mu\text{mol/l}$  pro daný nástřik

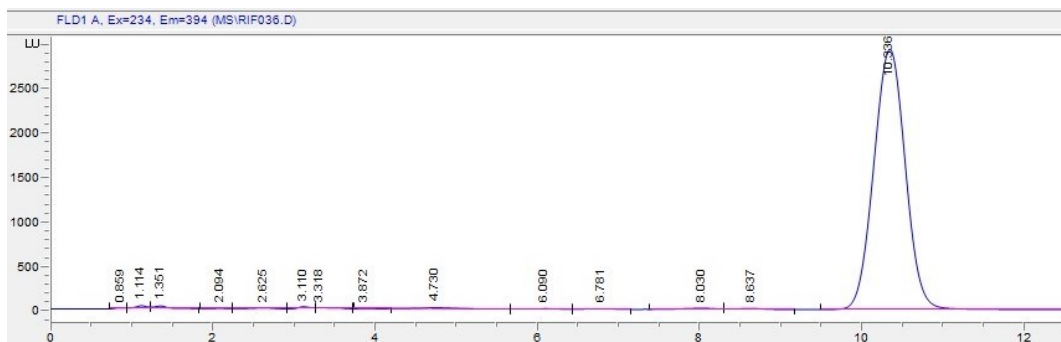


Graf 1: Závislost velikosti A na objemu nástřiku pro c = 0,1 μmol/l

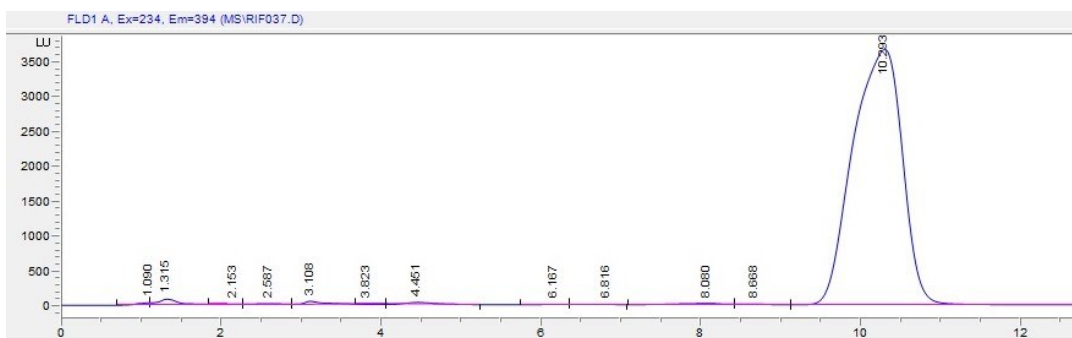
Pro koncentraci RIF 100 μmol/l byly také zjištěny hodnoty A v závislosti na objemu nástřiku vzorku (tab. 11). Při zvyšování nástřiku o 20 μl docházelo k postupnému rozmývání píku, což je patrné z přiložených chromatogramů (Obr. 4–8). Z tabulky 11 a obr. 4–8 je vidět, že nejvyšší možný nástřik RIF o koncentraci 100 μmol/l byl patrně 20 μl.

Nástřik [μl]	t <sub>R</sub> [min]	A [Lu*s]
20	10,3	8 * 10 <sup>4</sup>
40	10,3	2 * 10 <sup>5</sup>
60	10,3	2 * 10 <sup>5</sup>
80	10,4	1 * 10 <sup>5</sup>
100	10,4	1 * 10 <sup>5</sup>

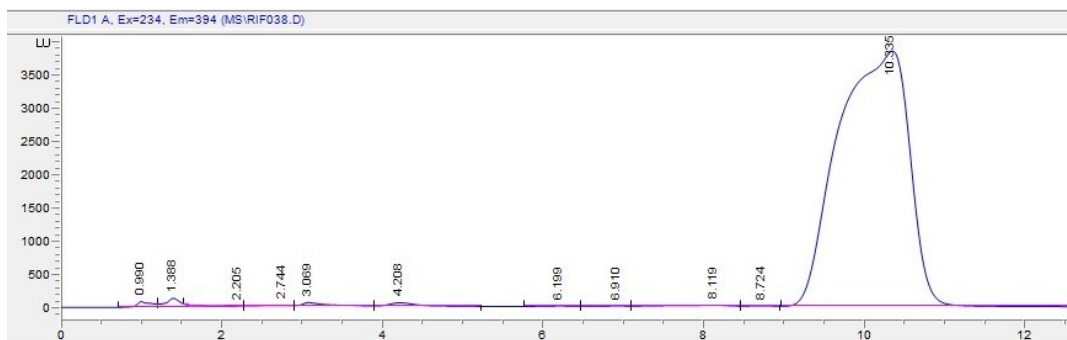
Tabulka 11: Hodnoty t<sub>R</sub> a A RIF o c = 100 μmol/l pro daný nástřik



