

1. ÚVOD

Mezi dnes využívanými moderními analytickými metodami zaujímá kapalinová chromatografie přední místo. Její uplatnění je velmi rozsáhlé, umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu prakticky veškerých organických látek.

Pro moderní analytické metody je charakteristická vysoká citlivost, rychlost, vysoká selektivita a snížený vliv faktorů lidské obsluhy.

V klinické praxi bývá kapalinová chromatografie využívána k analýzám nejrůznějších komponent v tělních tekutinách, hormonů, steroidů, léčiv a jejich metabolitů. V biologii a biochemii slouží k analýzám bílkovin a nukleových kyselin.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie nachází uplatnění při terapeutickém monitorování léčiv a napomáhá tak správnému používání léků, tj. rychlému dosažení účinku a zvýšení bezpečnosti léčby, na základě změřené koncentrace léčiv se provádí individuální úprava dávkování léčiv.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Princip chromatografie

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují, separují složky obsažené ve vzorku a současně lze jednotlivé složky hodnotit. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek je vnesen na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované.¹⁾

2.2 Rozdělení chromatografických metod^{1),2)}

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

Podle skupenství mobilní fáze

- Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography –LC) – mobilní fází je kapalina
- Plynová chromatografie (Gas Chromatography) – mobilní fází je plyn

Podle uspořádání stacionární fáze

- Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
- Plošné techniky:
 - Papírová chromatografie (Paper Chromatography-PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové folii)

Podle povahy děje, který převládá při separaci

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

- Rozdělovací chromatografie-o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fází (kapalina nebo plyn)
- Adsorpční chromatografie-o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze(tuhá látka)
- Ionově- výměnná chromatografie-o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku
- Gelová chromatografie-složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu),menší molekuly vzorku se v pórech zdržují déle (molekulově-síťový efekt)
- Afinitní chromatografie-stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky,ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu)

Podle způsobu zavádění vzorku na kolonu a podle eluční síly mobilní fáze

- Frontální chromatografie-vzorek se zavádí na kolonu kontinuálně,tj. rozpuštěn v mobilní fázi.V čistém stavu lze získat pouze nejslaběji sorbovanou složku.
- Vytěšňovací chromatografie-vzorek se zavádí na kolonu diskontinuálně a používá se mobilní fáze s větší schopností sorbovat se stacionární fází,než jakou mají složky vzorku,které jsou proto úplně vytěšňovány ze stacionární fáze a vycházejí z kolony před čelem silně se sorbující složky mobilní fáze
- Eluční chromatografie-vzorek se zavádí diskontinuálně a jeho složky jsou na koloně silněji sorbovány než molekuly mobilní fáze,takže látky jsou z kolony eluovány v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fázi a jsou od sebe odděleny mobilní fází.Tímto způsobem se dosáhne nejlepšího rozdělení vzorku.Mění-li se složení mobilní fáze s časem,jde o tzv. *gradientovou eluci* .Z polohy maxima elučního píku látky se usuzuje na velikost interakce látky s chromatografickým systémem,tj. se stacionární a mobilní fází,a současně se využívá polohy maxima píku k identifikaci látky a k výpočtu řady elučních charakteristik.

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-High Performance Liquid Chromatography je separační metoda, při které dochází k oddělení složek analyzované směsi na koloně naplněné sorbentem v důsledku jejich nestejně rychlého putování (migrace) v soustavě dvou fází.

Základy vlastní kapalinové kolonové chromatografie položil nesporně botanik M.S. Cvět.²⁾ Technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla vyvinuta v letech 1970-1979: Halasz, Horvath, Kirkland a spol., Regnier a spol. V letech 1980-1989 nová média s vyšší mechanickou odolností umožňují použití vyšších tlaků pro separaci.³⁾

HPLC je možné použít k analýze vysokomolekulárních a biochemicky významných látek, zejména ve farmaceutickém průmyslu, klinické chemii a biochemii.²⁾

Požadavky na HPLC a jejich řešení

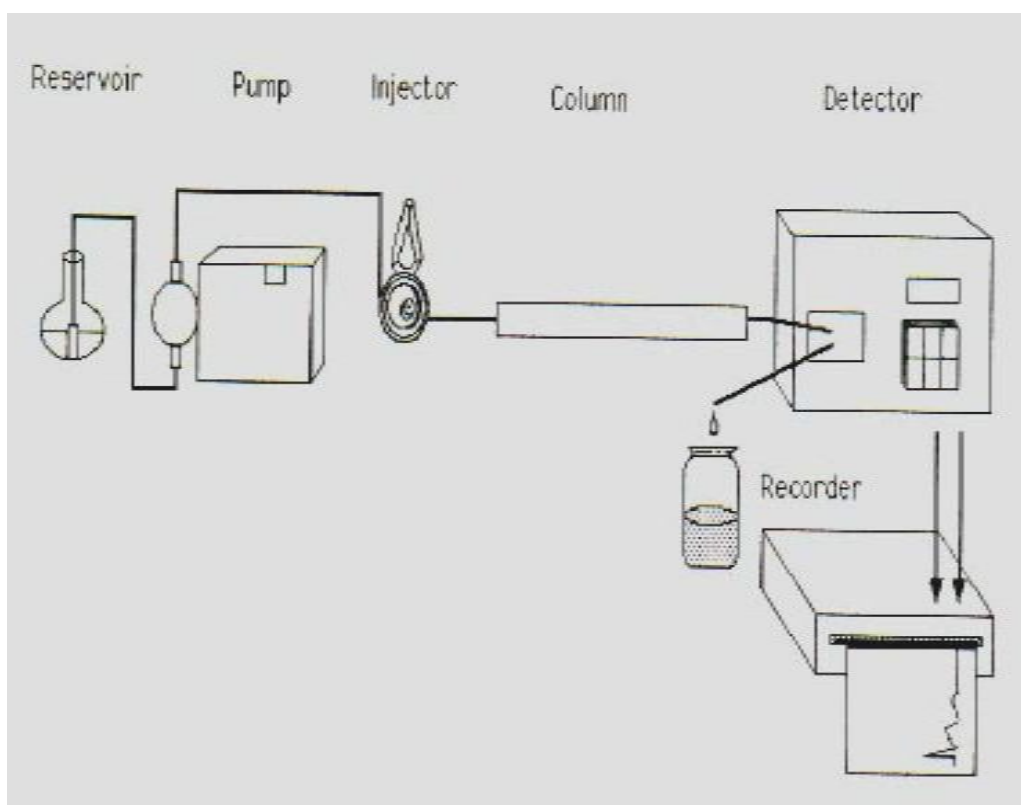
- Kolony plněné velmi jemnými částicemi sorbentu
- Vysoké průtoky mobilní fáze
- Použití vysokotlakých čerpadel
- Použití kontinuálních detektorů
- Použití dávkovacích systémů
- Použití nových druhů chromatografických sorbentů

Výhody HPLC

- Rychlost
- Účinnost
- Automatizovatelnost
- Snadná kvantifikovatelnost výsledků
- Reprodukovatelnost

2.3.1 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno zařazení základních elementů za sebou, i když lze mnohé při speciálních měřeních buď vynechat, nebo naopak přidat.²⁾



Obrázek 1: Blokové schéma kapalinového chromatografu³⁾

Zásobníky mobilní fáze²⁾

Zásobníky mobilní fáze jsou skleněné nebo nerezové nádoby o obsahu zpravidla do dvou litrů. Mobilní fáze je (při izokratické eluci) vedena buď z jednoho ze zásobníků, anebo (při gradientové eluci) se přiváděné proudy ze dvou i více zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném buď před, nebo za vysokotlakým čerpadlem. Spoje zásobníků mobilní fáze

s odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem mohou být zhotoveny jak z plastu, jako je polytetrafluorethylen, tak i z trubiček z nerezové oceli.

Vysokotlaká čerpadla a tlumiče pulzů^{1),2),4)}

Čerpadla musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze. Všechny části čerpadla, které jsou ve styku s mobilní fází, musí být zhotoveny z takových materiálů, aby nedocházelo ke kontaminaci mobilní fáze nebo ke korozi těchto částí. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru.

Kapalina se do kolony čerpá *pístovými* nebo *membránovými čerpadly*. Dobré čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním při průtoku při tlaku až 35 MPa. Jednočinné pístové čerpadlo by způsobovalo rušivé rázy. Proto jsou používána dvojitá čerpadla, v sérii zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou nebo více pístů. Řízení čerpadla mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulsů.

Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělována na *pulsní* a *bezpulsní*. Pulsní čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý a potřebného průtoku se dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory čerpadla. Bepulsní čerpadla pracují s objemem pracovní komory daleko větším, 100 až 500 ml, což umožňuje provést bez opětovného plnění čerpadla řadu analýz. Poskytují hladší průtok mobilní fáze, avšak přesnost tvorby gradientu mobilní fáze je horší.

Dávkovací systémy²⁾

Vzorek, který se má chromatograficky rozdělit, se nejprve dokonale rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi. Účinnost celého chromatografického systému je do značné míry závislá i na dokonalém dávkování vzorku. Dávkovací systém totiž přispívá k celkovému rozšiřování elučního píku, a tím ke snížení účinnosti celého systému.

