

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
katedra biofyziky a fyzikální chemie

Využití SPE pro HPLC

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2006

Marie Soukupová

## **Poděkování**

Tato diplomová práce by nemohla vzniknout bez odborné pomoci a cenných rad vedoucího diplomové práce a mého konzultanta Ing. Vladimíra Kubíčka, kterému děkuji za jeho přínosné připomínky k jejímu obsahu a pomoc při práci v laboratoři.

## Obsah

Souhrn.....	5
Úvod.....	6
Teoretická část.....	7
<b>I. IZOLACE ANALYTŮ POMOCÍ EXTRAKCE NA PEVNÝCH FÁZÍCH .....</b>	<b>7</b>
Základní přehled a pojmy .....	7
Cíle a klasifikace úprav vzorků biologických tekutin .....	7
Definice extrakce na pevných fázích (SPE).....	8
Některé typy pevných fází a jejich syntéza .....	9
Používání SPE kolonek.....	11
SPE v praxi.....	13
Vývoj metodiky a mechanismy interakcí .....	14
Selektivita SPE .....	19
Průtoková rychlost během SPE.....	21
Kapacita jednorázových SPE kolonek.....	22
Posílení účinnosti SPE.....	23
Frakcionace vzorků pomocí SPE .....	24
Reprodukovatelnost SPE .....	25
Kontaminace způsobená kolonkami.....	26
Automatizace SPE.....	26
Využití SPE.....	29
Shrnutí.....	30
<b>II. POZNÁMKY K AMLODIPINU .....</b>	<b>31</b>
II.1. Klasifikace blokátorů kalciového kanálu .....	31
II.2. Farmakoterapie amlodipinem.....	33
Experimentální část .....	38
<b>I. POUŽITÝ MATERIÁL .....</b>	<b>38</b>
I.1. Chemikálie .....	38
I.2. Pomůcky a přístroje .....	38
<b>II. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ .....</b>	<b>40</b>
II.1. Příprava základního roztoku AML-MES .....	40
II.2. Příprava acetátového pufru .....	40
II.3. Příprava borátového pufru .....	40
II.4. Přehled používaných elučnicích činidel .....	41
II.5. Příprava roztoku vnitřního standardu – pyrenu .....	42
<b>III. POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU .....</b>	<b>43</b>
III.1. Kalibrační křivka .....	43
III.2. LC-SCX kolonky .....	43
III.3. CYANO – kolonky .....	44
III.4. C <sub>2</sub> – kolonky .....	45

III.5. Vnitřní standard pro chromatografickou analýzu.....	46
III.6. Převedení metodiky SPE na práci s biologickým materiálem.....	47
III.7. Chromatografická analýza amlodipinu v extraktech po SPE .....	48
III.8. Reaktivace kolonek.....	48
<b>IV. VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>49</b>
<b>Výsledková část.....</b>	<b>50</b>
1. Kalibrační křivka .....	50
2. Výsledky pokusů s LC-SCX kolonkami.....	51
3. Výsledky pokusů s kyanopropylovými sorbenty .....	54
4. Výsledky pokusů s C <sub>2</sub> fázemi .....	59
5. Výsledky testování pyrenu jako vnitřního standardu .....	63
6. Výsledky chromatografického stanovení léčiva AML-MES v extraktech z biologického materiálu .....	63
<b>Diskuse .....</b>	<b>66</b>
1. SPE amlodipinu na testovaných SCX sorbentech .....	66
2. SPE amlodipinu na kyanopropylových tuhých fázích.....	67
3. SPE amlodipinu na C <sub>2</sub> tuhých fázích .....	69
4. SPE vnitřního standardu pyrenu .....	71
5. SPE a LLE biologického materiálu .....	72
6. Nástin dalších kroků v problematice SPE amlodipinu s ohledem na výsledky dosažené v DP.....	72
<b>Závěr .....</b>	<b>74</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>75</b>

## Souhrn

Tato diplomové práce byla věnována optimalizaci metody předseparace amlodipinu z biologických vzorků pomocí extrakce na tuhých fázích před samotnou chromatografickou analýzu. Celkem byly otestovány tři typy tuhých fází různé polarity vhodných pro extrakci léčiva, řada elučních činidel a byly modifikovány podmínky extrakce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s tuhými fázemi s navázanými kyanopropylovými skupinami a činidlem o složení amoniak 25% : acetonitril 1:3 (v/v). Jako vnitřní standard pro následné chromatografické analýzy amlodipinu s fluorimetrickou detekcí byl navržen pyren, možnost jeho použití byla potvrzena výsledky fluorimetrického stanovení. Metoda optimalizovaná pokusy s modelovými vzorky léčiva rozpuštěného v pufru byla vyzkoušena při práci s reálným biologickým materiálem.

## Úvod

Cílem mé práce bylo najít optimální postup **extrakce na pevných fázích** před další HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) analýzou biologických vzorků obsahujících léčivo **amlodipin**. Extrakce na pevných fázích, jeden z novějších způsobů úprav vzorků, je alternativou klasické extrakce z kapaliny do kapaliny. Jako jiné izolační techniky umožňuje oddělit sledované léčivo od významného podílu biologické matrix<sup>1</sup> - proteinů, částic lipidů, interferujících chemických individuů komplikujících přesná stanovení analytů ve vzorcích. Při práci jsem vycházela ze znalosti chemické struktury léčiva amlodipinu (zvažovala jsem například možnosti reaktivity bazické aminoskupiny), ze schopnosti látky fluoreskovat, z poznatků experimentátorů, kteří se zabývali danou problematikou dříve.

Má práce přinesla poznatky, které mohou být dále využity pro stanovení amlodipinu v biologických vzorcích. Práce byla vykonávána jako součást výzkumných aktivit výzkumného centra LN00B125.

---

<sup>1</sup> „matrix“ - pro celou práci se používá anglického výrazu v jediném gramatickém tvaru.

## **Teoretická část**

### **I. IZOLACE ANALYTŮ POMOCÍ EXTRAKCE NA PEVNÝCH FÁZÍCH**

#### **Základní přehled a pojmy**

Tato část se věnuje extrakci na pevných fázích (solid phase extraction - SPE), technice využívající doposud především na silikagel navázané fáze. Definuje SPE a dává nahlédnout do její pozice mezi ostatními izolačními přístupy. Pozornost je věnována různým typům sorbentů, které jsou v současnosti k dispozici, popisu typické extrakční kolonky, hrubým rysům SPE v off-line uspořádání. Zohledněny jsou rovněž parametry SPE jako jsou průtoková rychlost, kapacita sorbentů a další významné faktory, které ovlivňují vývoj metodiky.

Součástí teorie SPE je také vysvětlení rozličných mechanismů vazeb na používané sorbenty a selektivita funkčních skupin sorbentů při interakcích s matrix vzorků, analyzovanou látkou a pevnou fází. Selektivita může být zvyšována použitím kombinací pevných fází, iontově-výměnou SPE nebo změnou rozpouštědla.

Zmíněny jsou také dva kritické body technologie extrakce na pevných fázích, jmenovitě rozdíly mezi jednotlivými šaržemi sorbentů téhož výrobce a variabilita kolonek pro SPE vyráběných různými výrobci. Určitá část teoretického přehledu se zabývá možností automatizace techniky a v současnosti dostupným vybavením pro off-line a on-line SPE. V závěru je naznačeno využití SPE v praxi.

#### **Cíle a klasifikace úprav vzorků biologických tekutin**

Kvantitativní a kvalitativní analýzy některých sloučenin v biologických materiálech zpravidla vyžadují předseparaci sledovaného analytu (léčiva nebo jeho metabolitů) před vlastní analýzou. Hlavním cílem izolačního kroku v rámci analýz je přizpůsobit tu část vzorku, kterou si přejeme získat, analýzám následným. Izolace mohou zahrnovat oddělení požadované látky od součástí matrix vzorku, zakoncentrování analytu, dílčí frakcionace vzorku, anebo kombinace těchto procesů. Míra oddělení, vyčištění a zkoncentrování sledované substance ve vzorku je určena několika faktory:

- samotnou matrix testovaného materiálu (jejím kvalitativním i kvantitativním složením),
- koncentrací analytu v základu,
- selektivitou a sensitivitou požadovanou v následných analýzách,
- nároky vlastního testování ( např. screening, kvalitativní nebo kvantitativní analýza).

Předúpravy vzorků zahrnují mnoho rozdílných technik, z nichž každá může být, vzhledem ke své funkci v analýzách, klasifikována do jedné ze čtyř hlavních skupin.

První skupina sestává z technik, které usilují o uvolnění analyzované substance z biologického základu a které využívají hydrolýzu pomocí kyselin, zásad nebo enzymatické štěpení vodou. Druhá v sobě nese všechny metody odstraňování endogenních sloučenin jako jsou deproteinace, dialýza, extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na pevných fázích (SPE). Třetí skupina používaných technik pracuje s kapalným skupenstvím, podrobuje vzorek ředění, odpařování, rozpouštění, filtraci apod. Konečně čtvrtá skupina úprav používá pro zvýšení selektivity a citlivosti analýz derivatizaci, ať už před nebo po aplikaci látek na extrakční kolonku<sup>[1]</sup>.

### **Definice extrakce na pevných fázích (SPE)**

SPE spočívá v přivedení kapalné nebo plynné analyzované směsi do kontaktu s pevnou fází, případně s (ad)sorbentem, na jehož pevný povrch je analyt selektivně nachytán. K vymytí analytu, popř. interferujících složek, se dále používají vhodná rozpouštědla. První rozpouštědlo je zpravidla určeno k vymytí případně absorbovaných složek biologické matrix; po něm přivedené eluční činidlo způsobí selektivní desorpci analyzované látky<sup>[2]</sup>.

Extrakce na pevných fázích je pojem, se kterým se setkáváme v literatuře poměrně často, existují však další synonyma označující tuto techniku, např. extrakce kapalina-pevná látka (liquid-solid extraction, zdůrazňující použití kapalin jako elučních činidel namísto plynů), kolonová extrakce (column extraction), digitální chromatografie, extrakce s vázanými fázemi (kladoucí důraz na fáze navázané na silikagel)<sup>[3]</sup>.



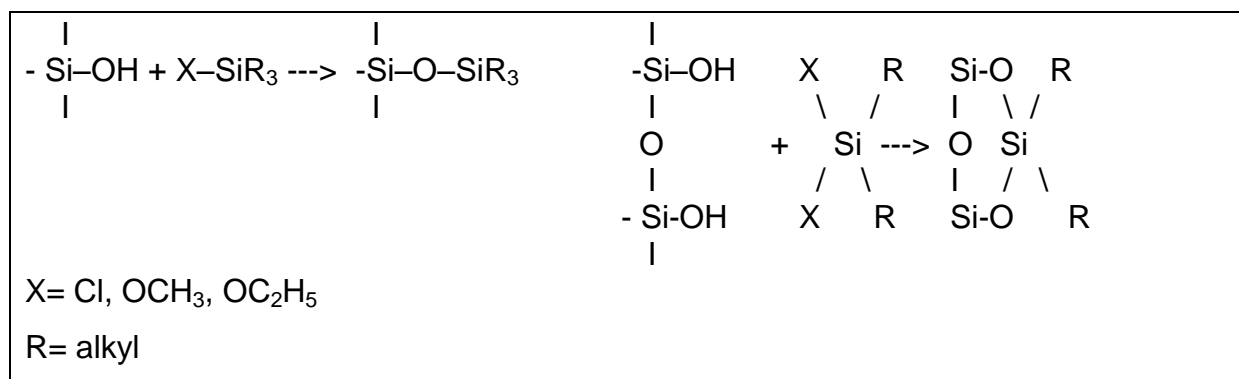
## Některé typy pevných fází a jejich syntéza

Klasické adsorpční materiály, např. aktivní uhlí, magnesium silikát (Florisil), alumina (oxid hlinitý), celuloza nebo makrozesítěné polymery a iontově-výměnné pryskyřice, se používají už řadu let. Zhruba před dvaceti lety byly světu představeny nové pevné fáze pro selektivní adsorpce, materiály s rozličnými funkčními skupinami navázanými na silikagelové částice. Právě tyto tuhé fáze patří v současné technologii SPE k nejpoužívanějším. Vzhledem k jejich důležitosti je vhodné je podrobněji popsat. Existují i další typy pevných fází a lze očekávat, že některé z nich, například polymerní materiály, se v budoucnu stanou ještě významnějšími. Stejně tak v rámci anorganických analýz se začínají stále více uplatňovat komplexotvorné sorbenty jako jsou 8-hydroxychinolinové nebo i křemičitanové či bis(2-ethylhexyl)hydrogenfosfátové fáze nanášené na polymerní matrix.

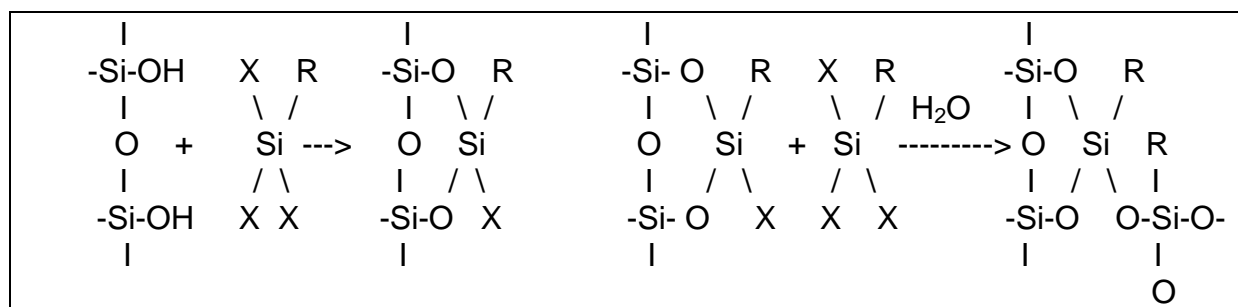
Chemicky vázané pevné fáze používané při SPE jsou podobné chemicky vázaným stacionárním fázím používaným v kapalinové chromatografii. Liší se zejména rozměrem částic silikagelu, které tvoří základ sorbentu. Pro SPE jsou běžné nepravidelné částice o průměru 30 až 60  $\mu\text{m}$ , zatímco částičky sorbentů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii dosahují obvykle průměru od 3 do 10  $\mu\text{m}$ , a jejich tvar je nepravidelný nebo sférický.

Na silikagel chemicky vázané fáze jsou syntetizovány reakcí povrchových silanolových skupin s chloroalkyl- nebo alkoxy-silany <sup>[4]</sup>.

Obr. 1a: Reakce silanu s jednou, dvěma či třemi silanolovými funkčními skupinami vedoucí k tvorbě jednovrstevných sorbentů.

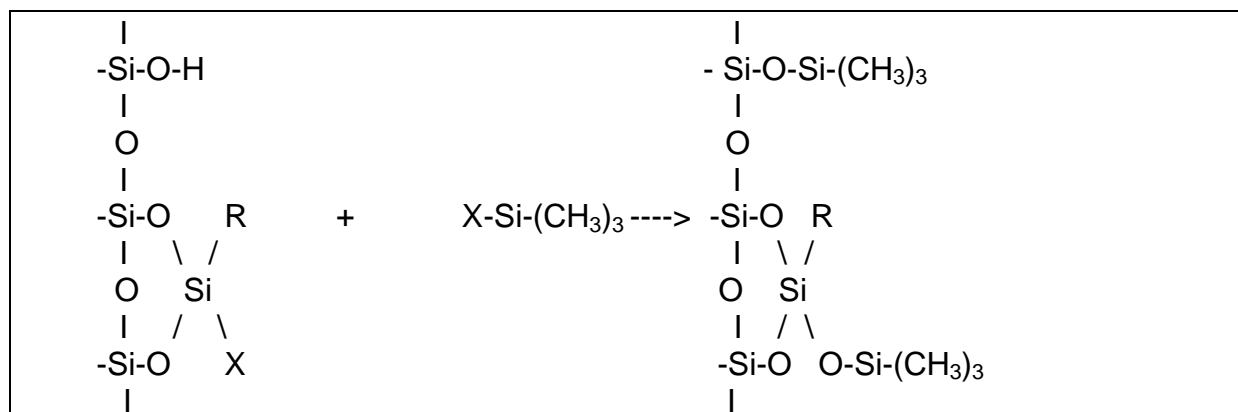


Obr. 1b: Reakce tuhého povrchu s bi- a trifunkčními silany vedoucí ke vzniku polymerních vrstev sorbentu.



Tyto reakce s jednou funkční silanolovou skupinou mohou vyústit v pouze jednovrstevný materiál, zatímco s dvou nebo třífunkčními silany se získá jedno nebo vícevrstevný adsorbent v závislosti na reakčních podmínkách. V průběhu syntéz se nedaří pokrýt celý povrch silikagelu alkylovými řetězci (prostřednictvím Si-O-Si-C vazeb); tím zůstávají do prostoru orientována volná silanolová seskupení. Ta jsou polární a vytvářejí na povrchu sorbentu kyselá místa, která mohou interagovat s některými složitými analyty. Z tohoto důvodu jsou některé pevné fáze "endcappovány", tj. vhodným způsobem jsou maskovány volné silanolové skupiny. Maskovací reakce zbylých alkoholových skupin silanu se provádí s trimethylchlorsilanem<sup>[5]</sup>.