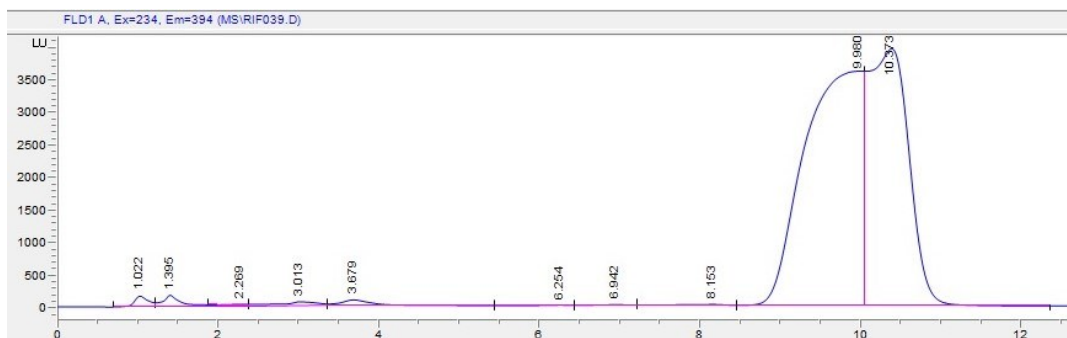
Obr. 4: Chromatografický záznam analýzy RIF, nástřik 20  $\mu\text{l}$ ,  $c = 100 \mu\text{mol/l}$



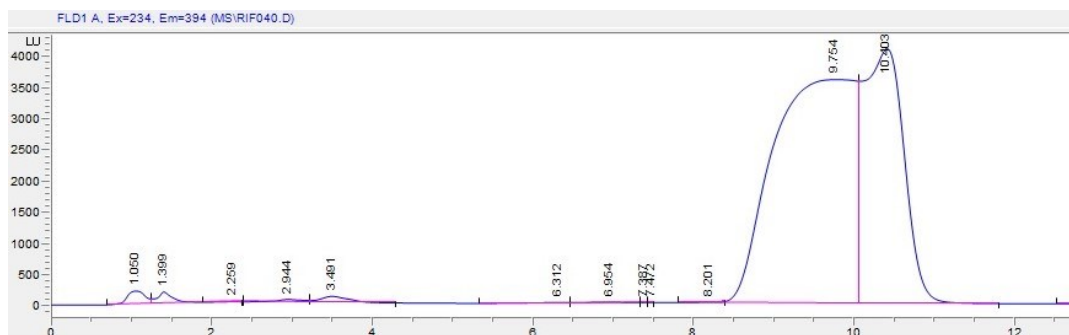
Obr. 5: Chromatografický záznam analýzy RIF, nástřik 40  $\mu\text{l}$ ,  $c = 100 \mu\text{mol/l}$



Obr. 6: Chromatografická záznam analýzy RIF, nástřik 60  $\mu\text{l}$ ,  $c = 100 \mu\text{mol/l}$



Obr. 7: Chromatografický záznam analýzy RIF, nástřik 80  $\mu\text{l}$ ,  $c = 100 \mu\text{mol/l}$



Obr. 8: Chromatografický záznam analýzy RIF, nástřik 100  $\mu\text{l}$ ,  $c = 100 \mu\text{mol/l}$

### 5.3 Stanovení mrtvého retenčního času

Pomocí roztoku KI byl zjištěn  $t_0$ , který odpovídá 0,951 min. Měření probíhalo gradientovou elucí. Průběh gradientové eluce je popsán v kapitole 4.2.4.

### 5.4 Gradientová eluce

K použití gradientové eluce bylo přikročeno ve snaze zlepšit citlivost detekce snížením polarity mobilní fáze, v níž je analyt detekován. Průběh gradientové eluce je popsán v kapitole 4.2.4. Byly použity pracovní roztoky o koncentracích 100  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  a 1  $\mu\text{mol/l}$ . Byl zjištěn  $t_R$  RIF (tab. 12) v režimu gradientové eluce, který odpovídá 8,1 min. Zjištění  $t_R$  RIF v modu gradientové eluce bylo nezbytné pro následující analýzu biologických vzorků.