Dávkování systémy na principu vysokotlakých dávkovacích ventilů: Tímto způsobem lze dávkovat proti tlakům 60 až 80 MPa, nelze však měnit dávkovaný objem - je dán rozměry vnitřního prostoru ventilu. Analogický způsob však umožňuje dávkování různých objemů vzorku zařazením smyčky umístěné mimo vlastní tělo ventilu.

Dávkování vzorků pomocí autosamplerů: Autosampler je automatický dávkovač, který se vyznačuje vysokou přesností dávkování a umožňuje dávkovat řadu vzorků bez jakékoliv manipulace s přístrojem.

Chromatografické kolony^{1),2),5)}

Volba a výběr kolon mají rozhodující význam. Účinnost kolony závisí na kvalitě použitého sorbentu, délce kolony, tvaru, materiálu z něhož je zhotovena, vnitřním povrchu, spojovacích součástech a na různých dalších faktorech.

Z materiálů na výrobu kolon se nejlépe osvědčila nerezová ocel, skleněné kolony jsou tlustostěnné trubice z borosilikátového skla odolávající i silně kyselým roztokům, které se často užívají při chromatografii na měničích iontů. Kolony zhotovené z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen tenkou vrstvou skla, spojují dobré vlastnosti a mechanickou odolnost kovových kolon s chemickou odolností skleněných kolon.

Délka kolony závisí na materiálu, jímž je naplněna a na tom, kolika teoretických pater je zapotřebí k separaci dané směsi látek. Platí, že čím je zrnění sorbentu menší, tím je kolona kratší. Čím je kolona kratší, tím větší je pravděpodobnost, že bude kvalitně naplněna. Při velikosti částic sorbentu do 15 μm bývá kolona 10 až 30 cm dlouhá. Pro analytické použití mají kolony zpravidla 10, 15 nebo 25 cm.

Vnitřní průměr bývá 2 až 8 mm. Náplň kolony z jemně zrněného sorbentu musí být nanejvýš rovnoměrná. Je účelné používat kolony plněné a testované výrobcem.

Velikost částic náplně se pohybuje od 1 do 10 μm , nejčastěji 3,5 μm .

Typy náplní chromatografických kolon (stacionární fáze)

Na bázi silikagelu

Hybridní (kombinace silikagelu s polymerním materiálem)

Na bázi oxidu zirkoničitého

Polymerní

Na bázi porézního grafitického karbonu

Monolitické (monolitní porézní materiál)

Pro HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

Polární sorbenty (v systému s normálními fázemi)

Nepolární sorbenty (v systému s obrácenými fázemi)

Středně polární sorbenty

Detektory^{2),5),6)}

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Zpravidla se od nich vyžaduje, aby sledovaly koncentraci separovaných složek v eluátu. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Detektory založené na absorpci UV nebo VIS záření molekulami analytů

Dvoudimenzionální (2D-detektor)

- Monochromatický UV-VIS detektor (single wavelength)

Třídídimenzionální (3D-detektor)

- UV-VIS detektor využívající diodové pole (PDA)
- Rychle scanující UV-VIS detektor (high speed scanning)

Detektory založené na měření sekundárního UV nebo VIS záření emitovaného molekulami analytů po jejich ozáření primárním excitujícím zářením

- Fluorescenční detektor
- Laser-induced fluorescence detector (LIF)

Detektory založené na stáčení roviny polarizovaného světla a cirkulárním dichroismu

- Polarimetrický detektor
- Detektor cirkulárního dichroismu (CD)

Detektory založené na měření intenzity rozptýleného světla

- Evaporative light scattering detector (ELSD)

Detektory založené na redoxních změnách analytů

- Elektrochemický detektor
- Coularray detector

Detektory založené na ionizaci molekul analytů

- Hmotnostní spektrofotometry (MS)

Detektory založené na absorpci radiofrekvenčního záření molekulami analytů, které obsahují jádra s nenulovým spinem

- NMR

Spekrofotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti

Pro barevné látky lze zvolit analogický detektor pracující ve viditelné oblasti. Oba typy mají velkou výhodu v tom, že řada rozpouštědel používaných v kapalinové chromatografii jako mobilní fáze ani ve viditelné, ani v ultrafialové oblasti spektra neabsorbují.

Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, např. při 253,7 nm-rtuťová výbojka. Další typy umožňují práci při několika různých vlnových délkách volených vhodným optickým filtrem, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole (PDA) proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti.

Ultrafialové detektory jsou vysoce citlivé, mají velkou oblast linearitu odezvy, jsou selektivní a umožňují volit jako mobilní fázi poměrně mnoho rozpouštědel.

Detekční limit je 10^{-10} g/ml.

Fluorimetrický detektor

Detektor je založen na principu fluorescence, schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Je vysoce senzitivní a selektivní, ideální pro stopovou analýzu a analýzu složitých vzorků matrice. Senzitivita je vyšší než u ultrafialového detektoru. Fluorescenční detekce se rutinně využívá pro analýzu vzorků nízkých koncentrací, pg/ml. Rozsah linearitu je podobný jako u UV detektorů. Pouze málo analytů vykazuje přirozenou fluorescenci, proto použití detektoru musí předcházet derivatizace reagensy, která obsahuje fluorofor. Mezi funkční skupiny nebo typy vzorků obsahující fluorofory patří karboxylové kyseliny, alkoholy, aldehydy, fenoly, aminy, peptidy, ketony, fenoly a thioly.

Při fluorimetrické detekci prochází záření z xenonové výbojky excitačním filtrem, který poskytuje monochromatické záření požadované vlnové délky pro excitaci molekul analytů. Toto excitační záření prochází sloupcem efluentu v průtokové cele. Eluovaná látka absorbuje UV záření a přitom vydává fluorescenční záření o vyšší vlnové délce než jakou má záření excitační. Druhý, emisní filtr je v takové poloze, že sbírá záření ve směru 90° k původnímu excitačnímu záření. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič a přemění se na elektrický signál, jehož velikost je úměrná toku fluorescenčního záření. Tři hlavní možnosti uspořádání detektorů: filtr-filtr, mřížka-

filtr,mřížka-mřížka.Mřížka dovoluje možnost výběru vlnové délky,filtr liminuje jednu vlnovou délku.Fluorimetry typu mřížka-mřížka umožňují výběr excitační a emisní vlnové délky a jsou tedy vhodné pro vývoj metody.Instrumentace filtr-filtr je jednodušší,levnější,více senzitivní a lepší pro přenos HPLC metod mezi laboratořemi.Vlastnosti detektoru se mohou odlišovat různým designem průtokové cely,volbou sběru excitovaného záření,použitím excitační výbojky (deuteriová lampa,xenonová výbojka,atd.) a jedno nebo dvoupaprskovým designem.

Detekční limit je 10^{-9} až 10^{-15} g/ml.

Záznam a zpracování dat²⁾

K vyhodnocování chromatogramů se používají automaticky pracující zařízení, která jsou schopna automaticky vyhodnotit a zaznamenat veškerá eluční data, ale poskytnou i kvantitativní údaje ze zabudovaného integrátoru, které lze průběžně kontrolovat na obrazovce, a které jsou posléze zapsány na chromatogramu v podobě přehledné tabulky. Nové kapalinové chromatogramy jsou vybaveny mikroprocesory, které zcela automaticky ovládají chod přístroje. Tyto přístroje uvádějí na záznam analýzy vlastní chromatogram, přímo vyhodnocené výsledky, přesné podmínky separace, které jsou automaticky v průběhu měření udržovány podle programu.

2.3.2 Definice základních pojmů^{2),7)}

Při běžné chromatografii protéká mobilní fáze stálou rychlostí. Od vnesení určité látky do vstupu kolony do okamžiku kdy kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý čas, závislý na sorbovatelnosti látky v daném chromatografickém systému. Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky na koloně, označuje se jako *retenční nebo eluční čas*, t_R .

K eluci látky je zapotřebí, aby kolonou protekl určitý objem mobilní fáze, také ten může látku charakterizovat jako tzv. *retenční nebo eluční objem*, V_R .

Oba údaje jsou si při stálé rychlosti mobilní fáze úměrné.

$$V_R = t_R \cdot F_m$$

F_m je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času. Eluční objem je dán součtem dvou objemových veličin.

$$V_R = V'_R + V_M$$

V_R je redukovaný eluční objem (nebo také skutečný eluční objem) a V_M je mrtvý objem představující celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor.

Retenční čas se z chromatogramu určuje jako průmět maxima píku na osu x. (Při širokém píku s nevýrazným, tupým maximem se kolmice spouští z průsečíku tečen vedených v inflexech píku). Pokud by látka nebyla vůbec sorbována stacionární fází a postupovala kolonou stejně rychle jako sama mobilní fáze, potom se její retenční čas označuje jako mrtví čas t_M . Poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky se označuje jako *retenční faktor R*.

$$R = t_M / t_R$$

Retenční faktor může mít hodnotu 0 až 1. Pro chromatografickou separaci je účelné, aby nevybočoval z rozsahu 0,2 až 0,8.

K hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny pojmy *počet teoretických pater n* a *výškový ekvivalent teoretického patra H*. Počet teoretických pater kolony se zjistí experimentálně dosazením naměřených parametrů do vztahu

$$n = 16 \left(\frac{V_R}{Y_V} \right)^2$$

kde Y_V je šířka píku v základně vyjádřená v jednotkách objemu. Známe-li tedy n , počet teoretických pater a celkovou délku kolony L , snadno vypočteme výškový ekvivalent teoretického patra H .

$$H = L / n$$

Detekční a kvantitativní limit

LOD (Limit of Detection), detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako trinásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu, šumu.