Obr. 2: Maskování koncových silanolových skupin trimethylchlorsilanem.



Tato malá molekula se může spojit s povrchovými silanolovými skupinami, zatímco větším strukturám stericky brání v přístupu k aktuálnímu povrchu dlouhé chloralkylsilanolové řetězce. I přes veškerou snahu zůstává po reakci s trimethylchlorsilanem ještě asi kolem 30% silanolových skupin beze změny. Nechráněné skupiny pak mohou způsobit obtíže během extrakcí.

Chemicky vázané pevné fáze se širokým rozmezím funkčnosti jsou připravovány také v závislosti na původu organochlorsilanového činidla. Běžně jsou tyto fáze rozdělovány do tří skupin s ohledem na hlavní mechanismus jejich účinku:

- 1) nepolární sorbenty,
- 2) polární sorbenty,
- 3) iontově-výměnné pryskyřice.

Analogicky jako je tomu u HPLC, se obvykle rozlišují dva způsoby provedení SPE: totiž na obrácených fázích (reversed phase, RP), kdy nepolární sorbent váže sloučeniny z polárního media, a na normálních fázích, pokud spolu reagují polární sorbent a látky rozptýlené v nepolárním rozpouštědle.

Vedle klasických sorbentů tří výše uvedených skupin, existují fáze se smíšenou funkcí, které nabízejí jak polární, tak iontově-výměnnou adsorpci. Hodně se jich používá především ve screeningových metodách. Poměrně široké spektrum v současnosti komerčně dostupných sorbentů tedy umožňuje značně selektivní extrakce. Tuto selektivitu se daří ještě dále zvýšit zaváděním silikagelů schopných vazby s konkrétním analytem; např. kyselina fenylboritá se používá pro selektivní extrakce molekul s cis nebo koplanárními přiléhajícími hydroxylovými skupinami (katecholaminy, sacharidy, nukleotidy, některé steroidy)<sup>[6]</sup>. Vysoké selektivity se dále dosahuje s SPE fázemi s navázanými kovy: iontově-výměnná část nebo část vyměňující ligandy je vázaná na silikagel jako iont kovu [např. Hg(II), Ag(I), Pt(IV)]. Interakce potom spočívá v tvorbě komplexu mezi kovovým iontem imobilizovaným v sorbentu a analyzovanou látkou.

### **Používání SPE kolonek**

Původní provedení SPE bylo zejména statické, založené na provádění extrakcí v celých šaržích, popř. na jednotlivých extrakcích konkrétních vzorků. To znamená, že v tomto případě dochází ke smísení sorbentu a testovaného roztoku nebo rozpouštědla ve speciální kolonce tvaru tuby a k oddělení obou fází cestou centrifugace či filtrací. Příkladem takových extrakcí v celých šaržích jsou izolace katecholaminů na alumině (oxidu hlinitém)<sup>[7]</sup>. Jiná, alternativní a dynamická metoda

nechá testovaný roztok, eluční činidlo a další látky, protáhnout sorbentem naplněným do kolonky. Tento druhý přístup je v současné době preferován.

Sorbent může být do extrakčních kolonek vpraven manuálně, v suchém stavu, nebo ve formě suspenze, kdy se plní nebo vylije do rezervoáru injekční stříkačky. Vedle toho někteří výrobci nabízejí extrakční kolonky pro SPE na jednorázové použití, případně vyměnitelné náplně (patrony do kolonek) obsahující různá množství pevné fáze, která je natlačena mezi dvěma fritami (vyráběné z polyethylenu, čisté oceli nebo PTFE - polytetrafluorethylenu). Hromadně vyráběné kolonky jsou k dispozici v různých velikostech: množství naneseného sorbentu se pohybuje mezi 50 mg až 10 g a korespondující objemy rezervoárů se různí od 1 ml k 60 ml. Větší objemy testovaných kapalných vzorků je možné zpracovat pomocí SPE kolonek se speciálním nástavcem, který vede na kolonku velká množství tekutin, nebo opakovaně plní rezervoár sledovaným vzorkem. Tvary kolonek se mohou lišit v závislosti na pojetí výrobce, také způsoby vedení vzorku na kolonky jsou různé. Roztoky mohou být protlačovány kolonkou za použití vakua, speciální zařízení nabízejí možnost zpracování kolem 8 až 30 vzorků současně. Jiná cesta představuje průchod roztoků sorbentem během centrifugace. Pro ilustraci uvádím obrázek nejpoužívanějších typů kolonek pro SPE.

Obr. 3 vyměnitelné kolonky pro SPE.



Další kolonky, pokud jde o velikost a tvar, jsou kompatibilní s automatickou linkou nebo jsou speciálně upraveny pro práci robotických systémů.

Zatím nejnovějším způsobem přípravy sorbentů pro SPE je jejich nanesení na disky, které se podobají membránovým filtrům. Silikagel je zde impregnován do základní vrstvy PTFE (teflonové matrix).

## SPE v praxi

Každá extrakce na pevných fázích, zejména ta, která probíhá na tuhých fázích se silikagelem, by měla zahrnovat těchto pět hlavních kroků:

### 1) *Zvlhčení sorbentu*

Nejprve je vhodný roztok, který je kompatibilní s alkylovými řetězci chemicky vázanými na křemelinu, přiveden do kontaktu s tuhou fází. Suché alkylové řetězce jsou totiž zhroucené na povrchu křemičitanové matrice a zkroucené do spirál. Pokud se ovšem dostanou do kontaktu s vhodnou smáčejí kapalinou, jsou jí solvatovány a rozestřou se do široka z povrchu sorbentu, řetězce se doslova jakoby naježí do prostoru a mohou tak lépe zachytit například analyzovanou sloučeninu. Je také důležité, aby sorbent zůstal vlhký i v průběhu následujících kroků SPE. Vynechání zvlhčení tuhé fáze většinou vede k neúspěchu, nízkým výtěžkům analytu po extrakci. Obecně se doporučuje nepolární a iontově-výměnné sorbenty předem navlhčit směsí: voda a nějaké s vodou mísitelné rozpouštědlo, např. voda a methanol v poměru 1:2 (v/v)<sup>[8]</sup>. Při uspořádání na normálních fázích, tj. s polárními sorbenty, je vhodné použít některé nepolární rozpouštědlo (např. činidlo, ve kterém je analyzovaná látka dobře rozpustná).

### 2) *Kondicionace*

V této fázi je činidlo nebo pufr podobný extrahovanému roztoku protlačen extrakční kolonkou. V uspořádání s obrácenými fázemi může být směs používaná ke kondicionaci sorbentu nahrazena vodou nebo pufrovací roztokem. Používání iontově-výměnných pryskyřic vyžaduje kondicionaci puftrem o konstantním pH, při kterém mají analyt a funkční iontové skupiny sorbentu opačný náboj. Také tento krok má v rámci SPE svůj význam, jeho opominutí vede k nižší extrakční účinnosti. Někdy se stává, že zvláště první nanášená množství extrahované látky na sorbent nejsou zadržována, nanášený roztok působí sám zpočátku jako kondicionační činidlo, teprve později je extrahovaná látka zadržována a účinnost extrakce se zvyšuje.

### 3) *Adsorpce*

Roztok s materiálem určeným k izolaci je protlačován rezervoárem obsahujícím sorbent konstantní průtokovou rychlostí. Analyt se váže na tuhou fázi. K dosažení maximální retence sledované látky je nutné přizpůsobit vlastnosti extrahované směsi konkrétním reakčním podmínkám (úpravy zahrnují změnu pH, polaritu či viskozity extrahovaného media).

### 4) *Vymývací krok*

Vnesení vhodného rozpouštědla na sorbent má odstranit interferující sloučeniny ze vzorku, zatímco analyt zůstává vázaný na pevnou fázi.

### 5) *Eluce*

V tomto posledním kroku se izolovaná látka desorbuje, opouští pevnou fázi a je odplavena vhodným elučním činidlem.

## **Vývoj metodiky a mechanismy interakcí**

Selektivita každé SPE procedury závisí na zvolené pevné fázi a činidlech používaných v průběhu adsorpce, vymývání a eluce. Vývoj nové metodiky SPE pro konkrétní analyzovanou látku vyžaduje vždy zvolit vhodný sorbent pro danou látku, stejně jako optimální adsorpční, vymývací a eluční podmínky. Důležité je také správně posoudit možné interakce a mechanismy těchto interakcí, ke kterým dochází mezi analyzovanou látkou, matrix a sorbentem zakotveným v pevné fázi.

U analyzované sloučeniny jsou posuzovány její vlastnosti a to především: pKa hodnota pokud je známa, rozpustnost, molekulová hmotnost a polarita, struktura dané látky, přítomnost kyselých či bazických funkčních skupin v molekule.

U matrix vzorku může někdy dojít k problémům způsobeným s analytem ko-extrahovatelnými sloučeninami, záleží rovněž na polaritě pozadí.

Pokud je analyzovaná látka následně podrobena chromatografickému hodnocení, zvažujeme také data, ze kterých vychází HPLC systém (používaná stacionární fáze a retenční čas).

Pro nalezení správné metodiky SPE je podstatná především znalost mechanismů, pomocí nichž se analyzovaná substance může adsorbovat na pevnou fázi: **síly van der Waalsovy** patří mezi nesespecifické přitažlivé interakce, ke kterým dochází mezi dvěma atomy vzdálenými na 0,3 – 0,4 nm. Stávají se významnými, pokud značné množství atomů studované látky přichází do kontaktu s množstvím jednotlivých atomů sorpčního činidla, které se nacházejí ve stericky výhodném uspořádání. **Hydrofobní interakce** jsou v podstatě van der Waalsovými silami mezi nepolárními skupinami (nepolární analyt a nepolární povrch sorbentu), které jsou podporovány polárním rozpouštědlem (vodou). Vzhledem k vysoké afinitě mezi jednotlivými molekulami vody (podmíněnou vodíkovými můstky) jsou apolární molekuly vytlačovány z vody a jeví tendenci se sdružovat právě prostřednictvím hydrofobních interakcí. Takovéto nepolární vazebné síly, slabé a nesespecifické, jsou typické pro uhlovodíkové řetězce vázané na povrch silikagelu, které jejich prostřednictvím na sebe váží uhlovodíkové skelety analyzovaných sloučenin. Narušení těchto vazeb může být lehce dosaženo náhradou molekul vody, orientovaných ve vrstvě kolem analyzované látky adsorbované na uhlíkový řetězec povrchu tuhé fáze, molekulami méně polárního rozpouštědla.

Polární vazebné interakce zahrnují vodíkové můstky, interakce dipól-dipól a indukovaný dipól-dipól interakce mezi dvěma fázemi. **Vodíková vazba** je specifická silná interakce mezi dvěma permanentními dipóly, kdy vodíkový atom vytváří můstek mezi dvěma silně elektronegativními atomy (např. O, F, nebo N atomy). Takovéto polární interakce se vyskytují na pevných fázích ze silikagelu, nebo sorbentech obsahujících kyano, diolové či amino funkční skupiny a jsou zvýrazněny v nepolárních prostředích. Jejich vazebná energie je poněkud vyšší než je tomu u nepolárních látek.

Tabulka 1 uvádí vybrané vazebné interakce a jim odpovídající vazebné energie.

Tabulka 1: Vazebné interakce a jim odpovídající vazebné energie

Mechanismy interakcí	Vazebná energie v kJ/mol
hydrofobní interakce	4 – 20
polární vodíkové vazby	20 – 40
dipól-dipól interakce	10 - 40
indukovaný dipól-dipól interakce	8 - 25
iontová vazba	200 - 1050
kovalentní vazba	410 – 3360

Pro iontově-výměnnou SPE jsou výhodné analyty, které lze poměrně snadno ionizovat. Nabízejí tak možnost velmi silné a selektivní iontové retence na tuhých fázích, kdy ionizované funkční skupiny iontově-výměnných pryskyřic se váží s analytem **elektrostatickou vazbou**. Porušení této vazby vyžaduje změnu pH a potlačení iontového charakteru analyzované látky, sorbentu, nebo použití specifického iontu, který bude působit na analyt kompetitivně a vytlačí jej z vazby na tuhý povrch.

**Vazby kovalentní** jsou nejsilnější možné vazebné interakce, které nacházíme mezi chemickými individui. Tyto pevné vazby jsou v rámci SPE velmi ojedinělé. Pokud se používají, pak především k očištění vzorků od některých interferujících složek z matrix vzorku. Rovněž se používají k retenci analytů. Existují příklady, kdy byly využity např. k vazbě katecholaminů na fázi s vázanou kyselinou fenyloboritou<sup>[3,6]</sup>.

Pro SPE se používají také některé tuhé fáze s nanesenými kovovými ionty, které sledovanou látku váží **koordinační vazbou**. Tím se vytváří komplex mezi analytem a kovovým iontem navázaným na povrch silikagelu, při iontově-výměnné SPE nebo pro některé ligandy selektivní SPE. Jejich interakce může být narušena změnou pH nebo vnesením ligandů či činidel, která by s analytem soutěžila o vazbu na kov.

Při vývoji metodiky SPE tedy rozhoduje správná volba tuhé fáze, vymývacího a elučního činidla, které jsou vybrány na základě zvážení všech předchozích faktorů.



Je zřejmé, že v průběhu adsorpce je nutné podpořit interakci analyt-sorbent, zatímco interakce matrix-analyt a interakce, ke kterým dochází mezi matrix a sorbentem, by měly být potlačeny. Příkladem běžné vazby mezi matrix vzorku a analyzovanou látkou je vazba na plazmatické bílkoviny. K vazbě mezi matrix a sorbentem často dochází u sloučenin z krve či moči na iontově-výměnných fázích. Úprava vzorku před vlastní izolací sledované substance cestou SPE, zředěním nebo deproteinací či precipitací anorganickými solemi, filtrací, umožňuje snížit riziko nežádoucích interakcí. Na druhou stranu, vazba mezi analytem a tuhou fází může být podpořena úpravou pH či polaritu testovaného roztoku. Změna pH ovlivňuje disociaci molekul a jejich polaritu. Nepolární vazba analytů na nepolární, obrácené fáze může být zlepšena zvýšením polaritu promývacího činidla (nejčastěji přidavkem vody nebo solí). Podobně polární vazba na polární fáze může být zintenzivněna snížením polaritu rozpouštědla pro analyt (tj. odstraněním nadbytku vody, přidavkem méně polárního organického rozpouštědla).

Při výběru vhodného vymývacího a elučního činidla hrají pH, iontová síla a polarita testovaného roztoku také klíčovou roli pro zadrž a vymytí analytu z SPE kolonky.

Vymytí je náročné na optimální nastavení podmínek, při kterých bude zadržen analyt na kolonce, zatímco možné interferující látky odejdou bez interakce. I tento případ opět předpokládá dobrou znalost interferujících sloučenin a vlastností analyzované substance. U kolonek C<sub>18</sub>, jež poutají analyty prostřednictvím van der Waalsových sil, je výběr vymývacího roztoku omezený na polární rozpouštědla, protože snížení jeho polaritu hrozí vymytím analytu společně s interferujícími složkami ze vzorku. Na obrácených fázích je k vymytí často používána voda s obsahem maximálního množství organického rozpouštědla, při kterém je analyzovaná látka ještě adsorbována. Naopak polární náplně pro SPE mohou být vymývány vhodnými nepolárními, organickými rozpouštědly. Při iontově-výměnných extrakcích, kdy sorbent působí na analyt silnými elektrostatickými interakcemi, mohou být sorbenty promývány polárními, stejně tak jako nepolárními rozpouštědly k odstranění obou, polárních i nepolárních nečistot ze vzorku.

Eluční činidlo, které má odpoutat analyzovanou sloučeninu z povrchu tuhé fáze, má být použito v co nejmenším ještě účinném množství, aby se tak předešlo přílišnému zředění vzorku. Případná následná procedura koncentrování testovaných roztoků dál prodlužuje celkový čas analýzy. Eluční podmínky jsou zcela odlišné od

těch, které vyžaduje adsorpce analytu. Například pokud je požadována vysoká polarita rozpouštědel v průběhu adsorpce, potom eluční krok bude usnadněn právě málo polárním elučním činidlem a naopak. Disperzní síly, jež poutají analyty na povrch apolární tuhé fáze, mohou být porušeny organickým, nepolárním rozpouštědlem (acetonitril, ethyl-acetát, hexan, methylenchlorid), které se dostává do kontaktu s tuhým povrchem. Pro polární interakce je vhodným elučním médiem voda, methanol, 2 – propanol, kyselina octová, některé aminy a pufrы o vysoké iontové síle. K vymytí sloučenin z iontově-výměnných tuhých povrchů je nutná úprava pH elučního činidla tak, aby analyt nebo vázané funkční skupiny pevné fáze ztratily svůj náboj, případně je možné použít látku, která svou vyšší afinitou k pryskyřici vytěsňuje analyt z vazby na sorbent.