Koncentrace RIF [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$t_R$ [min]
100	7,9
10	8,1
1	8,1

Tabulka 12: Hodnoty  $t_R$  RIF pro danou koncentraci v režimu gradientové eluce

## 5.5 Analýza biologických vzorků

Byly vyžádány 4 biologické vzorky neznámé koncentrace. Jejich analýza probíhala gradientovou elucí a každý vzorek byl měřen 3x. V prvním měření byl nástřik vzorku 20  $\mu\text{l}$  (tab. 13). Ve druhém měření byl nástřik také 20  $\mu\text{l}$ , avšak vzorek byl zpracován dvakrát LLE (tab. 14). V posledním měření byl nástřik zvýšen na 60  $\mu\text{l}$  (tab. 15).

Pro každé měření platil  $F_m$  0,5 ml/min a teplota kolony 25 °C. Je vidět, že při nástřiku 60  $\mu\text{l}$  je kolona zahlcena analytem. Dvojitá LLE zlepšuje výtěžnost analytu z matrice, ale trpí přesnost stanovení, neboť plochy při dvojitá LLE jsou různými násobky ploch při extrakci jednoduché.

- nástřik 20  $\mu\text{l}$

Vzorek	$t_R$ [min]	A [Lu*s]
č. 1	8,1	541
č. 2	8,1	588
č. 3	8,1	198
č. 4	8,1	162

Tabulka 13: Hodnoty  $t_R$  a A RIF pro daný biologický vzorek

- nástřik 20  $\mu\text{l}$ , dvojitá LLE

Vzorek	$t_R$ [min]	A [Lu*s]
č. 1	8,1	259
č. 2	8,1	242
č. 3	8,1	122
č. 4	8,1	355

Tabulka 14: Hodnoty  $t_R$  a A RIF pro daný biologický vzorek

- nástřik 60  $\mu$ l

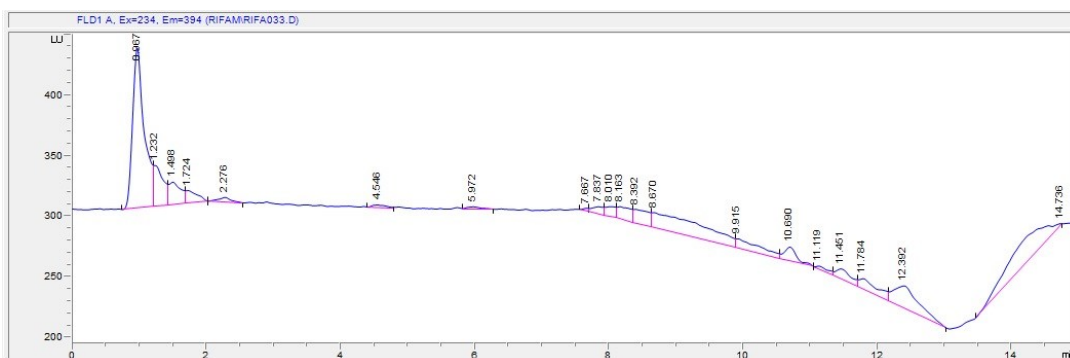
Vzorek	$t_R$ [min]	A [Lu*s]
č. 1	8,1	480
č. 2	8,1	944
č. 3	8,1	667
č. 4	8,1	561

Tabulka 15: Hodnoty  $t_R$  a A RIF pro daný biologický vzorek

U všech chromatogramů biologických vzorků je v čase 8,1 min pík vypovídající o přítomnosti RIF.

## 5.6 Slepý vzorek

Nástřik slepého vzorku byl proveden v režimu gradientové eluce. Slepým vzorkem byl rekonstituovaný extrakt (viz kap. 4.2.3) buněčné tekutiny, která neobsahovala RIF. V  $t_R$  RIF (8,1 min) se v chromatogramu (Obr. 9) slepého vzorku neobjevil žádný pík. Tím bylo dokázáno, že v biologické matrici není přítomna žádná balastní látka, která by s RIF interferovala a znehodnocovala jeho stanovení. Byla prokázána selektivita metody.