LOQ (Limit of Quantification), kvantitativní limit je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu.

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření placebo ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří největší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu. Z tohoto rozpětí šumu je možno odhadnout jeho směrodatnou odchylku vydělením pěti.

$$S_n = (r^+ - r^-) / 5$$

Detekční a kvantitativní limit se vypočtou podle vzorců

$$\text{LOD} = 3 \cdot s_n \cdot K / b_1 \quad \text{LOQ} = 10 \cdot s_n \cdot K / b_1$$

kde K (plocha píku/výška píku) je poměr charakteristický pro stanovovanou látku a b_1 (plocha píku/koncentrace analytu) je poměr daný směrnicí regresní rovnice.

2.4 Příprava vzorku biologického materiálu k HPLC analýze

2.4.1 Příprava biomatrice³⁾

Zkoumanými vzorky biomatrice jsou krevní plasma, synoviální tekutina, homogenáty tkání, obsah intestina, žluč exkrementy (moč, stolice) a další. Pevné vzorky, tkáně se homogenizují podle Pottera-Elvehjema ve vhodném pufru, denaturují a poté extrahují. U Tekutých vzorků se provádí denaturace a poté extrakce nebo deproteinace a úprava pro přímý nástřik. Pro studium metabolitů druhé fáze biotransformace se vzorky biomatrice ošetřují dekonjugačními enzymy β -glukuronidázou, která odštěpí glukuronovou kyselinu z esterové nebo etherové vazby s xenobiotikem nebo arylsulfatázou, která odštěpí kyselinu sírovou z fenolického hydroxilu xenobiotika.

2.4.2 Denaturace vzorku biologického materiálu³⁾

Denaturací dochází k narušení nativní konformace (sekundární a terciální struktury) makromolekul (proteinů, nukleových kyselin). Denaturace vedoucí k odstranění bílkovin ze vzorku provázeném uvolněním navázaného analytu se nazývá deproteinace.

Fyzikální denaturace

Probíhá zvýšením teploty (90°C, 5-15 minut), pro účely bioanalýzy však není příliš používána.

Chemická denaturace

Dochází k rušení iontových vazeb silnými kyselinami a bazemi (Cl_3CCOOH , HClO_4 , H_2WO_5 , $(\text{HPO}_3)_n$, ZnSO_4 – sulfosalicylová kys., ZnSO_4 – NaOH, AlCl_3) a rušení nepolárních vazeb organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril) a tenzidy (dodecylsulfát sodný).

2.4.3 Extrakční metody³⁾

Liquid-liquid extrakce

Jedná se o extrakci analytů z vodného homogenátu biomatrice do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou např. dichlormethanu, chloroformu ethylacetátu, diethyletheru, t-butylmethylu, etheru, toluenu. Klasický proces prováděný s dělicí nálevkou se převede do mikroměřítka a pracuje se se zkumavkou

s uzávěrem.pH homogenizované biomatrace se upravuje tak,aby analyty byly v neionizovaném stavu.

Do organické fáze přecházejí pouze neionizované molekuly analytu.U analytů kyselé povahy se sníží pH biomatrace a provede se extrakce.U analytů bazické povahy se pH biomatrace zvyšuje.V biomatrici analytů amfolytické povahy se pH upravuje na hodnotu izoelektrického bodu nebo je jedna z funkčních skupin derivatizována.

Oddělení organické a vodné fáze probíhá centrifugací,vymrazením vodné fáze,odpipetováním nebo dekantací do jiné zkumavky.

Výtěžnost extrakce závisí na:

- Rozdělovacím koficientu P extrahovaných látek
- Ionizovatelnosti analytů
- Acidobazických poměrech ve vodné fázi

Rozdělovací koficient

$$P = c (\text{organická fáze}) / c (\text{vodná fáze})$$

Henderson – Hasselbalchova rovnice udává stupeň ionizace analytu při aktuálním pH vodného prostředí

$$\text{Pro slabé kyseliny: } \text{pH} = \text{pK}_A + \log ([A^-] / [HA])$$

$$\text{Pro slabé baze: } \text{pH} = \text{pK}_V - \text{pK}_B - \log ([HB^+] / [B])$$

kde pH je záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů, pK_a je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny, pK_B je záporný dekadický logaritmus disociační konstanty baze, pK_V je záporný dekadický logaritmus iontového součinu vody, $[A^-],[HA]$ jsou koncentrace disociované a nedisociované formy kyseliny při daném pH vodného prostředí $[HB^+],[B]$ jsou koncentrace disociované a nedisociované formy baze při daném pH vodného prostředí

Solid – phase extrakce

Při této technice extrakce dochází k selektivnímu zadržení analytů na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce.Slouží k odstranění rušivých složek biomatrace,nakoncentrování a izolaci vzorku.

Sorbenty dělíme na

- Nepochární: oktadecylsilyl silikagel, oktylsilyl silikagel
- Polární: silikagel, CN, NH₂, oxid hlinitý

V suchém, neaktivovaném stavu je lipofilní karáč sorbentu (např. C₁₈) polehlý, nepřipravený k zachytu analytů. Napřipnutí lipofilního kartáče se docílí promytím kolonky methanolem. Po vnesení tekuté biomatrice obsahující analyt dochází k zachycení analytu v lipofilním kartáči. Aplikací vody nebo pufru se docílí vymytí biomatrice a lipofilnější analyt zůstává v uhlovodíkovém kartáči. V konečné fázi se na kolonku aplikuje methanol, který má vyšší eluční sílu než voda a vyplaví analyt z uhlovodíkového kartáče sorbentu do připravené zkumavky.

Výhody SPE extrakce spočívají v práci s menšími objemy vzorků, snížené spotřebě rozpouštědel, snadné automatizaci, rychlosti a finanční dostupnosti.

Solid – phase mikroextrakce

Solid – phase mikroextrakce byla vyvinuta speciálně pro spojení s GC a HPLC. Princip je shodný s SPE, liší se ale technikou provedení. Sorbent je nanesen na krátkém úseku křemenné kapiláry ve formě tenkého filmu. Povrch kapiláry je chráněn kapilárou ocelovou.

Výhodou jsou nízké detekční limity a široká možnost použití.

Superkritická fluidní extrakce

Principem SFE je uvedení rozpouštědla do superkritického stavu, překonání tzv. kritického bodu na diagramu teplota – tlak, za němž ani sebevětším tlakem není možno dosáhnout zkapalnění látky. Extrakce probíhá za teplot v rozmezí 25-200°C a tlaku 7-60 MPa. SFE je tedy použitelná jen pro látky snášející uvedené podmínky. Extrakčním činidlem jsou různé, odolné plyny, nejčastěji oxid uhličitý.

Výhodou je vysoká účinnost, velmi malá spotřeba rozpouštědel. Nevýhodou je instrumentální náročnost.

2.5 Charakteristika analyzovaných látek

2.5.1 Nesteroidní antiflogistika obecně⁸⁾

Mezi nesteroidní protizánětlivé látky patří převážně syntetické sloučeniny kyselé povahy. Ve své molekule obsahují volnou karboxylovou skupinu, případně se jedná o látky enolického charakteru. Jejich mechanismus účinku spočívá především v inhibici syntézy prostaglandinů. Těžištěm jejich použití je tlumení projevů zánětlivých onemocnění zejména pohybového ústrojí. Účinek v praxi používaných nesteroidních antiflogistik je vysvětlován především bloádou syntézy prostaglandinů (silné mediátory bolesti a zánětu) inhibicí cyklooxygenázy. Účinek může mít charakter kompetitivní inhibice aktivního místa enzymu, případně se jedná o irreverzibilní inaktivaci cyklooxygenázy. Tato inhibice se projeví protizánětlivými účinky.

Oxikamy

Oxikamy jsou deriváty 2H-1,2-benzothiazin-3-karboxamidu. Jsou to kyselé látky typu enolů, mohou se vyskytovat ve dvou tautomerních formách. Podmínkou účinku je přítomnost methylové skupiny na dusíku, dále je důležité aby dusík karboxamidové skupiny byl substituován dusíkatým heterocyklem. Mechanismus účinku spočívá v blokování syntézy prostaglandinů inhibicí cyklooxygenázy, od ostatních látek se liší dlouhým biologickým poločasem v plasmě, což umožňuje snížení dávkování v delších časových intervalech. Hlavním nežádoucím účinkem je žaludeční dráždivost.

2.5.2 Isoxikam¹⁰⁾

Název látky:

4Hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)-2H-1,2-benzothiazin-3-karboxamid-1,1-dioxid

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃N₃O₅S₁

Molekulová hmotnost: 335,34

Isoxikam je účinné, dlouho působící antiflogistikum efektivně ulehčující příznaky revmatoidní artritidy a degenerativních kloubních onemocnění. Jako vedlejší účinky jsou udávány vážné kožní onemocnění.

2.5.3 Tenoxikam^{8),9)}

Název látky:

1,1-dioxid 4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2H-thieno[2,3-e][1,2]thiazin-3-karboxamidu

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁N₃O₄S₂

Molekulová hmotnost: 337,37

Tenoxikam je žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu a velmi těžce rozpustný v ethanolu, rozpouští se v roztocích kyselin a zásad. Používá se při degenerativních onemocněních pohybového ústrojí.