Vedle pH a polarity činidla berou rozvahy o optimální SPE metodice v potaz také následné kvalitativní či kvantitativní analýzy látek po jejich izolaci extrakcí. Pokud bude extrakt později podroben HPLC, eluční síla rozpouštědla používaného pro SPE musí být nižší, nebo maximálně rovna síle, kterou vyvíjí mobilní fáze při rozdělování na chromatografické koloně, aby se zabránilo chvostování píků. Dále mohou být extrakty zředěovány mobilní fází apod.

Vyvinout novou SPE proceduru není vždy jednoduché. Většina z používaných tuhých fází je schopna poutat sloučeniny více než jedním vazebným mechanismem. Například u nepolárních sorbentů  $C_8$  očekáváme primárně vazebnou interakci prostřednictvím nepolárních vazeb. Vedle nich se ale uplatňují také vazby polární, způsobené volnými silanolovými funkčními skupinami, které ční do prostoru nad povrchem pevné fáze, a které se nikdy nepodaří stoprocentně obsadit při syntéze danou chemicky vázanou fází. Jiné sorbenty, jako jsou aminopropylové, vykazují až tři typy vazebných interakcí, které se uplatňují vedle sebe: aniontová výměna na aminopropylové funkční skupině, nepolární vazby mezi uhlíkovými řetězci a polární interakce na koncových silanolových skupinách. Míra závažnosti sekundárních interakcí způsobených zbytkovými silanolovými skupinami u silikagelových tuhých fází koreluje se stupněm sterického stínění, kterému jsou vystaveny. Koncové funkční skupiny silanu se stávají méně přístupnými např. u  $C_{18}$ -sorbentů nebo v případě fází s navázanou kyano skupinou. Tyto vedlejší interakce se stávají významnými v momentě, kdy extrakce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analyzované látky a na podmínkách kvalitní adsorpce. Silanolová aktivita může být mj. snížena maskováním kyselých míst vhodnou kladně nabitou zásaditou částicí,

kteřou je nutno přivést do kontaktu s tuhou fází v průběhu kondicionace, nebo prací při takovém pH, při němž zůstanou koncové silanolové skupiny bez náboje.

Hodnocení izolačního postupu během vývoje metodiky v sobě nese rovněž sledování veškerých případných ztrát a určení extrakční účinnosti (recovery) pro uvažovanou látku. Toto hodnocení lze realizovat například průběžným sběrem a uchováním rozpouštědel používaných v jednotlivých krocích SPE technologie a jejich analýzou (měření přítomných množství analytu) například s využitím HPLC. I zde mohou nastat v praxi některé obtíže. Tekutina nasbíraná po adsorpci na tuhou fází, obsahuje stále vysoké koncentrace interferujících sloučenin z matrix vzorku, což má za následek množství vedlejších píků na výstupu z HPLC analýzy. Někteří autoři v takovém případě doporučují použít radioaktivně značených forem analytu, které mohou být dále kvantifikovány scintilační metodou<sup>[2]</sup>.

### **Selektivita SPE**

Selektivita sorbentu (nebo také vymývacího roztoku či elučního činidla), tedy schopnost správného a přesného oddělení hodnocené látky v přítomnosti jiných složek biologické matrice, je v případě SPE určena rozdílnou afinitou tuhé fáze k analyzované látce a k interferujícím sloučeninám ze vzorku.

Za všeobecně nejméně selektivní jsou považovány pevné fáze C<sub>18</sub>, kdy téměř všechny molekuly (hodnocené sloučeniny a vedle nich lipidy, proteiny aj. látky ze vzorku) mohou být do jisté míry poutány van der Waalsovými silami. Selektivita SPE se zvýší s přechodem k nepolárním sorbentům obsahujícím pouze krátké alkylové řetězce. Pro lipofilní látky, které nevykazují významné interakce se selektivními fázemi (iontově-výměnnými, kovalentními), doporučuje Doyle<sup>[9]</sup> vyzkoušet C<sub>2</sub>-pevnou fází namísto C<sub>18</sub>. Fáze C<sub>2</sub> jsou často dostatečně „polární“, aby na sebe vázaly hodnocenou sloučeninu, zatímco endogenní interferující substance projdou bez zadržení. Další výhodou je, že C<sub>2</sub> sorbenty nevykazují téměř žádné sekundární interakce na koncových silanolových skupinách. Podobně je možné zvýšit selektivitu SPE na středně polárních pevných fázích. Příkladem je práce Musche a Massarta<sup>[10]</sup>, kteří zkoušeli SPE metodu pro izolaci bazických léčiv z vodného prostředí a dále z plazmy za použití kyanosorbentů. Výsledkem byly velmi čisté extrakty. Jiná je úvaha v případě ionizovatelných hodnocených sloučenin, neboť

právě iontově-výměnnou extrakcí se dosahuje velmi vysoké selektivity. Je docela jednoduché zobecnit, že selektivita SPE metody se zvyšuje se stoupající silou vazebných interakcí mezi analytem a tuhou fází, avšak zároveň přímo závisí také na matrix hodnoceného materiálu. Proto, zda SPE ionizovatelné sloučeniny na iontoměničích bude selektivní nebo ne, záleží na iontové síle matrix a afinitě ostatních iontů přítomných v roztoku k iontovýměnnému sorbentu.

Nejvyšší selektivity se dosahuje cestou kovalentní vazby na speciální sorbenty. Vazebná energie kovalentní interakce dalece přesahuje možnosti, jakými by mohly extrakci ovlivnit sloučeniny z matrix vzorku. Použití sorbentů s vázanými kovy patří mezi vysoce selektivní SPE metody. Přichází ke slovu v případě, že testované vzorky obsahují velmi nízké koncentrace ligandů-analytů schopných vazby na imobilizovaný kov. Příkladem takové vysoce selektivní extrakce může být očištění říční vody od anilinů, které interferovaly se stanovením herbicidů (derivátů fenylnmočoviny), a které se podařilo navázat na Pt<sup>IV</sup> obsazený silikagel. Zde platina vytvořila komplex s primárními aminy – aniliny, zatímco deriváty fenylnmočoviny procházely sorbentem beze změny<sup>[11]</sup>.

Pokud jediný sorbent nezajistí dostatečnou selektivitu, je výhodné použít k izolaci dva a více sorbentů, které by se vzájemně doplňovaly. Každý z nich pak často funguje na jiném principu vazebného mechanismu. Kombinaci nepolární extrakce a za ní zařazené iontově-výměnné kolony využil například Süß<sup>[12]</sup>, když extrahoval benperidol z krevní plazmy. Bradbury<sup>[13]</sup> popisuje dvojnásobnou extrakci 25-hydroxyvitaminu D a jeho metabolitů z plazmy s použitím C<sub>18</sub> sorbentu následovaného polárním silikagelem.

Pro nízkomolekulární, iontové nebo lehce polární sloučeniny platí, že jejich retence na nepolární sorbenty může být zvýšena cestou iontově párového uspořádání SPE. Princip iontově-párové kapalinové chromatografie<sup>[4]</sup> je lehce aplikovatelný na SPE kolony. Protiiont o opačném náboji, než jaký nese analyzovaná látka, je adsorbován na povrch tuhé fáze v průběhu kondicionace a přidává se do zkoušeného roztoku, případně do vymývacího roztoku. Činidla musí být vhodně pufrována, aby při daném pH nesl analyt i protiiont náboj. Iontový pár, který vzniká, je potom méně polární než výchozí forma analytu a proto je lépe zadržován na kolonce prostřednictvím van der Waalsových přitažlivých sil.

Desorpce se dosahuje použitím organického rozpouštědla. Opačně nabité ionty používané v rámci SPE jsou v současnosti totožné s těmi, jaké využívá iontově párová HPLC (např. alkylamoniové soli pro vazbu s kyselinami, alkylsulfonáty pro bazické sloučeniny). Touto metodou iontově párové SPE byly extrahovány například konzervanty a umělé sladidlo sacharin z potravin<sup>[14]</sup>, nebo vinca alkaloidy ze séra a moči<sup>[15]</sup>.

Ačkoliv jsou C<sub>18</sub> tuhé fáze používány hlavně v RP uspořádání (RP - reverzní fáze) a kyano sorbenty pro normálně vedenou SPE, v literatuře byly popsány ještě některé další způsoby, které dále přispívají ke zvýšení selektivity SPE. Při běžné SPE rozpouštědlo použité k převedení hodnocené látky do roztoku normálně určuje způsob extrakce (obrácené fáze v případě vodných roztoků a normální fáze pro nepolární činidla). Alternativou je metoda, kdy je v průběhu extrakce sorbent dokonale vysušen profouknutím vzduchu skrze svou vrstvu a tak jsou nastaveny podmínky pro změnu rozpouštědla (z polárního na nepolární a naopak). Literatura uvádí příklad, kdy autoři metody Lehr a Damm<sup>[16]</sup> provedli podobnou záměnu rozpouštědel v průběhu extrakce širokospektrého antimykotika – cyklopiroxy z krevní plazmy. Methylový derivát léčiva rozpuštěný v hexanu nejprve navázali na povrch CN tuhé fáze, vymyli toluenem a potom vysušili sorbent profouknutím vzduchem. Následně získali léčivo elucí směsí voda-acetonitril.

V některých opodstatněných případech bývá SPE kombinována s další izolační technikou jako je deproteinace, vysolování nebo extrakce z kapaliny do kapaliny, které přinášejí další zvýšení selektivity.

### **Průtoková rychlost během SPE**

Význam průtokové rychlosti rozpouštědel a činidel používaných v rámci SPE, a nutnost její stálé kontroly během extrakce, nebývá v dostupné literatuře hned na první pohled patrný. Někteří autoři článků vztahujících se k metodologii SPE hovoří o rychlostech, při kterých pracovali, často jen v náznacích nebo vůbec. Nelze ani příliš zobecňovat pravidla, kterými se řídí nastavování vhodných rychlostních podmínek při extrakci na tuhých fázích. Nicméně příklady z literatury napovídají: Junk a Richard<sup>[17]</sup>, kteří extrahovali pesticidy z vody na C<sub>18</sub> sorbentech, našli

optimální průtokovou rychlost těmito sorbenty kolem 250 ml/min. Podle nich při takové rychlosti ještě nedochází k nežádoucímu snížení extrakční účinnosti. Ze své zkušenosti mluví o tom, že C<sub>18</sub> sorbenty v podobě malých částic s velkým povrchem zajistí dobrý kontakt mezi analyty a funkčními alkyly tuhé fáze i při vysokých průtokových rychlostech. Na druhou stranu jiní autoři prohlašují, že právě vyšší rychlost průtoku může extrakční účinnost negativně ovlivnit, neboť jak adsorpce, tak eluce jsou rovnovážné procesy, které probíhají na povrchu tuhé fáze. Tato rovnováha podle nich při vysokých rychlostech průtoku činidel nebude nikdy existovat a výsledkem zrychlených extrakcí mohou být pouze nižší výtěžky analytu a větší spotřeba elučních činidel <sup>[1]</sup>. Obecně je doporučováno držet průtokovou rychlost na nízkých hodnotách kolem 2 ml/min <sup>[18]</sup> nebo při použití vakua pracovat s tlaky nižšími než 30 kPa <sup>[1]</sup>.

### **Kapacita jednorázových SPE kolonek**

Kapacita sorbentů používaných do průmyslově vyráběných SPE kolonek, jejichž účinnost výrobce zpravidla garantuje pro jednorázové užití, může být definována jako maximální množství látky (hodnocených sloučenin, nečistot, vedlejších produktů reakcí), které je dané množství sorbentu schopno vázat ze specifického testovaného roztoku. Tato kapacita závisí na typu použité tuhé fáze, ale i na charakteru hodnocené substance, jejíž vlastnosti se odvíjejí od pro SPE použitých rozpouštědel a složení biologického základu vzorku. Kapacita nejpoužívanějších silikagelem plněných kolonek se pohybuje v řádu mg až g <sup>[5]</sup> hmotnosti náplně. A protože koncentrace řady analyzovaných látek v biologických materiálech nebo ve vzorcích ze životního prostředí či analýzy potravin se často pohybují v ng/ml, zatímco množství vzorků přiváděných na kolonku jsou velká, výrobci SPE kolonek se jejich kapacitou snaží vyhovět řadě těchto aplikací. Sorbenty naplněné do kolonek musí často umožnit vazbu jak samotného analytu v mikroskopických dávkách, tak i nečistot na svůj povrch. Jednotlivé sloučeniny jsou potom z kolonek vymývány postupně selektivními elučními činidly. Jaká množství sorbentu do kolonky tedy použít? Volba většího množství sorbentu (např. 1 g namísto 100 mg) má význam v případě extrakcí velkých objemů (stanovení

některých organických sloučenin v odpadních vodách) nebo pokud lze tímto způsobem kompenzovat malou afinitu hodnoceného cíle k tuhému povrchu.

Jestliže jsou totiž velká množství testovaného vzorku aplikována na extrakční kolonku s nedostačující kapacitou, dochází k jevům, které připomínají principy tenkovrstvé chromatografie. Na „startu“ jsou nejprve zadržována malá množství analytu, ale jak extrakce pokračuje, váží se postupně další množství látky na povrch tuhé fáze, až ji úplně nasytí a zbývající molekuly odcházejí z kolonky ven, aniž by se navázaly. Tyto jevy nastávají častěji u slabě vázaných analytů. Zde je tedy nutno použít větší množství tuhé fáze a tím podpořit retenci. Na druhou stranu je třeba zdůraznit, že větší význam než množství použité tuhé fáze na rozsah adsorpce má samozřejmě mechanismus, kterým sorbent retenci působí a další extrakční podmínky, které mají být optimalizovány už v průběhu vývoje metodiky SPE (vhodné zvlhčení a kondicionace tuhé fáze, činidla, pH testovaného roztoku atd.). Tak mohou i malá množství sorbentu poutat relativně velká kvanta analytu.

Optimální objemy aplikovatelné na konkrétní kolonku s určitým obsahem pevné fáze lze zjistit experimentálně, např. vyhodnocením průtokové křivky na HPLC chromatogramu. Existují rovněž tabulky, ve kterých lze nalézt doporučená množství nebo objemy sorbentů ve vztahu ke konkrétním kolonkám <sup>[19]</sup>.

### **Posílení účinnosti SPE**

Citlivost analytických metod je dána především fyzikálně-chemickými vlastnostmi analyzované látky a systémem, který se použije k detekci, avšak může být dále zlepšena, pokud se vedle selektivního vyčištění vzorku a izolace uvažované množství látky podrobí zkoncentrování. Princip spočívá v použití menšího množství elučního činidla, než je množství hodnoceného vzorku, které je aplikováno na kolonku. V praxi se tento zahušťující krok používá zejména pro zlepšení výsledků některých analýz, nebo při studiích herbicidů a pesticidů ve vodách (pitné, jezerní či říční vodě) <sup>[17]</sup>. V těchto případech přichází na kolonku množství vzorku převyšující 1 litr, zatímco porce elučního činidla není větší než 5 ml.

V biomedicínských aplikacích jsou objemy, které lze získat například od jednoho zvířete po zákroku, limitované na nízká množství biologického materiálu,

proto také maximálně dosažitelná míra zakoncentrování je mnohem nižší než výše uvedená.

Jiný způsob, kterým lze dosáhnout vyšších koncentrací analytu v konečném extraktu, spočívá v použití relativně těkavého, organického rozpouštědla (o nízkém bodu varu) ve fázi SPE eluce. Vzniklý extrakt lze potom poměrně snadno odpařit do sucha a odparek rozpustit v malém množství vhodného rozpouštědla. Určitou nevýhodou zmíněného přístupu může být prodloužení doby nutné k provedení celé extrakce. V některých případech následné analýzy probíhající v režimu HPLC není třeba hledět na množství použitého eluentu. Pokud totiž eluční činidlo působí na analyzovanou látku slabšími silami než mobilní fáze pro HPLC, dochází k zakoncentrování extrahovaných sloučenin na začátku chromatografické kolony.

Nevýhodou zmíněných koncentračních metodik je, že také ostatní interferující sloučeniny ze vzorku se zahustí společně s hodnoceným analytem.

### **Frakcionace vzorků pomocí SPE**

Vedle izolací a purifikací se současná SPE používá také k oddělení jednotlivých frakcí analyzovaných směsí s komplexním složením. Rozdělení na jednotlivé frakce lze dosáhnout s použitím upravených sorbentů, jejichž selektivita k jednotlivým skupinám sloučenin se liší a/nebo s použitím elučních činidel s odlišnou selektivitou k jednotlivým frakcím analytů. Příklad uvádí Lafleur <sup>[20]</sup>, který použil SPE na kyanopropylových tuhých fázích k rozdělení směsi zplodin hoření do čtyř frakcí pomocí elučních činidel o stoupající polaritě. Nejméně polární frakci získal s hexanem - obsahovala alifatické uhlovodíky, alkylsubstituované aromáty a 2 až 3 jaderné aromatické uhlovodíky. Následující podíl obsahoval 3-6 polyaromatické uhlovodíky eluované benzenem. Další frakci Lafleur eluoval methyldichloridem a získal sloučeniny s obsahem 7-10 aromatických kruhů. Nakonec extrahoval nejpolárnější ze sloučenin hoření methanolem.