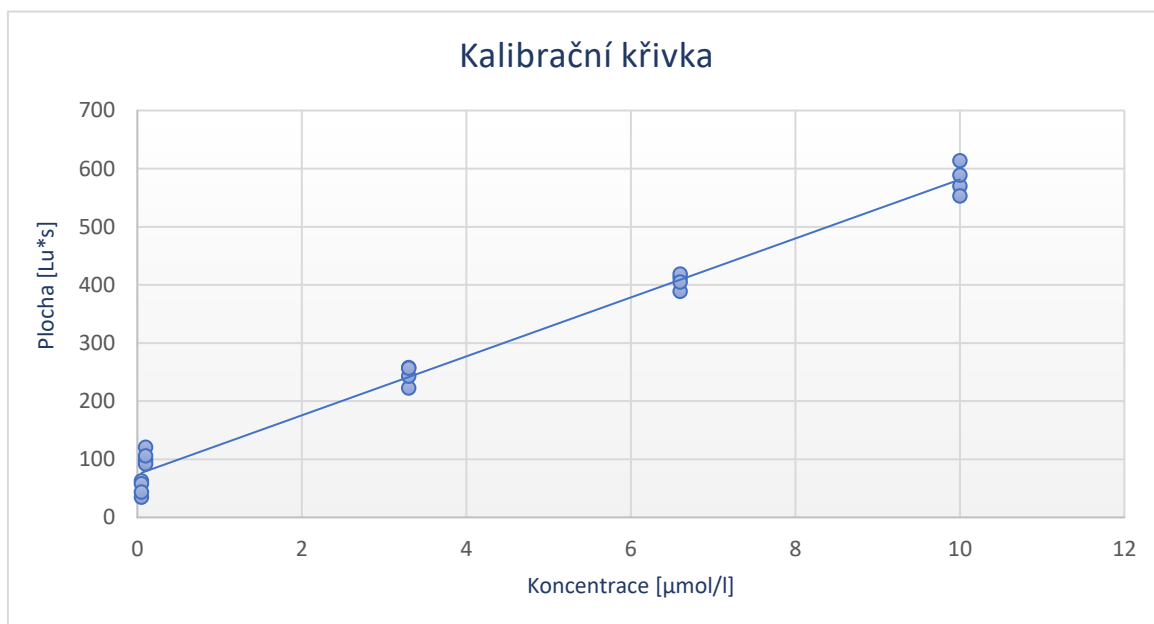
Obr. 9: Chromatografický záznam analýzy slepého vzorku

## 5.7 Kalibrační přímka

Kalibrační přímka byla měřena v režimu gradientové eluce za použití kalibračních roztoků s koncentracemi 0,05  $\mu\text{mol/l}$ ; 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ; 3,3  $\mu\text{mol/l}$ ; 6,6  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ , vždy ve čtyřech replikátech. Nástřik kalibračních vzorků byl 20  $\mu\text{l}$ ,  $F_m$  0,5 ml/min a teplota kolony 25  $^\circ\text{C}$ . V tab. 16 jsou uvedeny hodnoty A pro jednotlivé koncentrace. Graf 2 znázorňuje kalibrační křivku, dále je uvedena rovnice křivky a koeficient determinace  $R^2$ .

Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	A [ $\text{Lu}^*\text{s}$ ]			
	Měření č. 1	Měření č. 2	Měření č. 3	Měření č. 4
0,05	35	63	58	44
0,1	121	99	92	106
3,3	223	243	258	257
6,6	413	419	389	405
10	570	589	553	614

Tabulka 16: Hodnoty A RIF pro dané koncentrace kalibračních vzorků



Graf 2: Závislost plochy na koncentraci – kalibrační křivka

- Rovnice kalibrační křivky:  $y = 50,705x + 74,224$
- Korelační koeficient:  $R^2 = 0,9873$



## 5.8 Stanovení limitu kvantifikace

LOQ (limit of quantification), neboli mez stanovitelnosti, představuje nejmenší koncentraci analytu, kterou lze analytickou metodou stanovit s dohodnutou přesností. Dle FDA (U.S. Food and Drug Administration) [19] je dohodnutá přesnost pro LOQ nejvýše 20 %. Tato přesnost se udává jako variační koeficient (též relativní směrodatná odchylka) v %. Vypočítá se pro jednotlivé koncentrace jako stonásobek podílu směrodatné odchylky a průměrné hodnoty plochy píku (Tabulka 17). Jestliže je přesnost >20 %, daná hladina již je pod LOQ. K výpočtu LOQ byly použity hodnoty získané při měření kalibrační přímky.

Koncentrace kalibračních vzorků [μmol/l]	Průměrná hodnota A [Lu*s]	Směrodatná odchylka	Přesnost stanovení [%]
0,05	50	11,113	22,2
0,1	104,5	10,735	10,3
3,3	245,25	14,149	5,8
6,6	406,5	11,258	2,8
10,0	581,5	22,677	3,9

Tabulka 17: Hodnoty přesnosti stanovení pro dané koncentrace kalibračních vzorků

Koncentrační hladina 0,05 μmol/l již nevyhovuje stanovení. LOQ je tedy 0,1 μmol/l.