2.6 HPLC analýza oxikamů-rešerše

H.A.Mohamed a kol.¹¹⁾ studovali potenciometrickými a fluorimetrickými metodami interakce tenoxicamu a kovových iontů. Standardní roztok tenoxicamu připravili z 10 mg přesně naváženého tenoxicamu, který převedli do baňky o objemu 100 ml, rozpustili v 5 ml acetonitrilu a doplnili vodou na požadovaný objem. Vznikl roztok o koncentraci 0,1 mg / ml. Z důvodu citlivosti tenoxicamu na světlo, ochránili baňku před světlem aluminiovou folií a roztok připravovali vždy čerství. Tenoxicam stanovovali fluorimetricky v 0,5 mol/l kys. dusičné při emisní vlnové délce 450 nm a excitační vlnové délce 350 nm.

H. Ibrahim a kol.¹²⁾ se zabývali HPLC analýzou nesteroidních antiflogistik s fluorescenční detekcí v lidské plazmě a farmaceutických přípravcích. Všechny zásobní roztoky standardů připravovali o koncentraci 1 mg / ml. Kys. acetylsalicylovou připravili v acetonitrilu – kys. orthofosforečné (99:1), kys. salicylovou a piroxikam v acetonitrilu a naproxen v methanolu. Jako mobilní fázi zvolili acetonitril – DMSO (4:1). Pracovní standardní roztoky připravili ze zásobních standardních roztoků vhodným zředěním s acetonitrilem – kys. orthofosforečnou (99:1). Fluorescenční detekce byla provedena při excitační vlnové délce 290 nm a emisní vlnové délce 445 nm.

G.M. Escandar a kol.¹³⁾ stanovovali spektrofluorimetricky piroxikam a pyridoxin. Fluorimetrickou detekci provedli při excitační vlnové délce 320 nm a emisní vlnové délce 440 nm.

P.C. Damiani a kol.¹⁴⁾ rovněž popisují fluorimetrické stanovení piroxikamu ve farmaceutických vzorcích. Zásobní roztok piroxikamu připravili rozpuštěním 10 mg piroxikamu v 10 ml 0,5 mol/l NaOH nebo 10 ml 1 M HNO₃, výslednou směs umístili do baňky o objemu 1000 ml a zředili 0,5 mol/l HNO₃. Rostok standardu piroxikamu připravili zředěním roztoku zásobního 0,5 mol/l kys. dusičnou. Detekci provedli při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 440 nm.

H. Y. Ji a kol.¹⁵⁾ stanovovali piroxikam, meloxicam, tenoxicam a isoxicam (vnitřní standard) v lidské plazmě pomocí LC s tandemově zapojenými hmotnostními spektrometry. Vzorky byly připraveny smícháním 100 µl slepé plasmy, kalibračních standardů a vzorků kontroly kvality s 10 µl vnitřního standardu pracovního roztoku a 200 µl 0,5 mol/l HCl. Vzorky byly extrahovány 1 ml ethylacetátu, protřepávány po dobu 5

minut a centrifugovány rovněž 5 minut. organická vrstva byla převedena a odfoukána do sucha proudem dusíku. Zbytek byl rozpuštěn v 40 µl methanolu – vodě (1:1), 2 minuty protřepán, 5 minut centrifugován, převeden do vialky a 10 µl bylo nastříknuto na HPLC kolonu. Ionizace byla provedena elektrosrejem a analyty byly detekovány hmotnostním spektrometrem.

Y.H. Kim a kol.¹⁶⁾ stanovovali lornoxikam rovněž pomocí LC s tandemově zapojenými hmotnostními spektrometry a ionizací elektrosrejem.

H.Bartsch a kol.¹⁰⁾ srovnávali analytické metody pro vyšetření fotostability isoxikamu. Roztok vzorku byl tedy vystaven záření z xenonové výbojky a bylo zjištěno, že fotodegradace isoxikamu je vysoce závislá na koncentraci roztoku vzorku. Roztok isoxikamu byl připraven v 2,5% NH₄OH. Jako mobilní fáze pro HPLC byl zvolen methanol – octanový pufr (40:60), pH 4,6. Pro detekci DAD detektorem byla použita vlnová délka 280 nm.

V další studii tentýž autorský kolektiv srovnával analytické metody pro vyšetření fotostability piroxikamu. Roztok piroxikamu rovněž připravili v 2,5% NH₄OH. Pro HPLC analýzu byla zvolena mobilní fáze methanol – octanový pufr (45:55), pH 4,3. Detekce proběhla pomocí DAD detektoru při vlnové délce 280 nm.¹⁷⁾

A.Doliva a kol.¹⁸⁾ vyvinuli HPLC metodu pro stanovení piroxikamu po transdermálním prostupu přes kůži břicha u krys. Vzorky analyzovali na koloně se sorbentem C₁₈ o velikosti částic 5 µm. Mobilní fází byla směs acetonitril – kys. octová (45:55), pH 2,8. Detekce pomocí DAD detektoru proběhla při vlnové délce 354 nm.

M.Sultan a kol.¹⁹⁾ se zabývali předběžnou úpravou vzorku a stanovením nesteroidních antiflogistik ve farmaceutických přípravcích a biologických vzorcích pomocí HPLC s tandemově zapojeným UV detektorem a hmotnostním spektrometrem.

J.Joseph-Charles a M.Bertucat²⁰⁾ prováděli HPLC analýzu nesteroidních protizánětlivých oxikamů ve farmaceutických přípravcích.

H.M.Rigato a kol.²¹⁾ stanovovali meloxikam v lidské plasmě pomocí HPLC s tandemově zapojenými hmotnostními spektrometry.

A.Marland a kol.²²⁾ sledovali eliminační profily tenoxikamu a hydroxitenoxikamu v koňské moči a séru po perorálním podání 200 mg.

3. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je porovnat UV a fluorimetrickou detekcí při HPLC analýze. Srovnání bylo provedeno na příkladu analýzy isoxikamu a tenoxikamu ve vzorku plné krve.

Tento úkol sestává z několika dílčích kroků

- výběr optimálních chromatografických podmínek
- využití SPE k izolaci isoxikamu a tenoxikamu ze vzorku plné králičí krve
- porovnání citlivosti obou detekcí -výpočet limitů detekce a kvantifikace

4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

Léčiva a chemikálie

isoxikam SIGMA (St. Louis, USA)
tenoxikam SIGMA (St. Louis, USA)
mehtanol (Penta,Praha)
acetonitril HPLC-grade (Merk,Darmstadt,BRD)
chloroform HPLC-grade (Merk,Darmstadt,BRD)
dichlormethan (Merk,Darmstadt,BRD)
kyselina fosforečná 85% (Lachema,Neratovice)
kyselina chlorovodíková 35% (Penta,Praha)
kyselina octová 95% (Penta,Praha)
destilovaná voda

Biologický materiál

plná králičí krev (LF UK Hradec Králové)

Kolony

analytická kolona pro HPLC Separon SGX C₁₈,skleněná,150 x 3,0 mm I.D.
(7µm),(Tessek Ltd,Praha)
extrakční kolonka SILICA-Cart s náplní separon SGX C₁₈ (60 µm),náplň 250 mg
(Tessek Ltd,Praha)

Přístroje

analytické váhy (Japonsko)
vodní vývěva
digitální pH-metr
elektrická třepačka (Kavalier,Votice)
ultrazvuková lázeň (Kraintek,Slovensko)
centrifuga T 51 (Zentrifugbau,Angelsdorf,DDR)

HPLC sestava Shimadzu

kapalinový chromatograf LC – 10AD vp Shimadzu (Tokyo, Japan)
autoinjektor SIL – 10AD vp
degasér DGU – 14A
zařízení pro nastavení teploty CTO – 10AS vp

řídící jednotka SCL – 10A vp

UV-VIS detektor SPD – 10A vp

fluorimetrický detektor RF – 10Axl

analytický software Class-VP Shimadzu (Tokyo, Japan)

Pomůcky

Mikrostříkačky o objemu 50 μ l (Hamilton, Švýcarsko)

4.2 Příprava roztoků

Roztok standardu isoxikamu

Isoxikam byl rozpuštěn v acetonitrilu. 1 mg isoxikamu byl odvážen do 10 ml odměrné baňky a doplněn acetonitrem po rysku. Vznikl roztok o koncentraci 0,1 mg / ml.

Roztok standardu tenoxikamu

Tenoxikam byl rozpuštěn v acetonitrilu. 1 mg tenoxikamu byl odvážen do 10 ml odměrné baňky a doplněn acetonitrem po značku. Vznikl roztok o koncentraci 0,1 mg / ml.

Octanový pufr²³⁾

3,3 g octanu sodného bylo naváženo a rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Požadované pH bylo upraveno kys. octovou 98%. Na závěr byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 500 ml.

Roztok kyseliny chlorovodíkové

Kyselina chlorovodíková 0,1 mol / l má pH 1,33. pro potřebu extrakce bylo pH upravováno, zvyšováno vodou s použitím acidimetru.

4.3 Chromatografické podmínky

Prvním krokem pro vypracování vhodné metodiky pro HPLC analýzu isoxikamu a tenoxikamu bylo nalezení optimálních chromatografických podmínek.