Podobně postupovali Doyle a kol. <sup>[9]</sup> při identifikaci barevných aditiv ze vzorků cukroví a želatinových desertů, kteří rozdělili sloučeniny na jednotlivé podíly na C<sub>18</sub>-sorbentech s použitím 2-propanolu a vody smíšených v různém poměru jako elučních činidel.



Komerčně jsou dostupné tzv. pevné fáze se smíšenou funkcí, které nesou jak hydrofobní, tak iontově-výměnnou část, obě ve vazbě na silikagel, takže rozdělení směsí na jednotlivé frakce na nich může probíhat na jediné kolonce, s pouhou úpravou polaritu a pH elučních činidel. Tyto smíšené fáze se někdy uplatňují pro toxikologický screening různě kyselých, neutrálních i bazických léčiv z krevní plazmy či moči.

### **Reprodukovatelnost SPE**

Reprodukovatelnost (popřípadě opakovatelnost) vypovídá o úrovni přesnosti metodiky extrakce na tuhých fázích podobně jako u jiných analytických metod. Při převádění konkrétní SPE metody - vyvinuté na tuhé fázi pocházející od určitého výrobce - na sorbent od jiného výrobce, lze mnohdy pozorovat významné rozdíly v extrakční účinnosti jednotlivých kolonek. Navíc odlišnou účinnost vykazují často i jednotlivé šarže adsorpčních materiálů a kolonek připravovaných jediným výrobcem. Tato variabilita mezi jednotlivými producenty analytických materiálů, ale i variabilita šarží, je dobře známá již ze zkušeností s jednotlivými chromatografickými kolonami pro HPLC. Příprava na silikagel chemicky vázaných fází je společná oběma metodám, totiž HPLC i SPE. Největší podíl na způsobených rozdílech přitom připadá na rozdíly v počtu skupin navázaných na povrch tuhých sorbentů při syntéze a na nedostatečné maskování koncových silanolových skupin. Vedle toho působí na reprodukovatelnost metodiky velikost pórů mezi částicemi sorbentu a také to, zda je struktura chemicky vázaných fází monomerní nebo polymerní. Vinou příliš rozměrných pórů dochází ke zvýšenému krytí tuhé fáze chemicky vázanými skupinami a mění se reprodukovatelnost SPE. Rozdíly pozorované mezi monomery a polymery pokrytými fázemi bývají vysvětlovány odlišným zastoupením a variabilním sterickým stíněním volných silanolů, jejichž přítomnost je odpovědná za silnou ireversibilní vazbu bazických sloučenin. Další faktory, které mohou mít svůj význam ve spojitosti s reprodukovatelností na silikagelových sorbentech, jsou mj.: průměrná velikost částic sorbentu, vedle rozměrů i rozložení pórů mezi částicemi sorbentu, velikost aktuálního povrchu tuhé fáze, metoda použitá při syntéze chemicky vázaných fází a v neposlední řadě také množství sorbentu, které připadá na kolonku (zmíněno dříve).

Někteří výrobci extrakčních kolonek pro SPE opatřují svoje výrobky, každou sadu kolonek zvlášť, soupisem charakteristik, které mají vypovídat o jejich kvalitě. Písemná sdělení obsahují především údaje o distribuci velikosti částic sorbentu a jejich průměrnou velikost, specifický povrch, procento navázané chemické fáze.

### **Kontaminace způsobená kolonkami**

Kontaminace působená společnou elucí látek obsažených v kolonkách spolu s analyty je jedním z problémů SPE. V literatuře se objevují zmínky o těchto nežádoucích vlastnostech kolonek, ale i návody, jak se jim vyvarovat. Prevencí může být řádné promytí kolonek před započítím vlastní extrakce. Junk a kol.<sup>[21]</sup> zkoumali přímo substance, které znepríjemňují extrakční proceduru na C<sub>18</sub> sorbentech v kolonkách opatřených polyethylenovými fritami. Hlavní podíl nečistot tvořily zbytky z polymerační reakce chemicky vázaných fází (alkany a alkeny), plastifikátory a antioxidanty obsažené ve stěnách kolonek. Míra znečištění SPE extraktu potom přímo závisela na pro analyt použitým rozpouštědlem, lišila se od výrobce k výrobcu a lišila se i v rámci jednotlivých šarží kolonek téhož producenta. Firmy, které se zabývají výrobou kolonek pro SPE, odpověděly na tyto obtíže přípravou kolonek z inertního skla s fritami z PTFE<sup>[22]</sup> nebo kolonek z čisté oceli.

### **Automatizace SPE**

Automatické izolace umožňují rutinně zpracovávat velká množství vzorků, mohou probíhat i přes noc. Pro automatickou SPE řazenou před HPLC je typické, že zatímco extrahování z jednoho vzorku ještě probíhá, je předešlé množství analyzované látky identifikováno a kvantifikováno.

Výhodou automaticky řízených analýz není jen vyšší výkonnost, ale i značná konzistence procesu, ve smyslu nižšího výskytu odchylek při stanovení tj. vyšší přesnosti. Vysoký výkon a konstantní výsledky, kterých se dosahuje při automatické SPE, jsou připisovány na vrub omezení počtu manipulací se vzorky. Na rozdíl od klasické metodiky SPE, u níž je nezbytné zachovat kaskádu minimálně pěti hlavních kroků, navíc často doprovázených ještě dalšími úpravami roztoků, jejich zředováním a odpařováním; automatizace postupu šetří čas a počet manipulací se vzorkem se

signifikantně snižuje. On-line SPE vyžaduje pouze vložení definovaných, případně předem centrifugovaných, množství testovaného roztoku do autosampleru.

Pokud se provádí SPE ručně, pracuje se buď s jednotlivými kolonkami naplněnými sorbentem a se speciálním injekčním pístem, kterým se působí na roztoky v kolonce přetlakem, nebo s použitím vakuového zařízení, ve kterém lze zpracovávat podtlakem najednou až 30 vzorků. Dostupné vakuové přístroje existují ve dvojím provedení: v nejjednodušším systému jsou odpady z rozpouštědel sesbírány do odpadní nádoby uvnitř vakua a eluční činidlo s analytem směřováno do zkumavek či vialek, které se vloží do zařízení ještě před aplikací eluentu do kolonky. Jiné systémy obsahují disky, které rotují mezi odpadní a sběrnou polohou. V odpadní poloze činidla protékají kolonkou na dno vakuového zařízení a v další poloze pak dochází k plnění předem připravených zkumavek elučními činidly.

O manuálně prováděné SPE se hovoří jako o off-line metodě, čímž se míní, že vlastní extrakce a následná analýza extraktu probíhají zcela odděleně. Alternativou ručního zpracování vzorků je on-line SPE, kdy eluční činidlo s analyzovanou látkou putuje přímo do chromatografu, kde je analyt podroben identifikaci a kvantifikaci.

Nejlépe automatizované off-line systémy jsou napojené na elektronickou paži. Robot promísí testované roztoky, postupně odebírá potřebná množství extrakčních činidel a přináší je na kolonku, zbytky činidel vede do odpadu, eluáty sbírá do vialek. V robotických systémech bývají kapaliny protlačovány kolonkou nejčastěji přetlakem. Nanášené objemy a volba jednotlivých rozpouštědel, která ve správném čase přicházejí do styku se sorbentem, jsou naprogramovány. Někdy na tyto systémy navazuje filtrace a odpaření elučního činidla ze vzorku, případně také nástřik na chromatografickou kolonu. Posledně jmenovaný případ už ale představuje přechod mezi off-line a on-line uspořádáním procedury. Konečně lze konstatovat, že se systémy využívajícími elektronickou paži, je možné automatizovat prakticky veškerou metodiku vyvinutou pro manuální zpracování vzorků.

Při on-line uspořádání s přepínáním kolon je SPE kolonka umístěna před HPLC kolonou a celé zařízení je rozšířeno o přídatné pumpy a selektivní propust' pro rozpouštědla, o přepínací ventil. V on-line uspořádání je nejprve eluční činidlo pumpováno kolonkou pro SPE a odvedeno do odpadu, potom následuje testovaný roztok, analyt se zachytí na tuhý sorbent a interferující látky jsou svedeny do odpadu vyplachovacím roztokem. Pro adsorpci i vyplachování se používají pouze malá množství činidel, aby se zvýšila pravděpodobnost retence analytu. V další, eluční fázi

přepne systém proudění elučního činidla z SPE kolony na analytickou kolonu. Celá aparatura pracuje s vysokými protlačovacími tlaky a zatímco je látka separována a hodnocena na analytické koloně, probíhá rekondicionace kolony pro SPE.

Někdy jsou SPE kolony napojené na on-line chromatografickou analýzu označovány jako "předkolony" a mohou tak být snadno zaměňovány za předkolony používané v rámci klasické HPLC. M. Moors, D.L. Massart a R.D. McDowall<sup>[2]</sup> doporučují používat termín - "SPE kolon(k)y" - namísto nejednoznačného výrazu předkolony.

Je nasnadě, že on-line SPE přináší řadu výhod oproti klasické SPE manuální. Snižuje počet potřebných manipulací se vzorkem, zlepšuje přesnost následující analýzy, snižuje riziko kontaminace vzorků a riziko člověkem vnesených chyb, zmenšuje celkové laboratorní náklady. Pokud je navíc on-line SPE zařazena přímo před HPLC, přináší ještě další zvýhodnění. Prvně, uzavřený systém téměř neumožňuje kontaminaci vzorku, za druhé tímto způsobem veškeré množství analyzované sloučeniny koncentrované na povrchu tuhé fáze dosahuje analytické kolony. Naproti tomu off-line nebo systémy s robotem napojené na vakuum nemají tak vysokou citlivost, neboť se zatím nedaří dovést totální množství analytu z SPE kolony až na finální kolonu analytickou. Navíc metodiky spojené s odpařováním kapalných rozpouštědel s sebou nesou rizika kontaminací vzorků produkty tepelného rozkladu, s přenášením analytu souvisí možnost významné adsorpce látky na stěny laboratorního skla.

Nevýhodou on-line SPE jsou vyšší nároky na vývoj SPE metodiky, které na ni kladou za SPE nejčastěji zařazené chromatografy. Velice bedlivě se kontrolují objemy používaných činidel, protože přílišná množství rozpouštědel často způsobují chvostování píků při HPLC analýze. Uplatní se i řada dalších faktorů, které ovlivňují HPLC analýzu: délka HPLC kolony, typ přepínání kolon, dopředný nebo zpětný tok rozpouštědel, zda je eluce vedena jako isokratická, gradientová nebo stupňovitá, její trvání. Někdy je nutné ještě před započítáním on-line SPE automatické analýzy upravit vzorek další izolační technikou – deproteinací, popřípadě odstranit suspendované částice.

SPE kolony bývají v rámci on-line zpracování vzorků používány mnohdy několikrát, jejich životnost závisí na složení matrix vzorku, aplikovaných objemech, použitých rozpouštědlech a délce trvání jednotlivých výplachů. Opakovaná použití

kolonek s sebou přináší určité problémy: zejména se hovoří o tzv. "paměťových efektech". Tyto efekty znamenají, že malá množství analytu, která se neodpoutala z povrchu tuhé fáze v předchozí eluci, odcházejí s novou dávkou elučního činidla. Některé fáze pak, především iontově-výměnné pryskyřice a kovové sorbenty nelze dost dobře reaktivovat. Obecně se tedy opakované používání SPE kolonek nedoporučuje. Výjimkou jsou případy, kdy se podařilo nalézt vhodná regenerační činidla a postupy, které zabraňují paměťovým efektům na kolonkách a účinnost kolonek se technikou nemění. Nulové riziko představuje on-line SPE s vyměnitelnými kolonkami, které jsou nahrazovány po každé analýze novými.

## Využití SPE

SPE se stala v posledních desítkách let široce využívanou izolační technikou. Našla uplatnění při kontrole chemických léčiv, v soudnictví, na poli biomedicínském: v terapeutickém monitorování lékových hladin, farmakokinetických a farmakologických studiích, při stanovování některých endogenních substancí nezbytných k správnému určení diagnózy, v monitorování zneužívání drog a při analýzách reziduí některých veterinárních léčiv ve zvířecích produktech. Další rozsáhlou oblastí využívající SPE je životní prostředí (analýzy potravin, pitné vody, přírodních materiálů). Rychlost, se kterou lze SPE izolace provádět, je výhodná pro toxikologické laboratoře.

Selektivní postupy pro provedení SPE byly popsány pro léčiva patřící takřka do všech farmakologických skupin, pro endogenní sloučeniny typu peptidů, katecholaminů, steroidních hormonů nebo lipidů; pro potravinová aditiva, pesticidy. Většina z těchto metodik byla vyvinuta pro jedinou konkrétní sloučeninu, a pokud byla validována, pak buď pomocí vnitřního standardu (strukturní analog) nebo současnou extrakcí analyzované látky a chemické referenční látky.

V závislosti na složení matrix vzorku, na koncentraci analyzované látky v testovaných vzorcích, na způsobu stanovení sloučeniny po extrakci, se SPE používá buď jako jediný izolační postup, nebo v kombinaci s jinými izolačními technikami.

Po prostudování literatury vyšlo rovněž najevo, že asi nejvíce využívaná je neselektivní extrakce na C<sub>18</sub> silikagelových sorbentech. Pro selektivnější analýzy se

volí často iontově-výměnná extrakce, případně extrakce probíhající na prodloužených kolonkách obsahujících dva sorbenty za sebou.

## Shrnutí

Extrakce na pevných fázích může být charakterizována jako technika určená k izolaci analyzovaných sloučenin z nehomogenního prostředí především biologických vzorků nebo jako metoda, která slouží k odstranění endogenních sloučenin z těchto vzorků. Další rozlišení SPE se opírá především o následující kritéria:

1. typ sorbentu:
  - klasické sorbenty jako aluminiové, magnesium silikátové nebo uhlíkové skelety, pryskyřice,
  - polymerní stacionární fáze,
  - chemicky vázané fáze,
2. provedení SPE: statické či dynamické,
3. v případě dynamické SPE: off-line nebo on-line uspořádání.

Technika SPE má řadu výhod, je snadno proveditelná, relativně rychlá (i když se pracuje manuálně, off-line), lehce automatizovatelná. Na současném trhu existuje velký výběr tuhých fází pro SPE, které umožní selektivní extrakci, vyčištění nebo frakcionaci téměř jakékoliv sloučeniny. Navíc nabídka se stále rozšiřuje, vedle klasických kolonek se objevily tuhé fáze ve skle nebo PTFE, případně naplněné do rezervoárů z čisté oceli, aby se zabránilo kontaminaci extraktů plasty. Pro své nesporné výhody a stále probíhající intenzivní rozvoj v oblasti, bude SPE jistě stále častěji používanou izolační technikou.

## II. POZNÁMKY K AMLODIPINU

### II.1. Klasifikace blokátorů kalciového kanálu

**Amlodipin mesylát** je světle žlutý krystalický prášek, špatně rozpustný ve vodě, lépe rozpustný v ethanolu. Jeho chemický název je (R,S) 3-ethyl 5-methyl-2-[(2-aminoethoxymethyl)]-4-(2-chlorphenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridindikarboxylát methansulfonát. Amlodipin mesylát je methansulfonová sůl amlodipinu, léčiva ze skupiny takzvaných blokátorů vápníkového kanálu.

Zavedení těchto léčiv do terapie znamenalo jednu z nejvýznamnějších inovací léčby kardiovaskulárních chorob ve 20. století. Blokátory vápníkového kanálu (BVK) našly své uplatnění zejména v léčbě hypertenze, anginy pectoris, akutního koronárního syndromu, při spazmech mozkových cév atd. Do této skupiny dnes již patří řada látek, které se navzájem podstatně liší svou chemickou povahou i některými klinicky významnými vlastnostmi.

Světová zdravotnická organizace před léty navrhla dělit blokátory kalciového kanálu na dvě skupiny: na „selektivní“, působící na napětově řízené vápníkové kanály typu L (je to převažující typ kanálů v buňkách hladkých svalů a myokardu), a „neselektivní“, blokující kanály typu L,T,N a P. Takové dělení ale není v praxi příliš použitelné, protože z něj nejsou patrné rozdíly v působení jednotlivých přípravků.

Dvojice kardiologů z Japonska a Velké Británie <sup>[23]</sup> navrhla klasifikaci, která podle klinicky výhodných a nevýhodných vlastností jednotlivých přípravků dělí blokátory kalciového kanálu na tři generace. Jejich práce není nová, ale jako vodítko umožňuje lepší orientaci ve vlastnostech antagonistů kalcia, zjednodušuje pozici lékaře při rozhodování o nasazení BVK a při výběru nejvhodnějšího přípravku.