## 7. ZÁVĚR

V této práci byly testovány chromatografické podmínky pro stanovení RIF v biologické matrici se zaměřením na maximalizaci citlivosti fluorescenční detekce při použití krátké HPLC kolony s nízkou zrnitostí částic stacionární fáze. Ukázalo se, že při použití takové kolony je objem nástřiku limitujícím faktorem.

Mezi několika různými testovanými chromatografickými podmínkami byla pro další zkoumání vybrána gradientová eluce, protože při této eluci přichází na detektor mobilní fáze s relativně nízkou polaritou, což zesiluje intenzitu fluorescence a přispívá tím ke zvýšení citlivosti detekce. Ze stejných důvodů bylo výhodou použití H<sub>2</sub>O namísto roztoku soli.

Byla naměřena kalibrační přímka a vytyčen limit kvantifikace. Za nejmenší možnou stanovitelnou koncentraci byla určena hodnota 0,1 μmol/l. To je dosti nízká hodnota, která je ovšem, bohužel, na horní hranici požadovaného rozmezí stanovitelných koncentrací. Hodnotu nelze srovnat s nějakou hodnotou literární, protože odbornou práci, která by používala fluorescenční detekci ke stanovení RIF, se nepodařilo nalézt. Autoři prací zahrnutých do mé rešerše spoléhají buď na UV detekci [13], [14], [15], [17] nebo na detekci MS [16], [17], [18].

Tato práce ukazuje, že lze nalézt HPLC metodu s vysokou citlivostí fluorescenční detekce. Tato vysoká citlivost však v tomto případě není dostatečná pro požadovaný účel.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [2] KARLÍČEK R, a kolektiv. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [3] NOVÁKOVÁ L, DOUŠA M, a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [4] QUINTIN T J. *Chromatography: Types, Techniques and Methods*. New York: Nova Science Publishers, 2010. ISBN 978-1-61761-912-0
- [5] DONG M W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. USA: Wiley, 2019. ISBN 9781119313793.
- [6] WESTON A, BROWN P R. *HPLC and CE: Principles and Practice*. USA: Academic Press, 1997. ISBN 978-0-12-136640-5.
- [7] McMASTER M. C. *HPLC a Practical User's Guide*. Canada: Wiley, 2007. ISBN 978-0-471-75401-5
- [8] CHURÁČEK J, JANDERA P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984, 188 s.
- [9] PACÁKOVÁ V, ŠTULÍK K. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 144 s.
- [10] LiverTox: *Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-.Rifampin. [Updated 2018 Jun 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548314/>
- [11] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 137287990, *Rifampicin,(S)*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/137287990>.

- [12] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Annotation Record for *RIFAMPIN*, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3181>.
- [13] Mohan B, Sharda N, Singh S. *Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin*. J Pharm Biomed Anal. 2003 Mar 10;31(3):607-12. doi: 10.1016/s0731-7085(02)00715-x. PMID: 12615251.
- [14] LIU J, SUN J, ZHANG W, GAO K, HE Z. *HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column*. J Pharm Biomed Anal. 2008 Jan 22;46(2):405-9. doi: 10.1016/j.jpba.2007.10.025. Epub 2007 Oct 25. PMID: 18055155.
- [15] GOUTAL S, AUVITY S, LEGRAND T, HAUQUIER F, CISTERNINO S, CHAPY H, SABA W, TOURNIER N. *Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient*. J Pharm Biomed Anal. 2016 May 10;123:173-8. doi: 10.1016/j.jpba.2016.02.013. Epub 2016 Feb 15. PMID: 26907700.
- [16] HARTKOORN RC, KHOO S, BACK DJ, TJIA JF, WAITT CJ, CHAPONDA M, DAVIES G, ARDREY A, ASHLEIGH S, WARD SA. *A rapid and sensitive HPLC-MS method for the detection of plasma and cellular rifampicin*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Sep 15;857(1):76-82. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.07.005. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17643357.
- [17] PRASAD B, SINGH S. *In vitro and in vivo investigation of metabolic fate of rifampicin using an optimized sample preparation approach and modern tools of liquid chromatography-mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal. 2009 Oct 15;50(3):475-90. doi: 10.1016/j.jpba.2009.05.009. Epub 2009 May 22. PMID: 19535209.
- [18] OSWALD S, PETERS J, VENNER M, SIEGMUND W. *LC-MS/MS method for the simultaneous determination of clarithromycin, rifampicin and their main metabolites in horse plasma, epithelial lining fluid and broncho-alveolar cells*. J Pharm Biomed Anal. 2011 Apr 28;55(1):194-201. doi: 10.1016/j.jpba.2011.01.019. Epub 2011 Jan 22. PMID: 21310577.

[19] *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. U.S. Food and Drug Administration [online]. May 2018. Dostupné z:  
<https://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>