Analýzu jsme prováděli na analytické koloně Separon SGX C₁₈, vyrobené ze skla, o velikosti částic sorbentu 7 µm a parametrech 150 x 3,0 mm I.D.

Jako mobilní fázi pro analýzu jsme zvolili kys.fosforečná – methanol (1:2), pH 2,75. před analýzou byla mobilní fáze zfiltrována pomocí vodní vývěvy. Průtok mobilní fáze chromatografem jsme nastavili na 0,7 ml / min.

Detekce byla provedena pomocí UV-VIS detektoru při vlnových délkách 330 nm pro isoxikam a 280 nm pro tenoxikam. Fluorimetrická detekce byla realizována při excitačních vlnových délkách 330 nm pro isoxikam, 350 nm pro tenoxikam a emisních vlnových délkách 440 nm pro isoxikam, 450 nm pro tenoxikam.

Na kolonu jsme dávkovali 10 µl analyzovaného vzorku.

4.4 Izolace léčiva z biologického materiálu metodou solid-phase extrakce

4.4.1 Isoxikam

Vzorek jsme připravili tímto postupem: k 0,5 ml plné králičí krve jsme přidali 0,5 ml vody a ponořili po dobu 5 minut do ultrazvukové lázně, aby nastala hemolýza. Poté jsme přidali 50 µl roztoku isoxikamu 0,1 mg/ml a mírně protřepali.

Ke vzorku jsme přidali 2 ml kyseliny pro úpravu kyselosti a 5 minut jsme v uzavřené zkumavce protřepávali na elektrické třepačce. Po pětiminutové centrifugaci jsme supernatant aplikovali na předem aktivovanou extrakční kolonku SILICA-Cart s náplní Separon SGX C₁₈ (60µm) napojenou na vakuové extrakční zařízení.

Chronologický postup extrakce:

- Aktivace kolonky promytím 5 ml methanolu
- Promytí 3 ml kyseliny
- Aplikace vzorku
- Promytí 3 ml kyseliny
- Vymytí analytu z kolonky 3 ml chloroformu

Analyzovaná látka přešla ze sorbentu kolonky do chloroformu. Tento extrakt jsme odpařili do sucha proudem dusíku a rozpustili v 1 ml acetonitrilu. Roztok jsme dávkovali na kolonu chromatografu.²³⁾

4.4.2 Tenoxikam

Vzorek tenoxikamu jsme připravili identickým postupem jako v případě isoxikamu.

Chronologický postup extrakce:

- Aktivace kolonky promytím 5 ml methanolu
- Promytí 3 ml vody
- Aplikace vzorku
- Promytí 3 ml vody
- Vymytí analytu z kolonky 3 ml dichlormethanu

Analyzovaná látka přešla ze sorbentu kolonky do dichlormethanu. Tento extrakt jsme odpařily do sucha proudem dusíku a rozpustili v 1 ml acetonitrilu. Roztok jsme dávkovali na kolonu chromatografu.²⁴⁾

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

K optimalizaci chromatografických podmínek jsme využili poznatků prací, které se již problematikou UV detekce obou oxikamů zabývaly a rešeršních informací.

Naším úkolem bylo zvolit vhodnou mobilní fázi (MF), společnou pro hodnocení obou léčiv. Nejprve jsme namíchali směs acetonitril-octanový pufr, v poměru 35:65, pH bylo upraveno na hodnotu 2,8 kyselinou octovou, podle údajů získaných z literatury²³). Průtok mobilní fáze jsme nastavili na 0,7 ml/min. Na kolonu jsme nechali nastříkovat 10 µl roztoku isoxikamu a tenoxikamu o koncentraci 0,1 mg/ml. Píky byly nesymetrické, chvostovaly, retenční čas isoxikamu byl 13,5 minut a retenční čas tenoxikamu 4,9 minuty.

Mobilní fázi jsme tedy postupně obměnili v obou složkách. Jako další jsme testovali směs methanol-kys. octová v poměru 2:1, pH 3,37. Pík se do dvaceti minut neobjevil.

Nejlépe se nám jako mobilní fáze osvědčila směs methanol-kys. fosforečná v poměru 2:1, pH 2,75. Dosáhli jsme symetrických, štíhlých píků s retenčními časy isoxikamu 7,9 minut a tenoxikamu 6 minut.

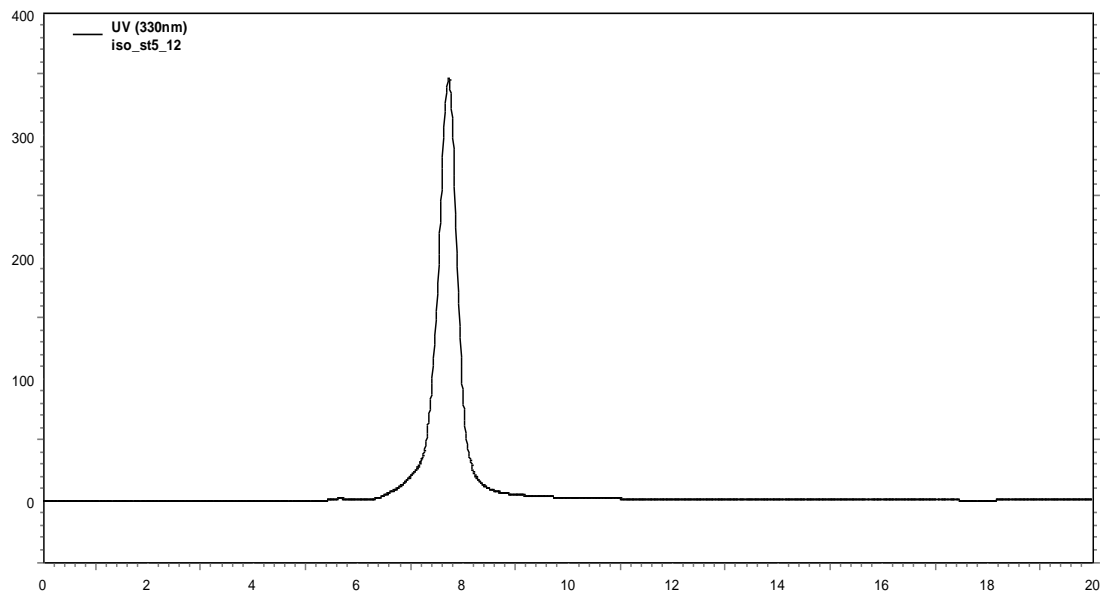
Takto upravená mobilní fáze byla používána pro další analýzu.

Pro HPLC analýzu isoxikamu a tenoxikamu byla zvolena analytická kolona Separon SGX C₁₈, parametry 150 × 3,0 mm I.D. (velikost částic 7 µm).

K UV detekci isoxikamu byla zvolena vlnová délka $\lambda = 330$ nm, k detekci tenoxikamu pak $\lambda = 280$ nm. Při fluorimetrické detekci jsme pracovali s excitačními vlnovými délkami pro isoxikam $\lambda = 330$ nm, pro tenoxikam $\lambda = 350$ a emisními vlnovými délkami $\lambda = 440$ nm pro isoxikam a $\lambda = 450$ nm pro tenoxikam.

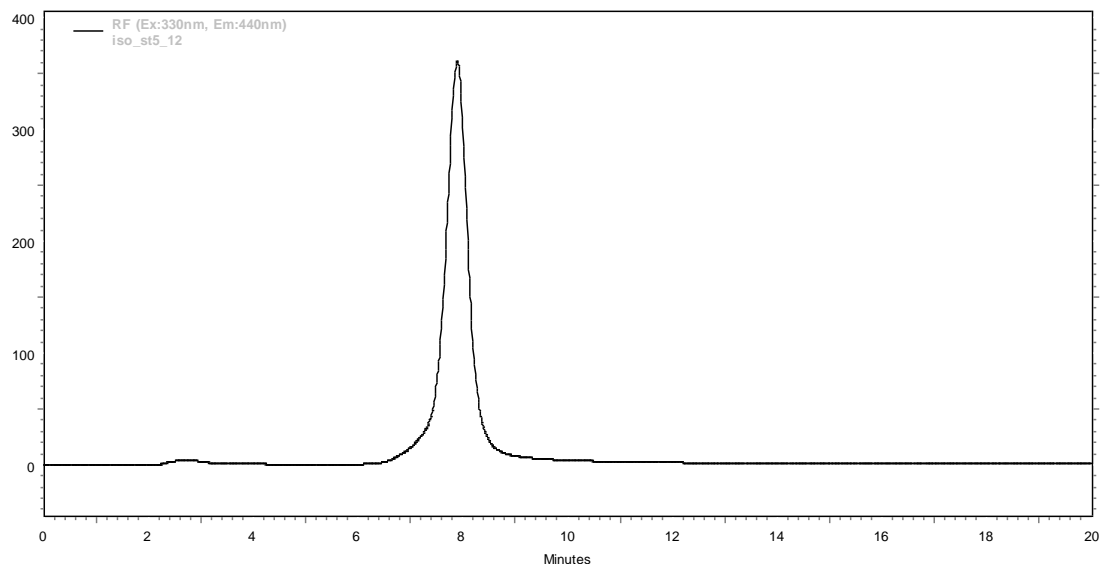
5.1.1 Chromatogramy

Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.