Do první generace řadí (bez ohledu na jejich odlišnou chemickou povahu) verapamil, diltiazem a nifedipin. Za jejich společné nedostatky označují nepředvídatelnost odpovědi organismu (způsobenou vysokou variabilitou plazmatické koncentrace léčiv mezi pacienty i u téhož pacienta), časté lékové interakce vinou relativně vysoké metabolizace při prvním průchodu játry, častý výskyt tachykardií, palpitací a bolestí hlavy (hlavní příčinou je rychlé dosažení maximální plazmatické koncentrace – např. po perorálním podání nifedipinu do 1 h), krátké trvání účinku v důsledku relativně krátkého poločasu a vysoké clearance. Především

pro krátké trvání účinku nejsou pacienti s hypertenzí nebo ischemickou chorobou srdeční (ICHS) chráněni v průběhu kritických ranních hodin. Důsledkem nedostatečné orgánové selektivity pak jsou negativně inotropní a chronotropní účinky a zpomalení atrioventrikulárního vedení. Snížení kontraktility myokardu a tepové frekvence a s tím související pokles spotřeby kyslíku v myokardu jsou potenciálně prospěšné v léčbě ICHS, hypertofické kardiomyopatie a tachyarytmií, ale na druhé straně mohou zhoršit stav při srdečním selhání, navodit bradykardii i některé typy srdečního bloku.

Druhá generace zahrnuje látky s lepším farmakokinetickým profilem a/nebo selektivnějším působením na cévy. Autoři je dělí do dvou skupin, IIa a IIb.

Do IIa řadí léky užívané v lékových formách s pomalým uvolňováním, do IIb léky s novou chemickou strukturou.

Do IIa tak patří nifedipin SR/GITS, felodipin ER, nicardipin SR, diltiazem SR a verapamil SR ( SR – sustained release, ER – extended release, GITS – gastrointestinal therapeutic system), do IIb benidipin, felodipin, isradipin, manidipin, nivadipin, nimodipin, nisoldipin a nitrendipin.

Blokátory vápníkového kanálu skupiny IIa mají méně vedlejších účinků způsobených vazodilatací, protože jejich plazmatická koncentrace se zvyšuje a jejich účinek nastupuje pomaleji (a také trvá déle).

Pro přípravky ve skupině IIb je charakteristické snížení negativně inotropních a chronotropních účinků na srdce.

Ale i přes tato zlepšení zůstává nedostatkem některých BVK 2. generace špatná předvídatelnost klinického účinku, daná jejich nízkou biologickou dostupností, velkými výkyvy plazmatických koncentrací a rychlým poklesem účinku.

Za představitele třetí generace blokátorů vápníkového kanálu autoři označují amlodipin. Za nejdůležitější vlastnosti, které ho odlišují od starších přípravků, považují lépe předvídatelnou účinnost a dlouhé trvání účinku, které i bez použití lékové formy se zpomaleným uvolňováním spolehlivě pokrývá 24 hodin. Podstatou lepších klinických vlastností je jiná farmakokinetika: amlodipin má standardně vysokou (64%) biologickou dostupnost a jen malé rozpětí mezi nejnižší a nejvyšší hladinou v plazmě. Jeho biologický poločas v krevní plazmě je 40 – 50 hodin. Jeho specifickou zvláštností je, že interaguje s vysokoafinitními receptory ve stěně  $Ca^{2+}$



kanálu velmi pozvolna. Důsledkem je postupný nástup a pozvolné odeznívání účinku [24].

## II.2. Farmakoterapie amlodipinem

### Farmakodynamické vlastnosti a klinické údaje

Amlodipin je pomalý dihydropyridinový antagonist vápníkového kanálu. Mechanismus jeho účinku spočívá jako u prakticky všech ostatních BVK v inhibici vstupu vápenatých iontů do buňky kompetitivní blokadou (inhibicí) vápníkových kanálů typu L, které jsou dominantním typem vápníkových kanálů v buňkách hladkých svalů a myokardu. Následkem útlumu otevírání kanálů typu L klesá intracelulární koncentrace vápníku v buňkách hladké svaloviny stěny cévní a v myokardu, což vede k vazodilataci a ke snížení srdeční kontraktility [25]. Amlodipin potom působí ve větší míře na hladkou svalovinu cévní, na svalovinu srdeční působí pouze mírně. Negativně inotropní působení amlodipinu bylo zaznamenáno při pokusech in vitro, ale při podání terapeutických dávek léčiva zdravým zvířatům odhaleno nebylo. Amlodipin v těle neovlivňuje sérové koncentrace kalcia. Ve fyziologickém rozmezí pH se vyskytuje v ionizované formě ( $pK_a=8,6$ ), kinetika jeho interakcí s vápníkovým kanálem je charakteristická postupně se zvyšujícím podílem asociací a disociací s vazebným místem pro léčivo [26]. Pro amlodipin je tak typický velmi pomalý nástup a odeznívání účinku, minimální aktivace sympatiku.

Amlodipin, jakožto periferní arteriální vazodilatans, působí snížení periferní cévní rezistence a redukcí krevního tlaku. Mechanismus jeho antihypertenzního působení tak vyplývá z jeho přímého relaxačního působení na cévní stěny, zatímco přesný mechanismus, jímž amlodipin vede k ústupu angiózních bolestí nebyl zatím odhalen. Je však známo, že amlodipin omezuje rozsah ischemického poškození myokardu dvěma způsoby. Prvním mechanismem amlodipin dilatuje periferní arterioly a tak redukuje celkovou periferní resistenci (afterload), zlepšuje schopnost srdce přečerpávat krev. Vzhledem k tomu, že srdeční frekvence přitom zůstává stabilní, vede snížení dotížení k odlehčení práce srdce a snížení potřeby energie a kyslíkových nároků v myokardu. Druhý mechanismus působení amlodipinu zahrnuje

pravděpodobnou dilataci hlavních větví koronárních tepen a tepének jak v normálních, tak i v ischemií postižených oblastech. Důsledkem této dilatace je zlepšená dodávka krve do myokardu u pacientů s koronárními spazmy (Prinzmetalovou čili variantní anginou pectoris) a stenózou koronárních tepen v důsledku kouření. U nemocných s hypertenzí amlodipin při dávkování jedenkrát denně klinicky významně snižuje krevní tlak. Vzhledem k pomalému nástupu účinku však podání amlodipinu nevede k akutní hypotenzii. Bývá proto indikován k léčbě hypertenze a u většiny pacientů může být pro kontrolu krevního tlaku použit v monoterapii. Přidání amlodipinu k stávající terapii může být prospěšné u těch pacientů, u nichž se nepodařilo dosáhnout kontroly krevního tlaku jednotlivým antihypertenzivem. Amlodipin lze užívat v kombinaci s thiazidovými diuretiky, s alfa-blokátory, blokátory beta-adrenergických receptorů nebo inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu.

Dále bývá amlodipin indikován k profylaktické léčbě stabilní anginy pectoris nebo Prinzmetalovy anginy pectoris. V této indikaci je doloženo výrazné zlepšení kvality života (pokles výskytu stenokardií, zlepšení tolerance zátěže a spotřeby nitroglycerinu) a snížení celkové ischemické zátěže.

Při podání amlodipinu nebyly zjištěny žádné nežádoucí metabolické účinky na lipidy ani změny jejich plazmatických koncentrací. Aplikace amlodipinu je tak vhodná i u pacientů s astmatem, diabetem či dnou. Hemodynamické kontrolované klinické studie s pacienty se srdečním selháním II-IV třídy podle New York Heart Association kritérií ukázaly, že amlodipin nevede ke zhoršení klinického stavu nemocných, hodnoceného pomocí tolerance námahy, velikostí ejekční frakce levé komory a klinické symptomatologie.

Přípravky s amlodipinem jsou zatím určeny k léčbě pouze dospělých pacientů, jejich bezpečnost a účinnost u dětí nebyla zatím stanovena.

Obvyklé dávkování látky jak v léčbě hypertenze, tak anginy pectoris se pohybuje okolo 5 mg jedenkrát denně na počátku terapie, dávky je možno postupně zvyšovat až na maximální dávku 10 mg denně, v závislosti na individuální reakci pacienta. Podává se zejména perorálně. V případě podávání amlodipinu společně s thiazidovými diuretiky, beta-blokátory, či ACE inhibitory není nutné dávkování amlodipinu nijak upravovat. Také u starších pacientů a pacientů se zhoršenou funkcí ledvin je možné používat doporučené dávkování. Stejnou dávku amlodipinu tolerují nemocní s ledvinami i starší nemocní stejně dobře jako ostatní pacienti. Na druhou

stranu, pacienti se zhoršenou funkcí jater dodržují zvláštní opatření. Protože blokátory kalciového kanálu podléhají výrazné metabolizaci při prvním průchodu játry, je také u amlodipinu plazmatický poločas v případě nemocných se sníženou funkcí jater výrazně prodloužen. Dávkovací schéma pro tyto pacienty nebylo zatím stanoveno, ve zvláštních případech je amlodipin podáván s mimořádnou opatrností. Zvýšená opatrnost je také třeba u pacientů s hypotenzí, s hypertrofickou obstrukční kardiomyopatií a nestabilní anginou pectoris.

Zkušenosti s předávkováním amlodipinem u člověka jsou omezené. Podle dostupných informací může předávkování vyústit v rozsáhlou periferní vazodilataci s následnou výraznou a pravděpodobně i dlouhodobou systémovou hypotenzí. V léčbě se potom doporučuje výplach žaludku, vzhledem k vysoké vazebnosti amlodipinu na bílkoviny plazmy nemá dialýza smysl.

Kontraindikací pro podání léčiva amlodipinu je přecitlivělost pacienta na látku. Dále je amlodipin kontraindikován u nemocných v kardiogenním šoku, u pacientů s arteriální stenózou a v době těhotenství či laktace. Bezpečnost amlodipinu v době těhotenství a kojení u člověka totiž nebyla zatím prokázána. Ve studii na zvířatech se však neprojevyly žádné toxické účinky, s výjimkou opoždění a prodloužení porodu u dávky na úrovni padesátinásobku maximální doporučené dávky pro člověka.

Studie, které se zabývaly možností interakcí amlodipinu s ostatními léčivy, přinesly poznání, že toto léčivo lze bez obav podávat společně s thiazidovými diuretiky, alfa-blokátory, beta-blokátory, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu, dlouhodobě působícími nitráty, sublinguálními formami nitroglycerinu, nesteroidními antiflogistiky, antibiotiky a perorálními antidiabetiky.

Speciálně zaměřené studie pak ukázaly, že u zdravých dobrovolníků nemělo současné podávání amlodipinu za následek změnu sérových hladin dioxinu ani jeho renální clearance, a že současné podání s ním nemění farmakokinetiku amlodipinu.

Data ze studií in vitro, prováděných s lidskou plazmou, neprokázala žádný účinek amlodipinu na vazbu léčiv (digoxinu, phenytoinu, warfarinu nebo indomethacinu) na bílkoviny krevní plazmy.

U zdravých dobrovolníků mužského pohlaví nezměnilo současné podání amlodipinu s warfarinem působení warfarinu na protrombinový čas. Ve farmakokinetických studiích s cyklosporinem se dále podařilo prokázat, že amlodipin nijak významně neovlivňuje farmakokinetiku tohoto imunosupresiva. Údaje doplňují informace o interakci látky s grapefruitovou šťávou, která může zvyšovat plazmatické

hladiny amlodipinu, aniž by došlo k významnějšímu ovlivnění pacientova krevního tlaku nebo tepové frekvence.

Amlodipin jako jiná léčiva vykazuje některé nežádoucí účinky, z nichž k nejčastěji pozorovaným v rámci klinických studií kontrolovaných placebem patří bolesti hlavy, otoky (zejména perimaleolární), spavost, nauzea, bolesti břicha, návaly, palpitace a závratě. Mezi méně časté nežádoucí účinky patří alopecie, porušená střevní motilita, bolesti kloubů, dušnost, bolesti v zádech, svalové křeče, dyspepsie, gingivální hyperplazie, gynekomastie, hyperglykémie, impotence, častost močení, leukopenie, pankreatitida, zvýšené pocení, synkopy, trombocytopenie, vaskulární periferní neuropatie, malátnost, suchost v ústech, bolesti svalů a poruchy zraku. V mnoha těchto případech však není jasná souvislost mezi podáním amlodipinu a nežádoucím účinkem.

Vzácně se vyskytují alergické reakce včetně svědění, rashe, angioedému a erythemu multiformes. Velmi zřídka byly hlášeny také hepatitida, žloutenka a zvýšení jaterních transamináz. U několika pacientů byly uvedené příznaky v důsledku léčby amlodipinem natolik závažné, že si vyžádaly hospitalizaci. U většiny z nich je však příčinná souvislost nejasná.

Podobně jako u ostatních blokátorů kalciových kanálů se i u amlodipinu objevují zprávy o občasných účincích, které nelze odlišit od vlastního průběhu základní choroby: infarkt myokardu, arytmie (tachykardie a fibrilace síní) a bolesti na hrudi.

## **Farmakokinetické vlastnosti**

### **Absorpce a distribuce**

Po perorální aplikaci v terapeutických dávkách je amlodipin dobře resorbován, s dosažením maximálních koncentrací v plazmě za 6-12 hodin po podání. Absolutní biologická dostupnost se pohybuje v rozmezí 64%-90%<sup>[26]</sup>. Distribuční objem je přibližně 21 l/kg. Konzumace potravy neovlivňuje absorpci amlodipinu. In vitro studie ukázaly, že přibližně 97,5% cirkulujícího amlodipinu je vázáno na plazmatické bílkoviny.

## Biotransformace a exkrece

Plazmatický eliminační poločas amlodipinu činí 35-50 hodin a je při jedné denní dávce konstantní. Ustálených plazmatických hladin se dosahuje po 7-8 dnech nepřetržitého podávání.

Amlodipin je ve značné míře metabolizován na inaktivní metabolity v játrech, výrazně již při prvním průchodu játry. Je vylučován z asi 10% v nezměněné podobě močí, 60% odchází ve formě metabolitů.

## Experimentální část

### I. POUŽITÝ MATERIÁL

#### I.1. Chemikálie

Amlodipin-mesylát, racemický (VÚFB Praha), zkratka AML-MES

Pyren (Fluka), vnitřní standard

Acetonitril pro HPLC (Fluka), zkratka ACN

Methanol Chromasolv (Riedel-de Haen)

Amoniak 25%(Lachema Brno)

Kyselina octová (Lachema Brno)

Octan sodný (Lachema Brno)

Kyselina boritá (Lachema Brno)

Chlorid draselný (Lachema Brno)

Hydroxid sodný (Lachema Brno)

Ultračistá voda čištěná reverzní osmózou

#### I.2. Pomůcky a přístroje

skleněné zkumavky s plochým dnem, vialky, kádinky, odměrné válce

skleněné pipety dělené i nedělené, odměrné baňky

automatická pipeta 1 000 µl, Labsystems 4 500 (Finn)

nástroje na navažování – lodička, kovové lžičky a kopistky

odsávací zkumavky o vnitřním průměru 17 mm

písty z injekčních stříkaček 5 ml a 10 ml

parafilm " M ", izolepa

kolonky LC-SCX dodané firmou SUPELCO (100mg sorbentu v 1ml tuby),

Accu Bond SPE CYANO kolonky (100mg/1ml), Accu Bond<sup>II</sup> SPE ETHYL

kolonky (100mg/1ml), obojí dodané Agilent Technologies, DSC-CN kolonky

od firmy SUPELCO (100mg/1ml)

analytické váhy Sartorius GMBH, Göttingen

pH-metr OP 211/1, Radelkis, Budapešť

fluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, USA )

kyvety pro fluorescenci

kapalinový chromatograf Agilent 1100

## II. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

### II.1. Příprava základního roztoku AML-MES

Množství 0,0058 g amlodipin-mesylátu navážené na analytických vahách bylo kvantitativně přeneseno do 25 ml odměrné baňky a rozpuštěno v 1 ml methanolu, doplněno destilovanou vodou do 25 ml. Ze vzniklého roztoku o koncentraci 232 µg/ml AML-MES byl automatickou pipetou odebrán 1 ml tohoto roztoku a přenesen do 100 ml odměrné baňky. Doplněním na 100 ml destilovanou vodou byl získán základní roztok AML-MES o koncentraci 2,320 µg/ml. Tento roztok byl následně používán v extrakcích nebo dále zředován na požadovanou koncentraci destilovanou vodou. Roztoky AML-MES v destilované vodě byly použity v případě kalibrace a měření na LC-SCX kolonkách.

V případě testování kyanopropylových a C<sub>2</sub> tuhých fází byl základní roztok 232 µg/ml AML-MES zředován na 2,320 µg/ml směsí acetátový (pH 5,23) : acetonitril ve vzájemném poměru 7:3 (v/v). Ve dvou pokusech na C<sub>2</sub> tuhých fázích byl základní roztok zředován na 2,320 µg/ml AML-MES pufrém borátovým (pH 9,20).

### II.2. Příprava acetátového pufru

Acetátový pufr byl připraven smísením 1 dílu 0,01M kyseliny octové (0,57ml konc.CH<sub>3</sub>COOH/1000ml H<sub>2</sub>O) a 4 dílů 0,01M octanu sodného (navážka 1,361g CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O/1000ml H<sub>2</sub>O) v kádince, pH pufru bylo upraveno přidavkem 0,1M kyseliny octové na hodnotu 5,23.

### II.3. Příprava borátového pufru

Borátový pufr byl připraven rozpuštěním 0,620 g kyseliny borité a 0,750 g chloridu draselného ve 100 ml odměrné baňce, doplněním destilovanou vodou po značku. Obsah baňky byl intenzivně protřepán, pH upraveno přidavkem 0,2M hydroxidu sodného na hodnotu 9,20.



## **II.4. Přehled používaných elučních činidel**

### **II.4.1. EČ 1 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 1:9 (v/v) v kádince.

### **II.4.2. EČ 2 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 1:4 (v/v) v kádince.

### **II.4.3. EČ 3 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 1:3 (v/v) v kádince.

### **II.4.4. EČ 4 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 1:1 (v/v) v kádince.

### **II.4.5. EČ 5 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 1:5 (v/v) v kádince.

### **II.4.6. EČ 6 - eluční činidlo použité při testování kolonek**

Roztok činidla byl připraven smísením amoniaku 25% a acetonitrilu v poměru 3:5 (v/v) v kádince.

## **II.5. Příprava roztoku vnitřního standardu – pyrenu**

Navážka 0,0580 g substance pyrenu přenesená kvantitativně do 25ml odměrné baňky byla nejprve rozpuštěna ve 25 ml methanolu. Vzniklý roztok pyrenu o koncentraci 2320  $\mu\text{g/ml}$  byl dále 10krát zředěn methanolem na koncentraci 232  $\mu\text{g/ml}$ . Roztok 232  $\mu\text{g/ml}$  pyrenu v methanolu byl následně zředěn na koncentraci 2,320  $\mu\text{g/ml}$  směsí acetátový pufr (pH 5,23): acetonitril 7:3 (v/v).

### III. POPIS PRACOVNÍHO POSTUPU

Při práci jsem sledovala klasický postup SPE, který zahrnuje 4-5 dílčích kroků a který je detailně popsán v teoretické části.

Na SPE kolonku jsem vzorky léčiva, případně jiných substancí v roztoku, činidel a promývací vodu aplikovala automatickou pipetou. Objemy kapalin vnesené do kolonky jsem protlačovala skrze sorbent rychlostí přibližně 2 kapky/sekundu vlastní fyzickou silou pomocí pístu injekční stříkačky nebo později s použitím vakua a odsávací zkumavky (detailně popsáno v kapitole III.3.). Tuhou fází jsem v průběhu extrakce nenechávala nikdy úplně vyschnout. Nový objem kapalné fáze jsem aplikovala vždy, když se po projití celého předešlého objemu sorbentem objevila první vzduchová bublina.

Je třeba dodat, že kolonky pro SPE jsem používala vždy několikrát. Opakovaná použití SPE kolonek si žádají vždy novou reaktivaci tuhého povrchu. Obnovení retenčních vlastností sorbentu pro mne bylo samozřejmostí vždy po skončení každé jednotlivé extrakce. Způsob reaktivace, který jsem používala, je zmíněn dále.

#### III.1. Kalibrační křivka

Kalibrační křivka pro fluorimetrická stanovení koncentrací léčiva ve vzorcích byla vytvořena se vzorky amlodipin-mesylátu rozpuštěnými v destilované vodě o koncentracích 0,058 µg/ml, 0,116 µg/ml, 0,232 µg/ml, 0,580 µg/ml a 2,320 µg/ml, připravenými zředováním základního roztoku AML-MES (viz. II.1.). U těchto vzorků byla změřena intenzita fluorescence.

#### III.2. LC-SCX kolonky

První pokusy (pokus č. 1 a 2 pro SCX tuhé fáze) provedené na LC-SCX extrakčních kolonkách probíhaly takto. Kondicionace a eluce byly vedeny elučním činidlem EČ 1 (viz. II.4.1.), aplikované objemy byly 2 ml. Promytí kolonek po kondicionaci proběhlo 2 ml destilované vody a následně 2 ml acetonitrilu. K vymytí interferujících sloučenin jsem použila 2 ml destilované vody. Kapalnou fázi jsem protlačovala kolonkou rychlostí 2 kapky/sec přetlakem shora pomocí pístu injekční stříkačky. Získané extrakty jsem jímala do zkumavek s plochým dnem. Pro

fluorimetrická stanovení jsem přelévala tyto extrakty přímo do kyvet z křemenného skla bez jejich další úpravy.

První kolonku jsem použila dohromady čtyřikrát, nejprve v předběžných extrakcích, později pro popsání měření. Kolonku jsem po každé extrakci vždy reaktivovala. Po čtvrtém použití došlo u první používané kolonky LC-SCX k rozvolnění sorbentu a bylo nutné pracovat s jinou kolonkou od téhož výrobce. Celý pokus jsem tedy opakovala stejným způsobem ještě jednou s úplně novou LC-SCX kolonkou (pokus č. 3, tuhé fáze SCX).

### III.3. CYANO – kolonky

Testování SPE kolonek – Accu Bond SPE CYANO obsahujících kyanopropylovou tuhou fázi, která působí slabou kationtovou výměnu uhlovodíkových a kationtových sloučenin, bylo podobné předešlým pokusům, pouze složení elučního (kondicionačního) činidla se změnilo.

Nejprve jsem opakovala kombinaci 25% amoniak : acetonitril v poměru 1:9 (v/v) v elučním činidle (pokus č. 1 na kyanopropylových sorbentech), použito EČ 1 (viz. II.4.1.), v dalším pokusu potom zkusila zvýšit poměr směrem k amoniaku 1:4 (v/v) (pokus č. 2, kyanopropylové tuhé fáze), použito EČ 2 (viz. II.4.2.). Tehdy jsem zaznamenala poměrně dobré výsledky, a tak jsem začala hledat optimální podmínky pro SPE právě na CN kolonkách. Protože manuální protlačování roztoků kolonkami pomocí pístů z injekčních stříkaček bylo příliš pracné, náročné na udržení konstantní rychlosti průtoku činidel, další pokusy s kolonkami pro SPE jsem už po celý zbytek laboratorní práce prováděla s odsávacími zkumavkami. Příslušná kolonka byla zafixována do otvoru odsávací zkumavky pomocí parafilmu "M", zkumavka napojena na vodní vývěvu, která zprostředkovala vakuum. Tlakem shora na kolonku umístěnou ve zkumavce a jejím polohováním jsem dosáhla konstantních průtokových rychlostí, práce se velmi zrychlila. Jednotlivé frakce SPE jsem přitom jímala přímo do odsávací zkumavky, promývací kapaliny vylévala do odpadu, extrakty přelévala z odsávací zkumavky přímo do fluorimetrických kyvet. Zařízení s odsávací zkumavkou mi tak umožnilo provést celou další sérii pokusů.

Abych podpořila ionizaci amlodipinu důležitou pro interakci s kyanopropylovými funkčními skupinami, rozpouštěla jsem amlodipin-mesy lát v roztoku acetátového pufru o pH 5,23 a acetonitrilu, smíšených v poměru 7:3 (v/v).

Koncentrace léčiva ve směsném roztoku byla standardně 2,320 µg/ml. Schéma, podle kterého probíhala SPE, bylo:

1. kondicionace elučním činidlem o objemu 2 ml,
2. výplach balastních látek destilovanou vodou - množstvím 2 ml,
3. 2 ml čistého acetonitrilu,
4. vzorek AML-MES, rovněž 2 ml,
5. promytí destilovanou vodou 2 ml,
6. vymytí léčiva 2 ml elučního činidla.

Rychlost průtoku činidel se pohybovala kolem 2 kapek/sec.

Později jsem dvakrát opakovala pokus č. 2 tentokrát s použitím odsávací zkumavky a vakua. K eluci i kondicionaci kolonky bylo použito eluční činidlo EČ 2 (viz. II.4.2.). Tyto pokusy, označené jako č. 3 a č. 4 na kyanopropylových fázích, jsem použila k hodnocení opakovatelnosti metodiky SPE na kyanopropylových sorbentech.

V další sérii pokusů jsem postupně modifikovala složení elučního činidla (mobilní fáze pro SPE), způsob provedení SPE se nezměnil. Toto činidlo se skládalo vždy z amoniakálního 25% roztoku ve vodě a acetonitrilu pro HPLC. Postupně jsem s ohledem na dosažené výsledky zvyšovala zastoupení amoniaku v mobilní fázi. Eluční činidla, se kterými jsem pracovala, byla: EČ 1 (viz. II.4.1.) při pokusu č. 5, EČ 2 (viz. II.4.2.) pro pokus č. 6, EČ 3 (viz. II.4.3.) v pokusu č. 7 a EČ 4 (viz. II.4.4.) při pokusu č. 8 na kyanopropylových tuhých fázích. Z analytického hlediska se nejlépe osvědčila mobilní fáze, kde se mísí amoniak s acetonitrem rovným dílem. Takové podmínky ovšem příliš nesvědčí materiálům, z nichž jsou zhotovovány kolonky, proto jsem svoji pozornost zaměřila ještě na další typ tuhé fáze.

Pro kontrolu adsorpce analytu na tuhou fázi jsem také pokaždé sbírala frakce s rozpouštědlem pro léčivo, které prošlo kolonkou po aplikaci vzorku na kolonku, a zjišťovala koncentraci uniklého léčiva v tomto rozpouštědle.

### **III.4. C<sub>2</sub> – kolonky**

V této fázi testování SPE kolonek jsem zvolila sorbenty s navázanými ethylovými funkčními skupinami. Vycházela jsem z předpokladu, že hydrofobní

interakce, kterými působí, jsou natolik univerzální, že by mohly vázat léčivo amlodipin.

První pokusy na C<sub>2</sub> kolonkách jsem prováděla se vzorky AML-MES 2,320 µg/ml rozpuštěným v acetátovém pufru (pH 5,23) : acetonitrilu 7:3 (v/v). Schéma SPE se nelišilo od SPE prováděné na CYANO kolonkách. Pro pokus č. 1 na C<sub>2</sub> sorbentech jsem použila EČ 5 (viz. II.4.5.). Průtokovou rychlost činidel jsem udržovala na 2 kapkách/sec.

V dalších pokusech na C<sub>2</sub> kolonkách jsem rozpouštěla navážku amlodipin-mesyátu v pufru borátovém, tak aby se potlačil iontový charakter léčiva a zvýraznily nepolární vazby. Na kolonku jsem postupně vnášela 2 ml elučního činidla, 2 ml destilované vody, 2 ml acetonitrilu, 2 ml roztoku AML-MES o koncentraci 2,320 µg/ml v borátovém pufru (pH 9,20), znovu 2 ml destilované vody a konečně 2 ml elučního činidla – EČ 6 (viz. II.4.6.) v pokusu č. 2 pro C<sub>2</sub> tuhé fáze, později EČ 4 (viz. II.4.4.) pro pokus č. 3 na C<sub>2</sub> tuhých fázích. Průtok činidel jsem udržovala na obvyklých 2 kapkách za sekundu. Kapalně fáze byly protlačovány podtlakem, jímány do odsávací zkumavky. Extrakty přelévány bez dalších úprav do fluorimetrických kyvet k měření.

K porovnání účinnosti extrakce na C<sub>2</sub> a kyanopropylových tuhých fázích jsem učinila pokus, který jsem v rámci pokusů pro C<sub>2</sub> tuhé fáze označila jako pokus č.4, ačkoli SPE probíhala na kolonkách Accu Bond Elut CN. Jako vzorek jsem použila léčivo AML-MES o výchozí koncentraci 2,320 µg/ml rozpuštěné v borátovém pufru (pH 9,20). K vyplavení léčiva z kolonky při eluci činidlo EČ 4 (viz. II.4.4.). Způsob provedení SPE se nelišil od pokusů předchozích. Na kolonku jsem postupně vnášela 2 ml elučního činidla EČ 4, 2 ml destilované vody, 2 ml acetonitrilu, 2 ml roztoku AML-MES o koncentraci 2,320 µg/ml v borátovém pufru (pH 9,20), znovu 2 ml destilované vody a konečně 2 ml elučního činidla EČ 4. Kapalně fáze procházely kolonkou působením vakua rychlostí přibližně 2 kapky/sec. Extrakt jsem jímala do odsávací zkumavky a před fluorimetrickou analýzou tento extrakt přelila bez další úpravy do kyvety pro fluorescenční měření.

### **III.5. Vnitřní standard pro chromatografickou analýzu**

Jako vnitřní standard pro HPLC analýzy amlodipinu s fluorescenčním detektorem byl navržen pyren. Pyren o koncentraci 2,320 µg/ml jsem extrahovala podobně jako amlodipin-mesyát na kyanopropylových tuhých fázích kolonek Accu

Bond Elut CN pro SPE, tentokrát již s optimalizovaným složením elučního činidla. Způsob extrakce kopíroval původní pokusy na kyanopropylových tuhých fázích:

1. promytí kolonky 2krát 2 ml elučního činidla EČ 3,
2. výplach 2 ml destilované vody,
3. 2 ml acetonitrilu,
4. 2 ml vzorku 2,320 µg/ml pyrenu v acetátovém pufru (pH 5,23):ACN 7:3 (v/v),
5. promytí 2 ml destilované vody,
6. 2 ml elučního činidla EČ 3.

Průtok činidel jsem udržovala na 2 kapkách/sekundu. Používala jsem zařízení s odsávací zkumavkou napojenou na vodní vývěvu.

### **III.6. Převedení metodiky SPE na práci s biologickým materiálem**

K dispozici jsem měla vzorky moči králíků o objemu 1 ml, která byla zvířatům odebrána v časech 10, 20, 30, 40, 50, 60 a 70 minut po aplikaci léčiva. Takto získané vzorky moči jsem podrobila extrakci na kyanopropylových tuhých fázích.

Množství 1 ml moči zvířat byla postupně vnášena na kolonky Accu Bond Elut CN (vzorky odebrané po 10 a 20 minutách po aplikaci léčiva), později na kolonky DSC-CN (vzorky odebrané po 30, 40, 50, 60, 70 min). Schéma SPE bylo totožné s předchozími pokusy na kyanopropylových sorbentech, pouze používaná množství rozpouštědel se zmenšila na 1 ml vzhledem k množství vzorků, které mi byly dodány každý jednotlivý o objemu 1 ml. Elučním činidlem byla opět směs amoniak 25% : acetonitril ve vzájemném poměru 1:3 (v/v), tj. EČ 3 (viz. II.4.3.). Poslední frakce SPE určená pro HPLC analýzu byla jímána přímo do vialek.

Extrakty AML-MES z moči králíků byly odpařeny do sucha pomocí vodní vakuové pumpy při laboratorní teplotě a analyzovány chromatograficky. Odparky byly před HPLC rekonstituovány ve 400µl mobilní fáze.

### III.7. Chromatografická analýza amlodipinu v extraktech po SPE

Chromatografická stanovení amlodipinu v extraktech z biologického materiálu byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1100. Použitá mobilní fáze měla složení: 0,01M acetátový pufr (pH 5,23) a acetonitril smíšené v poměru 7:3 (v/v). Teplota chromatografické kolony Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (150x4,6 nm) byla udržována na 30°C. Na fluorescenčním detektoru byly nastaveny vlnové délky  $\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ . Nastříkováno bylo 100  $\mu\text{l}$  vzorku.

### III.8. Reaktivace kolonek

Reaktivace SPE kolonek jsem prováděla stále stejným způsobem bez ohledu na typ kolonek. Po provedení kompletní extrakce na tuhých fázích s konečným vymytím léčiva z kolony elučním činidlem jsem kolony proplachovala 1krát 1 nebo 2 ml čistého acetonitrilu a následně 1krát 1 nebo 2 ml destilované vody. Množství chemikálií jsem přizpůsobovala podmínkám předchozích extrakcí. Jestliže jsem například v pokusu používala vždy po 2 ml kapalných fází při extrakci, použila jsem k obnovení retenčních schopností tuhé fáze po 2 ml ACN a H<sub>2</sub>O.



#### IV. VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Fluorimetrická měření koncentrací AML-MES v získaných extraktech probíhala za těchto podmínek: excitační vlnová délka byla 240 nm, hodnoty intenzity fluorescence byly odečítány při 431 nm, šíře štěrbin monochromátorů činila 8 nm.

Koncentrace léčiva AML-MES ve vzorcích jsem vyjadřovala v  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$ . Tyto koncentrace jsem získala přepočtem hodnot intenzity fluorescence<sup>2</sup> naměřených fluorimetrem pomocí regresní rovnice kalibrační křivky.

Množství léčiva ve vzorcích analyzovaných HPLC s fluorimetrickou detekcí je vyjádřeno v  $\text{mg/l}$ .