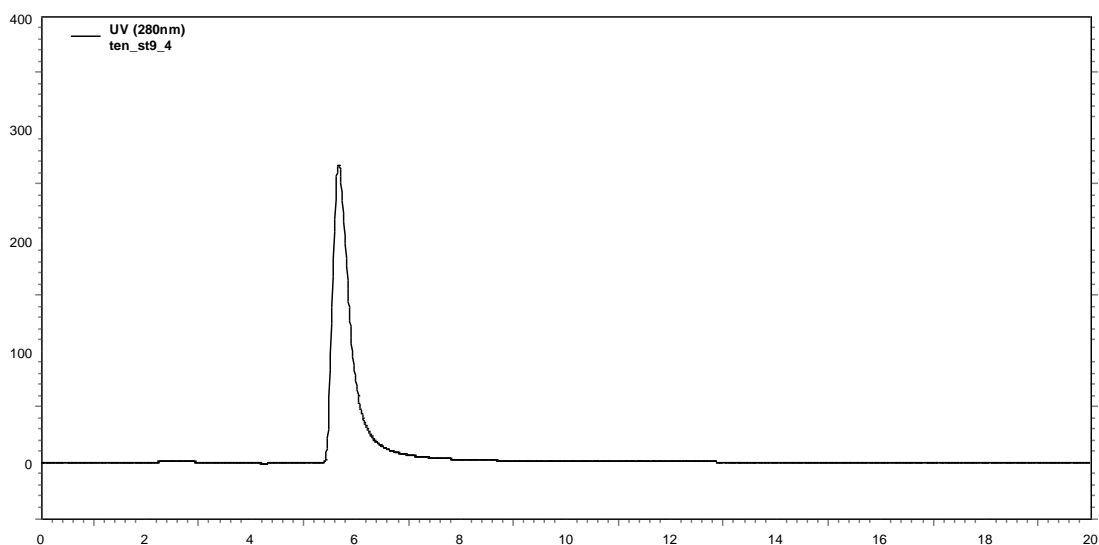
Obrázek 2: HPLC chromatogram s UV detekcí isoxikamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml

$$\lambda = 330 \text{ nm}$$

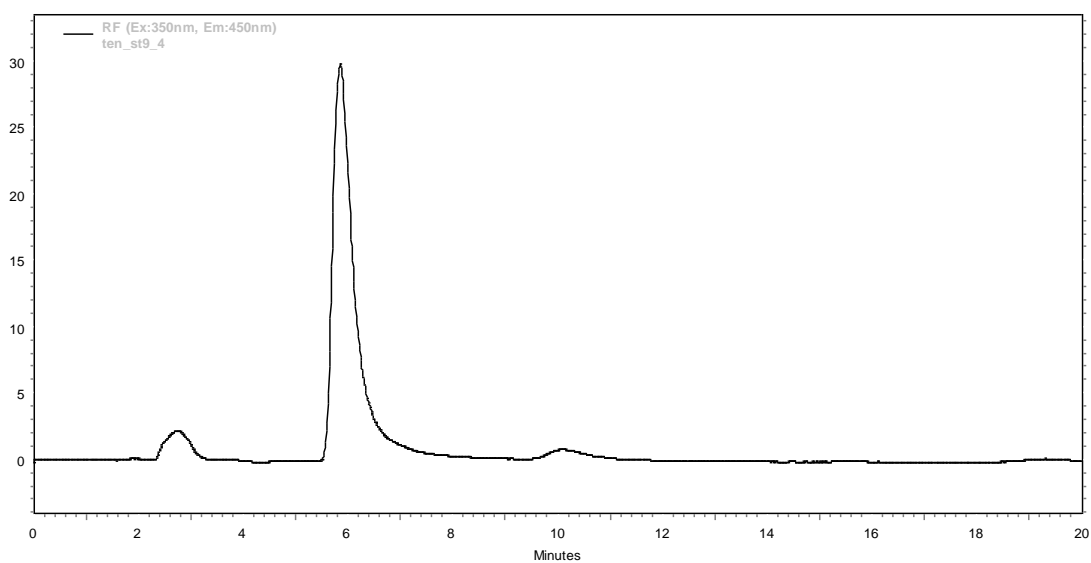


Obrázek 3: HPLC chromatogram s fluorimetrickou detekcí isoxikamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml

$$\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$$



Obrázek 4: HPLC chromatogram s UV detekcí tenoxicamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml
 $\lambda = 280 \text{ nm}$



Obrázek 5: HPLC chromatogram s fluorimetrickou detekcí tenoxicamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml

$$\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$$

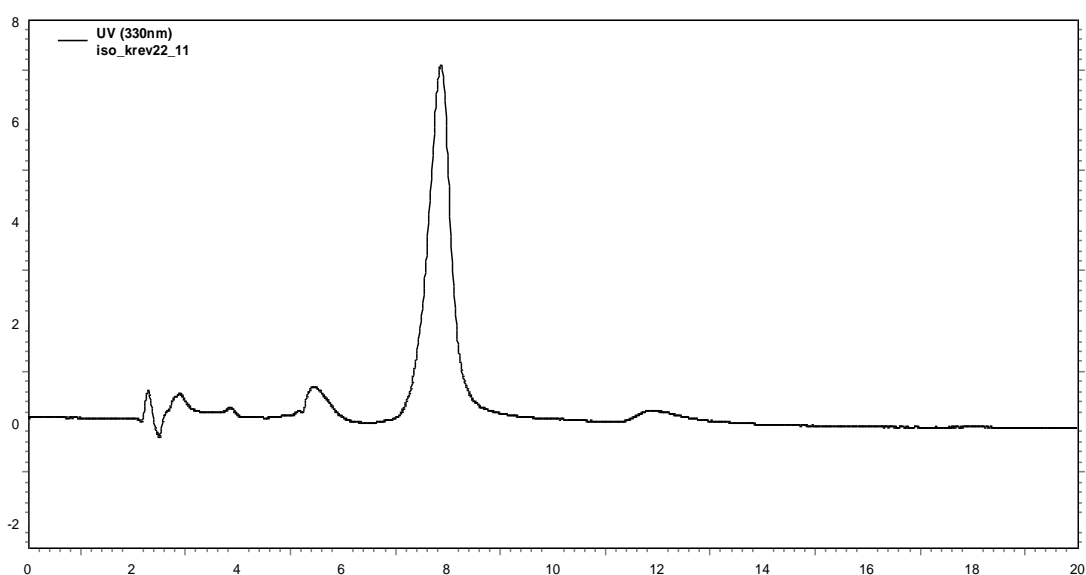
Jak je z obrázků patrné, píky standardů se při UV a fluorimetrické detekci příliš neliší.

5.2 Izolace isoxikamu a tenoxikamu ze vzorku plné králičí krve solid-phase extrakcí

K extrakci na pevné fázi jsme použili extrakční kolonky SILICA-Cart s náplní Separon SGX C₁₈ (60 μm). Metodiku extrakce jsme převzali z prací, které se problematikou již dříve zabývaly.^{23 24)} Přesný postup je uveden v kapitole 4.4.

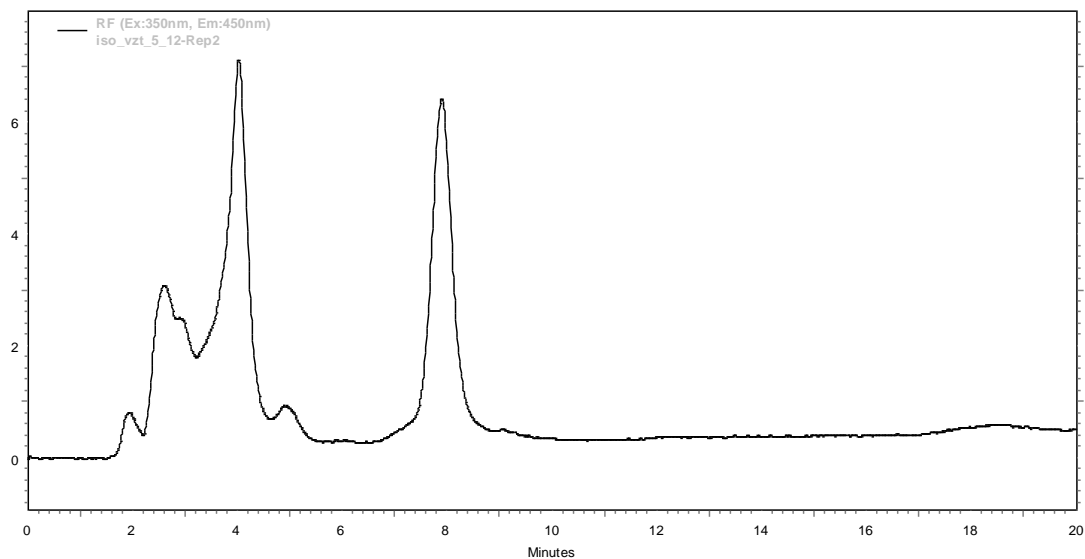
5.2.1 Chromatogramy

Chromatografické podmínky a metodika solid-phase extrakce jsou uvedeny v kapitolách 4.3 a 4.4.