---

<sup>2</sup> Hodnoty intenzity fluorescence nemají rozměr, neboť jsou hodnotami poměrnými (jde o poměr naměřeného signálu a maximálního signálu, na který je pro daný pokus nastaven detektor - fotonásobič).

## Výsledková část

### 1. Kalibrační křivka

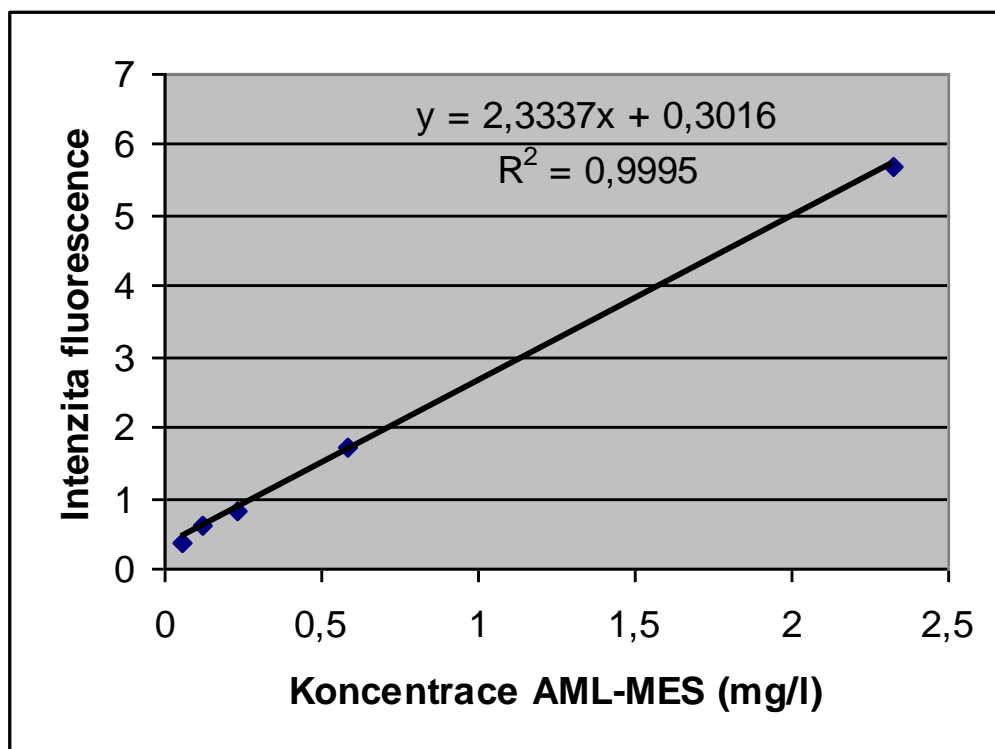
Lineární kalibrační přímka byla získána se vzorky AML-MES rozpuštěnými v destilované vodě o nejnižší koncentraci 0,058 µg/ml léčiva ve vzorku, nejvyšší koncentraci 2,320 µg/ml. U vzorků byla měřena intenzita fluorescence.

Výsledky měření zobrazuje tabulka 2. Kalibrační přímka je charakterizována regresní rovnicí  $y = 2,3337 x + 0,3016$ , kde  $y$  značí intenzitu fluorescence,  $x$  koncentraci AML-MES v mg/l, a koeficientem determinace **0,9995**. Regresní rovnice a koeficient determinace jsou také uvedeny jako součást obrázku 4.

*Tabulka 2: Koncentrace AML-MES v mg/l a jim odpovídající hodnoty intenzity fluorescence. Hodnoty použité k sestavení kalibrační křivky.*

Koncentrace AML-MES v mg/l	Intenzita fluorescence
0,058	0,362
0,116	0,617
0,232	0,837
0,580	1,703
2,320	5,704

Obr. 4: Kalibrační křivka.



## 2. Výsledky pokusů s LC-SCX kolonkami

S kolonkami LC-SCX jsem provedla postupně tři pokusy, které měly sloužit jako výchozí pro optimalizaci podmínek SPE amlodipinu, a při kterých jsem zároveň sledovala opakovatelnost SPE.

Léčivo AML-MES jsem na podkladě předchozích orientačních pokusů znovu rozpouštěla v destilované vodě. Úprava pH vzorku nebyla při pokusech s LC-SCX kolonkami prováděna, čímž byl ověřován předpoklad, že retenční schopnost SCX sorbentu zadržovat AML-MES je dostatečná i bez takové úpravy.

Začala jsem pracovat s elučním činidlem EČ 1, ve kterém se mísí amoniak 25% a acetonitril 1:9 (v/v), abych při vymývání léčiva z kolonky potlačila jeho iontový charakter a usnadnila jeho eluci. V pokusech č. 1 a č. 2 na LC-SCX kolonkách jsem dosáhla přibližně shodných výsledků (naměřené hodnoty popisuje tabulka 3). Kolonky LC-SCX při práci činily některé obtíže. Kapalnou fázi jsem skrze tyto kolonky protlačovala pístem injekční stříkačky a nazpět vytahovala píst značnou silou. Na sorbent v kolonce tak při vytahování pístu působil značný podtlak, který se zřejmě

podílel na tom, že během pokusů došlo po provedení v pořadí 4. SPE na kolonce k rozvolnění sorbentu. Stejnou kolonku jsem používala i na předběžné testy. Znehodnocenou kolonku jsem vyměnila za novou. S novou LC-SCX kolonkou (pokus č. 3. na LC-SCX kolonkách, zahrnut do tabulky 4) jsem potom pracovala úplně stejně jako při pokusech č. 1 a 2. Výsledek SPE na nové kolonce se velmi lišil od předchozích měření, množství léčiva v extraktu bylo nyní velmi nízké. Ani kontrola množství léčiva v destilované vodě, která prošla kolonkou při aplikaci vzorku léčiva na kolonku (tuto jsem pro jistotu sbírala) nepotvrdila, že by velká množství AML-MES odcházela kolonkou bez zadržení. Proto pokusy s kolonkami LC-SCX dále nepokračovaly. Výsledek shrnuje tabulka 4.

Tabulky 3 a 4 představují výsledky dílčích pokusů na LC-SCX kolonkách. Tabulka 5 shrnuje výsledky všech tří pokusů na LC-SCX kolonkách a graficky jsou tyto výsledky zpracovány do obr. 5.

*Tabulka 3: Výsledky pokusů č. 1 a č. 2 provedených na LC-SCX kolonkách, které sledovaly opakovatelnost SPE na těchto kolonkách. Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorku byla 2,320 mg/l.*

Pokus č.	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES v extraktu (mg/l)
1	2,206	0,816
2	2,308	0,860

*Tabulka 4: Výsledek pokusu č. 3 na nové LC-SCX kolonce. Tabulka zobrazuje naměřená množství léčiva AML-MES v mg/l v extraktu (1. řádek tabulky) a ve vodě, která prošla kolonkou po nanesení vzorku (2. řádek tabulky). Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorku byla 2,320 mg/l.*

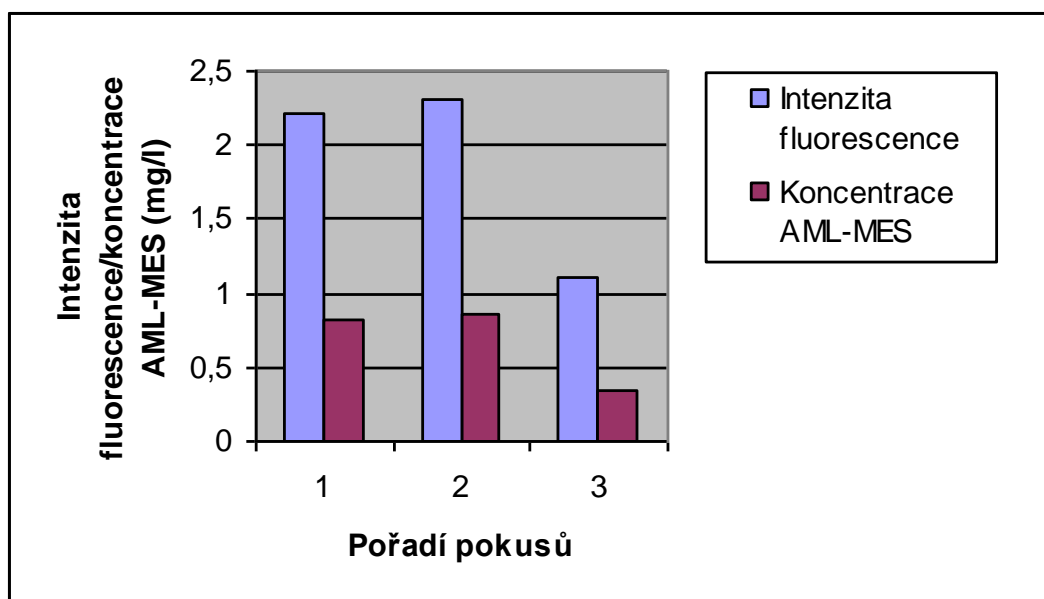
	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)
Extrakt získaný SPE	1,108	0,346
Voda prošlá se vzorkem	0,945	0,276

Tabulka 5: Opakovatelnost na LC-SCX kolonkách.

Pokus č.	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES v extraktech (mg/l)
1	2,206	0,816
2	2,308	0,860
3	1,108	0,346
<b>RSD<sub>1</sub> [%]</b>		<b>51,3</b>

Opakovatelnost SPE provedené na LC-SCX kolonkách, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD<sub>1</sub>) naměřených hodnot koncentrací, činí 51,3 %.

Obr. 5: Výsledky pokusů č. 1, 2, 3 na LC-SCX kolonkách v grafickém zpracování, hodnoty vycházejí z tabulky 5.



### 3. Výsledky pokusů s kyanopropylovými sorbenty

S kyanopropylovými sorbenty jsem postupně provedla čtyři pokusy, při kterých jsem optimalizovala složení elučního činidla pro provedení SPE na těchto tuhých fázích.

Před optimalizací složení elučního činidla jsem porovnávala výtěžky extrakce na kyanopropylových tuhých fázích při použití pístů injekčních stříkaček k protlačování kapalin a výtěžky extrakce po jejím provedení působením vakua zprostředkovaného odsávací zkumavkou.

Na kolonkách Accu Bond Elut - CN jsem také učinila sérii tří měření, při kterých jsem sledovala opakovatelnost.

Abych podpořila jinak slabou iontovou vazbu léčiva na CN tuhý povrch, upravila jsem prostředí vzorku AML-MES přídatkem acetátového pufru (pH 5,23).

Pro vypláchnutí léčiva z kolonky jsem opět jako v předchozích pokusech na LC-SCX kolonkách používala směs acetonitrilu a amoniaku 25%, abych při eluci analytu potlačila jeho iontový charakter.

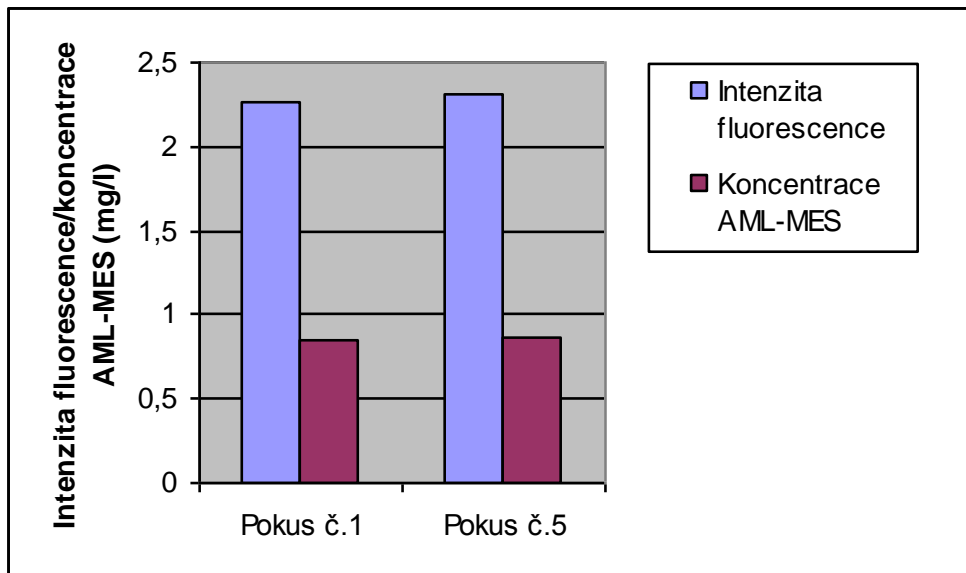
V sérii pokusů (č. 1 a 2, a dále č. 5, 6, 7, 8) jsem postupně modifikovala složení elučního činidla. V každém následujícím pokusu jsem v elučním činidle zvyšovala zastoupení amonia 25% na úkor acetonitrilu.

Při pokusech č. 1 a č. 2 na kyanopropylových tuhých fázích jsem protlačovala kapalnou fázi kolonkou pomocí pístu injekční stříkačky, později jsem začala používat odsávací zkumavku a působit na kapalnou fázi podtlakem. Výsledky, kterých jsem dosáhla při práci s pístem a s odsávací zkumavkou, porovnává tabulka 6 a následující grafy (obrázky 6 a 7).

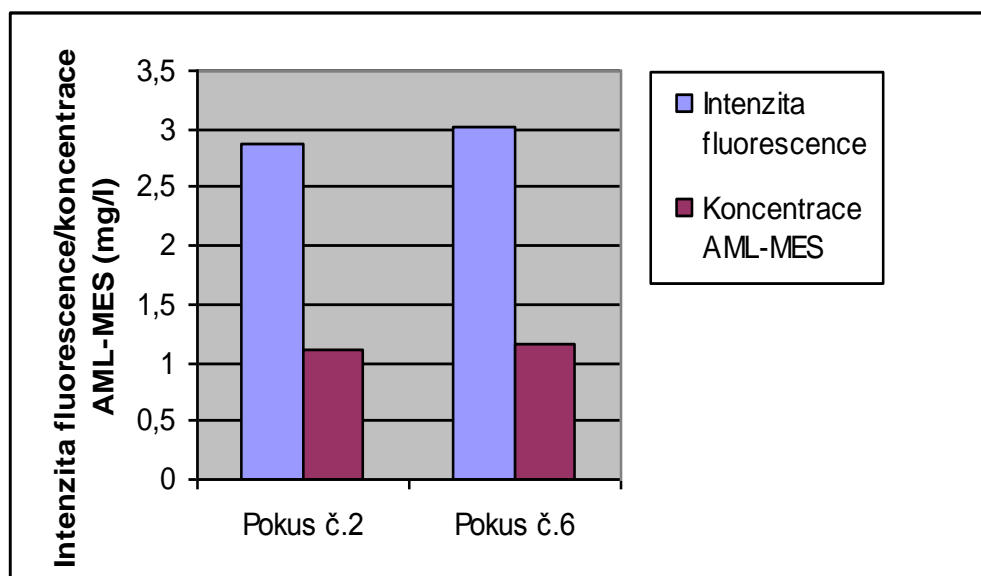
Tabulka 6: Hodnoty intenzity fluorescence a koncentrací AML-MES v extraktech po proběhnutí SPE na stejných kolonkách v případě použití dvou typů elučních činidel. Extrakce se liší způsobem protlačování kapalné fáze tuhým sorbentem. Při pokusech č. 1 a 2 byly k protlačování použity píсты injekčních stříkaček, v pokusech č. 5 a 6 odsávací zkumavka napojená na vodní vývěvu. Výchozí koncentrace léčiva ve vzorku byla vždy 2,320 mg/l.

Pokus č.	Eluční činidlo o složení NH <sub>3</sub> 25%:ACN (v/v)	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)
1		2,268	0,842
5	1:9	2,305	0,858
<b>RSD<sub>2</sub> [%]</b>			<b>0,9</b>
2		2,877	1,104
6	1:4	3,025	1,167
<b>RSD<sub>3</sub> [%]</b>			<b>2,8</b>

Obr. 6: Srovnání účinnosti SPE na kyanopropylových sorbentech Accu Bond Elut CN kolonek v případě složení elučního činidla amoniak 25% : ACN 1:9 (v/v), protlačování pístem (pokus č.1) a pomocí vakua (pokus č.5). Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorku činila 2,320 mg/l.



Obr. 7: Srovnání účinnosti SPE na kyanopropylových sorbentech Accu Bond Elut CN kolonek v případě složení elučního činidla amoniak 25% : ACN 1:4 (v/v), protlačování pístem (pokus č.2) a pomocí vakua (pokus č.6). Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorku činila 2,320 mg/l.