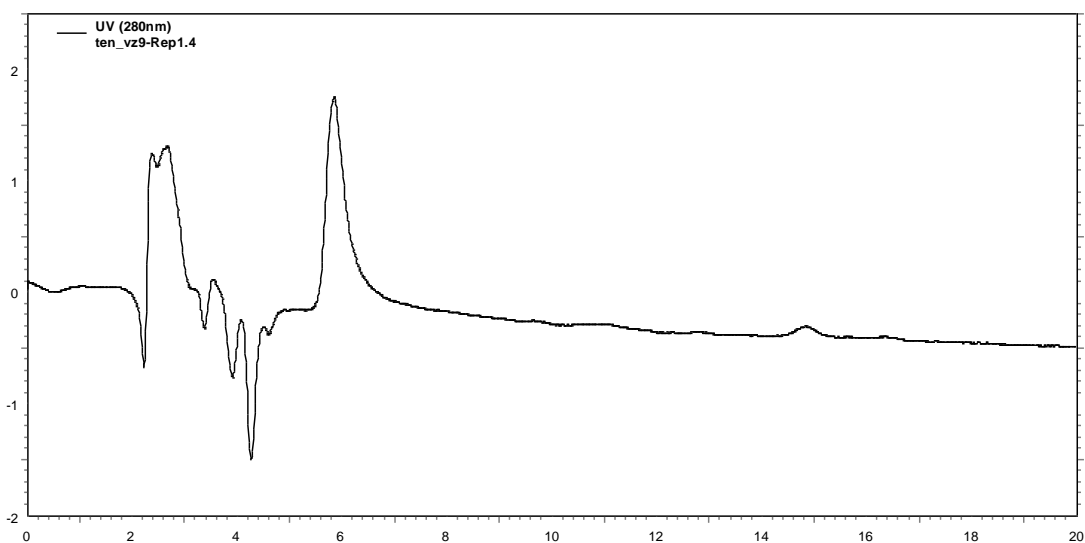
Obrázek 6: HPLC chromatogram s UV detekcí roztoku isoxikamu z plné krve upraveného SPE extrakcí, ke vzorku krve bylo přidáno 50 μl roztoku isoxikamu 0,1 mg/ml

$$\lambda = 330 \text{ nm}$$



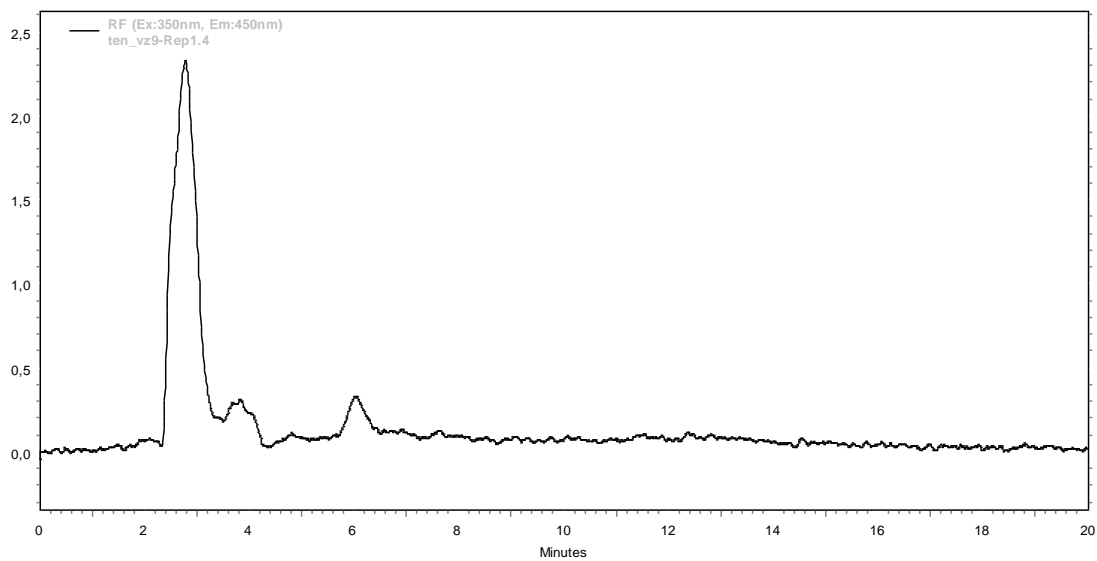
Obrázek 7: HPLC chromatogram s fluorimetrickou detekcí roztoku isoxikamu z plné krve upraveného SPE extrakcí, ke vzorku krve bylo přidáno 50 μ l roztoku isoxikamu 0,1 mg/ml

$$\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$$



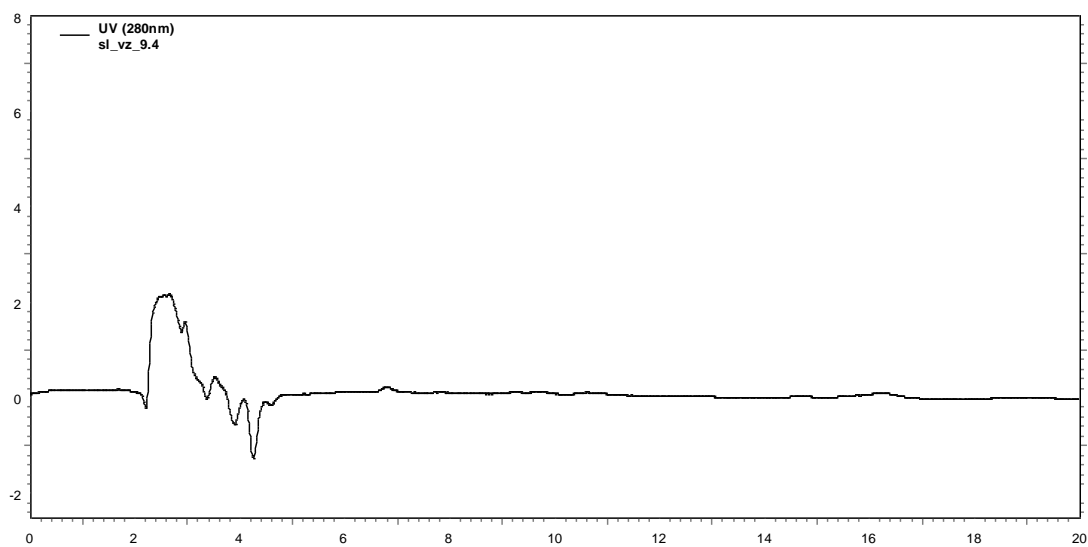
Obrázek 8: HPLC chromatogram s UV detekcí roztoku tenoxicamu z plné krve upraveného SPE extrakcí, ke vzorku krve bylo přidáno 50 μ l roztoku tenoxicamu 0,1 mg/ml

$$\lambda = 280 \text{ nm}$$



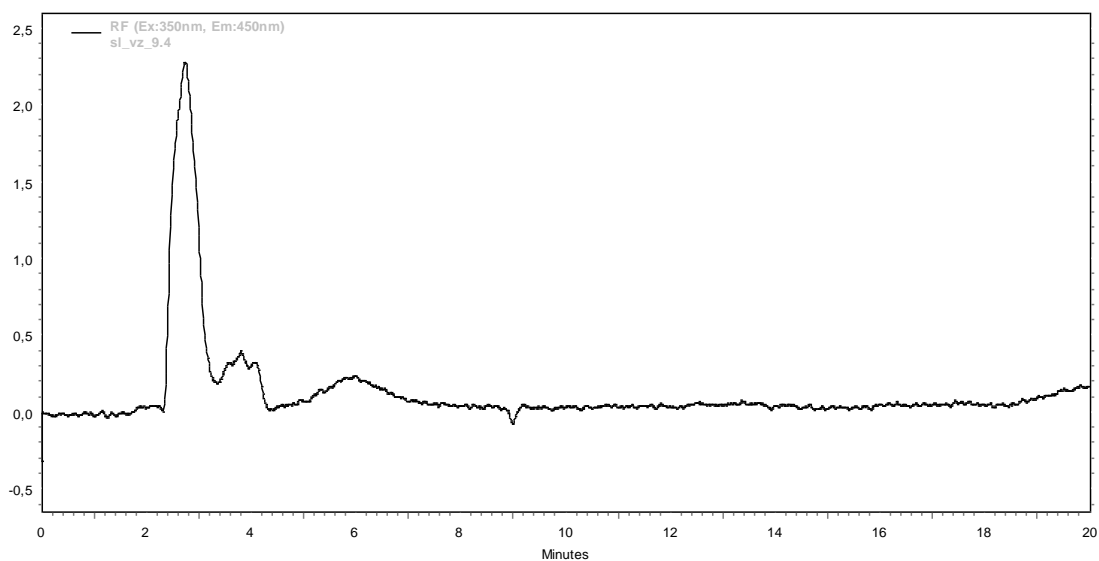
Obrázek 9: HPLC chromatogram s fluorimetrickou detekcí roztoku tenoxikamu z plné krve upraveného SPE extrakcí, ke vzorku krve bylo přidáno 50 μ l roztoku tenoxikamu 0,1 mg/ml

$$\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$$



Obrázek 10: HPLC chromatogram s UV detekcí vzorku prázdné krve upraveného SPE extrakcí

$$\lambda = 280 \text{ nm}$$



Obrázek 11: HPLC chromatogram s fluorimetrickou detekcí vzorku prázdné krve upraveného SPE extrakcí

$$\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$$

Z chromatogramů je patrné, že se píky isoxikamu při UV a fluorimetrické detekci příliš nelišili, ale výrazně se zvětšily píky reziduí z krve při fluorimetrické detekci. Pík tenoxikamu v krvi se při fluorimetrické detekci zmenšil a píky reziduí z krve se zvýraznily. Je to patrné i z chromatogramů vzorků blankové krve.

5.3. Recovery, detekční a kvantitativní limit

Standardní roztoky isoxikamu a tenoxikamu jsme připravili o koncentraci 0,1 mg/ml rozpuštěním v acetonitrilu. Do plné králičí krve jsme převedli 50 µl standardu, po SPE extrakci a zakoncentrování jsme odparily rozpustili v 1 ml acetonitrilu. Na kolonu jsme tedy dávkovali vzorky o koncentracích 5 µg/ml.

5.3.1 Extrakční účinnost

Pro analyzovaná léčiva jsme vypočetli extrakční účinnost (recovery) při SPE.

Tabulka 1: Vypočtené hodnoty recovery

Návratnost isoxikamu vypočtená z údajů
získaných při UV detekci

| | recovery (%) |
|-----------|--------------|
| 1. měření | 64,8 |
| 2. měření | 68,48 |
| 3. průměr | 66,62 |

Návratnost isoxikamu vypočtená z údajů
získaných při fluorimetrické detekci

| | |
|-----------|-------|
| 1. měření | 64,11 |
| 2. měření | 64,72 |
| 3. průměr | 64,72 |

Návratnost tenoxikamu vypočtená z údajů
získaných při UV detekci

| | |
|-----------|-------|
| 1. měření | 59,42 |
| 2. měření | 57,17 |
| 3. průměr | 58,3 |

Návratnost tenoxikamu vypočtená z údajů
získaných při fluorimetrické detekci

| | |
|-----------|-------|
| 1. měření | 60,15 |
| 2. měření | 58,83 |
| 3. průměr | 59,49 |

5.3.2 Výpočet LOD a LOQ

Pro hodnocená léčiva jsme vypočetli LOD a LOQ. Výšku šumu baseline jsme určili ze vzorku prázdné krve analyzované za uvedených podmínek.

Tabulka 2: Údaje pro výpočet detekčního a kvantitativního limitu

LOD a LOQ isoxikamu vypočtené z údajů získaných při UV detekci

| | výška šumu | výška píku | |
|------------------|------------|------------|--------|
| 1. | 17 | | 10 088 |
| 2. | 24 | | 9 907 |
| průměr | 21 | | 9 998 |
| LOD = 6,3 ng/ml | | | |
| LOQ = 21,0 ng/ml | | | |

LOD a LOQ isoxikamu vypočtené z údajů získaných při fluorimetrické detekci

| | | | |
|------------------|----|--|-------|
| 1. | 27 | | 9 194 |
| 2. | 36 | | 8 876 |
| průměr | 32 | | 9 035 |
| LOD = 10,6 ng/ml | | | |
| LOQ = 35,4 ng/ml | | | |

LOD a LOQ tenoxikamu vypočtené z údajů získaných při UV detekci

| | | | |
|------------------|----|--|-------|
| 1. | 43 | | 3 364 |
| 2. | 21 | | 3 668 |
| průměr | 32 | | 3 516 |
| LOD = 27,3 ng/ml | | | |
| LOQ = 91,0 ng/ml | | | |

LOD a LOQ tenoxikamu vypočtené z údajů získaných při fluorimetrické detekci

| | | | |
|-----------------|----|--|-----|
| 1. | 36 | | 454 |
| 2. | 20 | | 472 |
| průměr | 28 | | 463 |
| LOD = 181 ng/ml | | | |
| LOQ = 605 ng/ml | | | |

Vzorci potřebné pro výpočet limitu detekce a kvantifikace jsou uvedeny v kapitole 2.3.2.

Při UV a fluorimetrické detekci bylo dosaženo podobných detekčních a kvantitativních limitů, neboť vzhledem k vyšší citlivosti fluorimetrického detektoru byl i vyšší šum baseline.

6. ZÁVĚR

V bakalářské práci byla porovnána UV a fluorimetrická detekce při analýze isoxikamu a tenoxikamu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Byly zvoleny optimální chromatografické podmínky, které umožnily hodnotit obě léčiva, lišila se pouze vlnová délka pro hodnocení isoxikamu a tenoxikamu UV a fluorimetrickou detekcí. Mobilní fáze methanol – kys.fosforečná (2:1), pH 2,75. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min a dávkované množství vzorku 10 µl. Separace probíhala na analytické koloně Separon SGX C₁₈ 150 x 3,0 mm I.D. (7µm). Detekce byla realizována UV detektorem při vlnových délkách 330nm (isoxikam), 280 nm (tenoxikam) a fluorimetrickým detektorem při excitačních vlnových délkách 330 nm (isoxikam), 350 nm (tenoxikam) a emisních vlnových délkách 440 nm (isoxikam), 450 nm (tenoxikam).

Pro úpravu vzorků plné králičí krve byla užitá metoda solid-phase extrakce na extrakční kolonce SILICA-Cart s náplní Separon SGX C₁₈ (60µm). Eluční rozpouštědlo bylo zahuštěno do sucha a odparek rozpuštěn v acetonitrilu.

Z údajů získaných při analýzách s použitím fluorimetrického a UV detektoru byly vypočteny detekční, kvantitativní limity a extrakční účinnost.

7. LITERATURA

Literatura

- 1) Klouda, P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda Ostrava 2003
- 2) Churáček, J., Jandera P.: Úvod vysokoúčinné kapalinové kapalinové chromatografie, SNTL Praha 1985
- 3) Nobilis, M.: Studijní materiály, Ústav experimentální biofarmacie, spol.prac. AV ČR a PRO.MED.CS Praha a.s., Hradec Králové 2007-8
- 4) Čůta, F. a kol.: Instrumentální analýza, SNTL Praha 1986
- 5) Katedra analytické chemie Faf UK v HK: Studijní materiály, Hradec Králové 2007-08
- 6) Snyder, L., Kirkland, J., Glajch, J.: Practical HPLC method development, John Wiley and Sons, Canada 1997
- 7) Holík, M.: Validace analytických metod, příručka, Katedra teoretické a fyzikální chemie, přírodovědecká fakulta MU, Brno 1995
- 8) Hartl, J. a kol.: Farmaceutická chemie II., Karolinum Praha 1994
- 9) Český lékopis 2005, Grada Praha 2005
- 10) Bartch, H., Eiper, A., Habiger, K., Kopelent-Frank, H.: Comparison of analytical methods for investigating the stability of isoxicam, J.Chromatogr.A 846, 207-211, 1999
- 11) Mohamed, H.A., Wadood, H.M.A., Farghaly, O.A.: Potenciometric and spectrofluorimetric of tenoxicam with some methal ions, J.Pharm.Biomed.Anal. 28, 819-826, 2002
- 12) Ibrahim, H., Boyer, A., Bouajila, J., Couderc, F., Nepveu, F.: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection, J.Chromatogr.B 857, 59-66, 2007
- 13) Escandar, G.M., Bystol A.J., Campiglia, A.D.: Spectrofluorimetric method for the determination of piroxicam and pyridoxine, Anal.Chim.Acta 466, 275-283, 2002
- 14) Damiani, P.C., Bearzoti, M., Cabezón, M., Olivieri, A.C.: Spectrofluorometric determination of piroxicam, J.Pharm.Biomed.Anal. 17, 233-236, 1998
- 15) Ji, H.Y., Lee, H.W., Kim, Y.H., Jeong, D.W., Lee, H.S.: Simultaneous determination of piroxicam, meloxicam and tenoxicam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, J.Chromatogr.B 826, 214-219, 2005

- 16) Kim, Y.H., Ji, H.Y., Park, E.S., Chae, S.W., Lee, H.S.: Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of lornoxicam in human plasma, *Arch. Pharm. Res.* 30, 905-910, 2007
- 17) Bartsch, H., Eiper, A., Kopelent-Frank, H.: Stability indicating assays for the determination of piroxicam – comparison methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 531-541, 1999
- 18) Doliva, A., Santoyo, S., Campanero, M.A., Ygartua, P.: Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 531-547, 2001
- 19) Sultan, M., Stecher, G., Stoggl, W.M., Bakry, R., Zaborski, P., Huck, C.W., El-Kousy, N.M., Bonn, G.K.: Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and biological samples by HPLC-UV-MS and micro-HPLC, *Curr. Med. Chem.* 12(5), 573-588, 2005
- 20) Joseph-Charles, J., Bertucat, M.: Simultaneous HPLC analysis of non-steroidal anti-inflammatory oxicams in pharmaceutical preparations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Techno.* 22, 2009-2021, 1999
- 21) Rigato, H.M., Mendes, G.D., Borges, N.C., Moreno, R.A.: Meloxicam determination in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry in Brazilian bioequivalence studies, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 44(10), 489-498, 2006
- 22) Marland, A., Sarkar, P., Leavitt, R.: The elimination profiles of tenoxicam and hydroxytenoxicam in equine urine and serum after a 200-mg oral dose, *J. Anal. Toxicol.* 23, 237-241, 1999
- 23) Ulrichová, M.: Analytické hodnocení antirevmatik kapalinovou chromatografií III, diplomová práce, FaF UK v Hradci Králové, 2000
- 24) Stará, J.: Analytické hodnocení antirevmatik kapalinovou chromatografií VI, diplomová práce, FaF UK v Hradci Králové, 2002