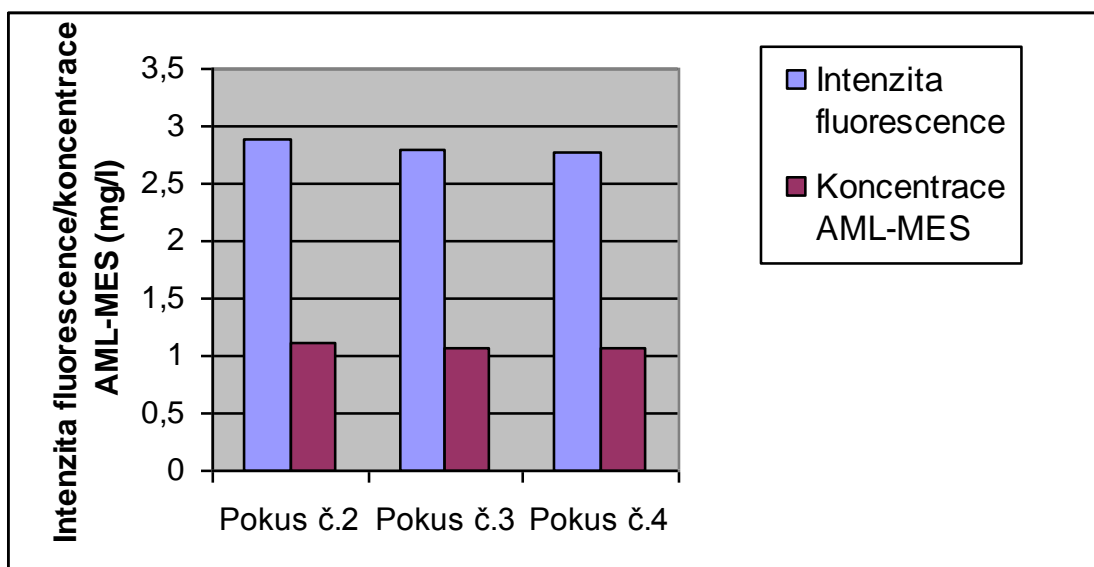


Pokusy č. 2, č. 3 a č. 4 byly zaměřeny na opakovatelnost metodiky SPE na Accu Bond Elut CN kolonkách. K protlačování kapalné fáze přetlakem shora bylo použito píšťů injekčních stříkaček. Eluční činidlo EČ 2 se skládalo z amoniaku 25% : ACN 1:4 (v/v). Výsledky těchto pokusů shrnuje tabulka 7 a obrázek 8.

*Tabulka 7: Hodnoty intenzity fluorescence a koncentrací AML-MES v extraktech získaných SPE na Accu Bond Elut CN kolonkách. Výchozí koncentrace léčiva ve vzorku aplikovaném na kolonku byla ve všech případech 2,320 mg/l.*

Pokus č.	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)
2	2,877	1,104
3	2,799	1,069
4	2,782	1,063
<b>RSD<sub>4</sub> [%]</b>		<b>1,7</b>

*Obr. 8: Porovnání hodnot intenzity fluorescence a koncentrací AML-MES v extraktech získaných SPE na Accu Bond Elut CN kolonkách. Výchozí koncentrace léčiva ve vzorku aplikovaném na kolonku byla ve všech případech 2,320 mg/l.*



Opakovatelnost SPE na Accu Bond Elut CN kolonkách vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka koncentrací (RSD<sub>4</sub>) činí 1,7 %. Hodnota RSD<sub>4</sub> je součástí tabulky 7.

Přehled výsledků pokusů č. 5, č. 6, č. 7 a č. 8, při nichž jsem hledala optimální složení elučního činidla, uvádím v tabulce 8.

Během testování Accu Bond Elut CN kolonek jsem opět pokaždé sbírala frakci rozpouštědla pro léčivo, které prošlo kolonkou po aplikaci vzorku na kolonku. Množství léčiva, které v jednotlivých pokusech uniklo z kolonky aniž by se navázalo na tuhou fázi, jsou zahrnuta v tabulce 9. Průměrné množství AML-MES, které se nepodařilo z aplikovaného množství 2,320 mg/l na kolonkách zadržet, odpovídá koncentraci 0,063 mg/l léčiva AML-MES v rozpouštědle. Pokud bychom neuvažovali pokus č. 1, jehož výsledek uvedený v tabulce 9 je zřejmě odlehlý, sníží se tato hodnota na 0,038 mg/l.

*Tabulka 8: Výsledky optimalizace složení elučního činidla pro SPE na kyanopropylových sorbentech. Kapalná fáze byla protlačována kolonkami pomocí vakua, výchozí koncentrace AML-MES ve vzorcích činila 2,320 mg/l.*

Pokus č.	EČ = NH <sub>3</sub> 25% : ACN (v/v)	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)	Extrakční účinnost [%]
5	1:9	2,305	0,858	37,00
6	1:4	3,025	1,167	50,29
7	1:3	3,052	1,178	50,79
8	1:1	3,407	1,331	57,36

Na výsledcích obsažených v tabulce 8 je dobře vidět, že nejefektivnějšího vymytí léčiva z Accu Bond Elut CN kolonky s kyanopropylovou tuhou fází jsem dosáhla s elučním činidlem o složení amoniak 25% : acetonitril 1: 1 (v/v). Extrakční účinnost v tomto případě činí 57,4%.

*Tabulka 9: Výsledky kontroly adsorpce analytu na tuhou fázi Accu Bond Elut CN kolonek prováděné u každého z dílčích pokusů na těchto kolonkách. Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorcích aplikovaných na kolonky byla 2,320 mg/l.*

Pokus č.	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l) v rozpouštědle prošlém spolu se vzorkem
1	0,861	0,240
2	0,354	0,022
3	0,447	0,062
4	0,378	0,033
5	0,365	0,027
6	0,350	0,021
7	0,339	0,016
8	0,499	0,085

#### **4. Výsledky pokusů s C<sub>2</sub> fázemi**

V prvním pokusu s C<sub>2</sub> tuhými fázemi (pokus č.1. pro C<sub>2</sub> fáze) jsem zjišťovala, zda mohu pro SPE na těchto fázích použít stejné podmínky jako pro SPE na kyanopropylových sorbentech. Moje úvahy se opíraly o univerzálnost vazeb, kterými C<sub>2</sub> fáze působí. V tomto pokusu jsem také na začátek testování nových sorbentů zvolila k rezervoárům kolonek šetrnější variantu složení elučního činidla. Eluční činidlo EČ 5 mělo složení amoniak 25% : ACN 1:5 (v/v). Vzorek léčiva byl - stejně jako v případě kyanopropylových sorbentů - AML-MES rozpuštěný ve směsi acetátového pufru (pH 5,23) : ACN 7:3 (v/v) o výchozí koncentraci 2,320 mg/l. Výsledek tohoto pokusu je zahrnut do tabulky 10. Hodnota koncentrace AML-MES v extraktu získaná tímto pokusem byla o 0,062 mg/l nižší než hodnota získaná v pokusu č. 5 na kyanopropylových fázích, kde jsem k eluci použila eluční činidlo s nižším zastoupením amoniakálního 25% roztoku v tomto činidle. Oba pokusy srovnává tabulka 10. Z výsledků obsažených v tabulce 10 plyne, že pro SPE léčiva amlodipinu je za daných podmínek výhodnější extrakce na kyanopropylových tuhých fázích. Usoudila jsem, že nižší výtěžek extrakce na C<sub>2</sub> fázích by mohl být způsoben ionizací léčiva rozpouštěného ve směsi acetátového pufru (pH 5,23) : ACN 7:3 (v/v) a

v dalších pokusech jsem proto změnila složení rozpouštědla, ve kterém byl AML-MES před a při aplikaci na C<sub>2</sub> fázi. Nově byl AML-MES rozpouštěný v pufru borátovém (pH 9,20), aby byl potlačen iontový charakter léčiva a podpořeny nepolární vazby na sorbent.

*Tabulka 10: Srovnání SPE na C<sub>2</sub> a kyanopropylových tuhých fázích. AML-MES o výchozí koncentraci 2,320 mg/l byl rozpuštěn ve směsi acetátového pufru (pH 5,23) : ACN 7:3 (v/v).*

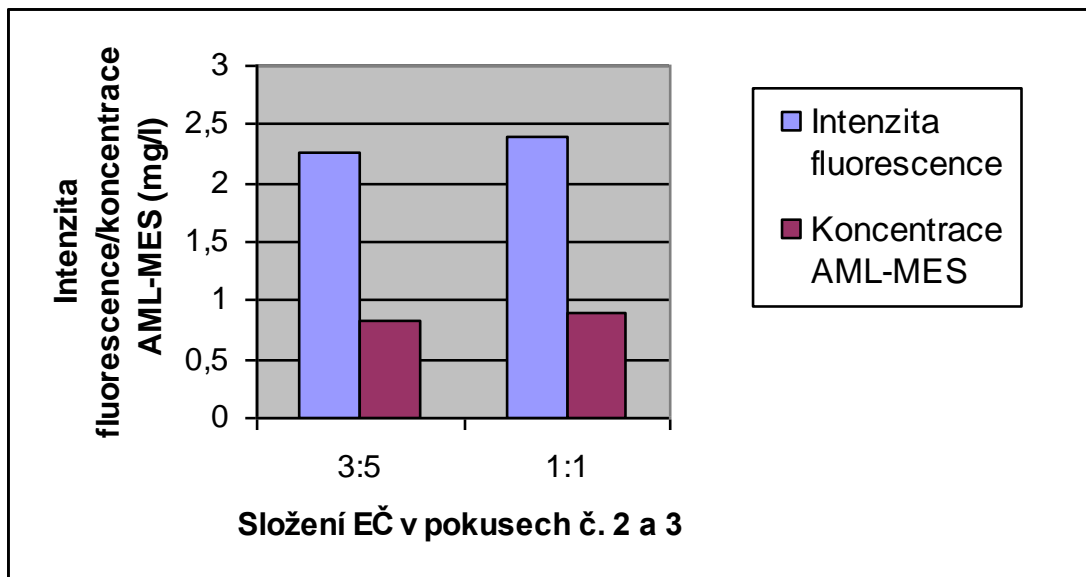
Pokus č.	EČ= NH <sub>3</sub> 25%:ACN (v/v)	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)	Extrakční účinnost [%]
1 pro C <sub>2</sub> fáze	1:5	2,160	0,797	34,33
5 pro CN fáze	1:9	2,305	0,858	37,00

V pokusech č. 2 a č. 3 na C<sub>2</sub> tuhých fázích jsem potom sledovala vliv složení elučního činidla na výtěžek extrakce. Pokusy potvrdily zkušenosti s elučním činidlem získané již při testování kyanopropylových tuhých fází. Totiž, že se zvyšujícím se zastoupením amoniaku 25% v elučním činidle se zvyšuje také výtěžek extrakce. Výsledky těchto pokusů jsou zpracovány do tabulky 11 a obrázku 9.

*Tabulka 11: Výsledky optimalizace složení elučního činidla pro SPE na C<sub>2</sub> tuhých fázích. Výchozí koncentrace AML-MES v borátovém pufru (pH 9,20) činila 2,320 mg/l.*

Pokus č.	EČ = NH <sub>3</sub> 25% : ACN (v/v)	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)	Extrakční účinnost [%]
2	3:5	2,257	0,838	36,12
3	1:1	2,406	0,902	38,86

Obr. 9: Grafické zpracování optimalizace složení elučního činidla pro SPE na C<sub>2</sub> tuhých fázích (výsledků z tabulky 11). Vyšší podíl amoniaku 25% v elučním činidle znamená vyšší výtěžek extrakce. Výchozí koncentrace AML-MES v borátovém pufru (pH 9,20) činila 2,320 mg/l.



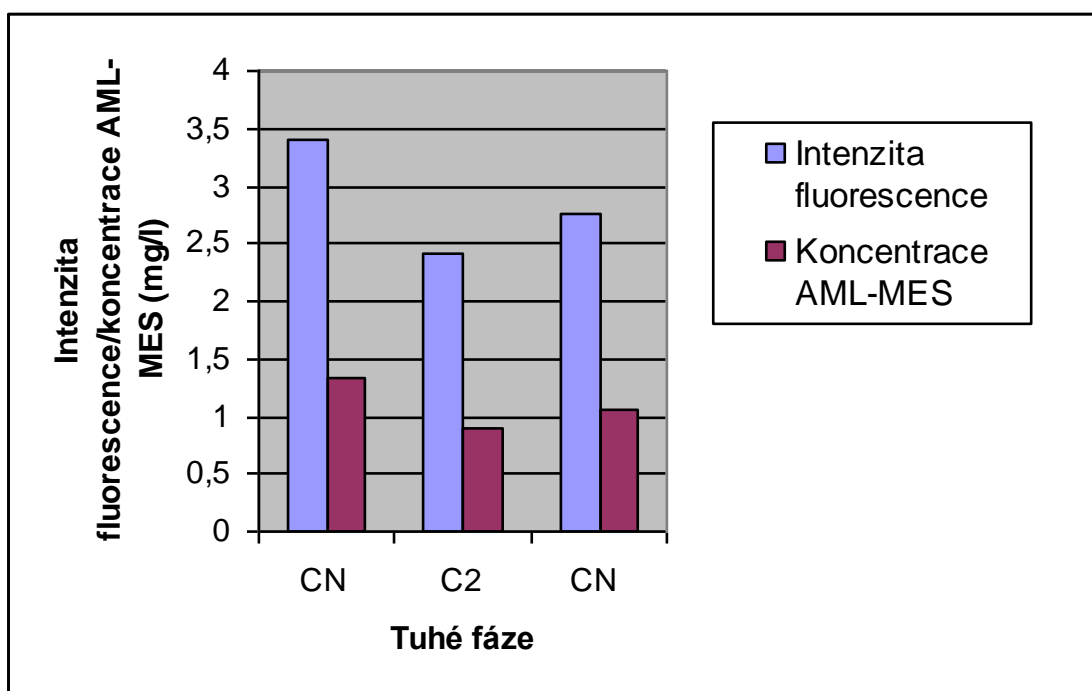
Další pokus, označen jako č. 4, byl proveden na kyanopropylových tuhých fázích, aby bylo možné lépe porovnat extrakční účinnost SPE na kyanopropylových a C<sub>2</sub> tuhých fázích. Léčivo AML-MES bylo jako v předchozích pokusech č. 2 a 3 na C<sub>2</sub> fázích rozpuštěno v borátovém pufru (pH 9,20). K vymytí léčiva z kolonky jsem použila eluční činidlo EČ 4, tj. amoniak 25% : ACN 1:1 (v/v), aby bylo možné výsledek porovnat jak s výsledkem pokusu č. 3 na C<sub>2</sub> fázích, tak s výsledkem pokusu č. 8 na kyanopropylových tuhých fázích. Hodnota intenzity fluorescence léčiva AML-MES v extraktu získaném ve srovnávacím pokusu na kyanopropylové fázi byla 2,749, což odpovídá koncentraci 1,049 mg/l AML-MES. Tabulka 12 a obrázek 10 shrnují výsledky pokusů č. 4 (označen č. 4 v rámci pokusů na C<sub>2</sub> fázích, ačkoliv proběhl na CN kolonce) a č. 8 na kyanopropylových fázích a pokusu č. 3 na C<sub>2</sub> fázi.

Z tabulky 12 a obrázku 10 vyplývá, že SPE amlodipinu na C<sub>2</sub> tuhých fázích je pro léčivo méně výhodná než SPE na kyanopropylových sorbentech.

Tabulka 12: Srovnání účinnosti SPE na kyanopropylových a C<sub>2</sub> tuhých fázích. Ve všech pokusech jsem pracovala se vzorkem AML-MES o výchozí koncentraci 2,320 mg/l a elučním činidlem amoniak 25% : ACN 1:1 (v/v). V prvním řádku tabulky je výsledek SPE amlodipinu rozpuštěného ve směsi acetátového pufru (pH 5,23) a ACN, ve druhém a třetím řádku v pufru borátovém (pH 9,20).

Pokus č.	Tuhá fáze	Intenzita fluorescence	Koncentrace AML-MES (mg/l)	Extrakční účinnost [%]
8	CN	3,407	1,331	57,36
3	C <sub>2</sub>	2,406	0,902	38,86
4	CN	2,749	1,049	45,20

Obr. 10: Srovnání účinnosti SPE na kyanopropylových a C<sub>2</sub> tuhých fázích. Graf vychází z hodnot uvedených v tabulce 12.



## 5. Výsledky testování pyrenu jako vnitřního standardu

Pyren byl zkoušen jako vnitřní standard pro chromatografickou analýzu s fluorimetrickou detekcí. Vzorek pyrenu o výchozí koncentraci 2,320 mg/l látky byl podroben SPE na kyanopropylových fázích za optimalizovaných podmínek pro tuto fázi (podrobnosti jsou uvedeny v pracovní části III.5.). Fluorescenční spektrum pyrenu má dvě výrazná vibrační maxima při: 374 nm a 394 nm. Hodnoty intenzity fluorescence pyrenu v extraktech příslušející k jednotlivým maximům jsou zpracovány do tabulky 13.

*Tabulka 13: Hodnoty intenzity fluorescence vnitřního standardu - pyrenu náležející dvěma vibračním maximům ve fluorescenčním spektru této látky.*

Vlnová délka vibračního maxima [nm]	Intenzita fluorescence
374	8,789
394	8,206

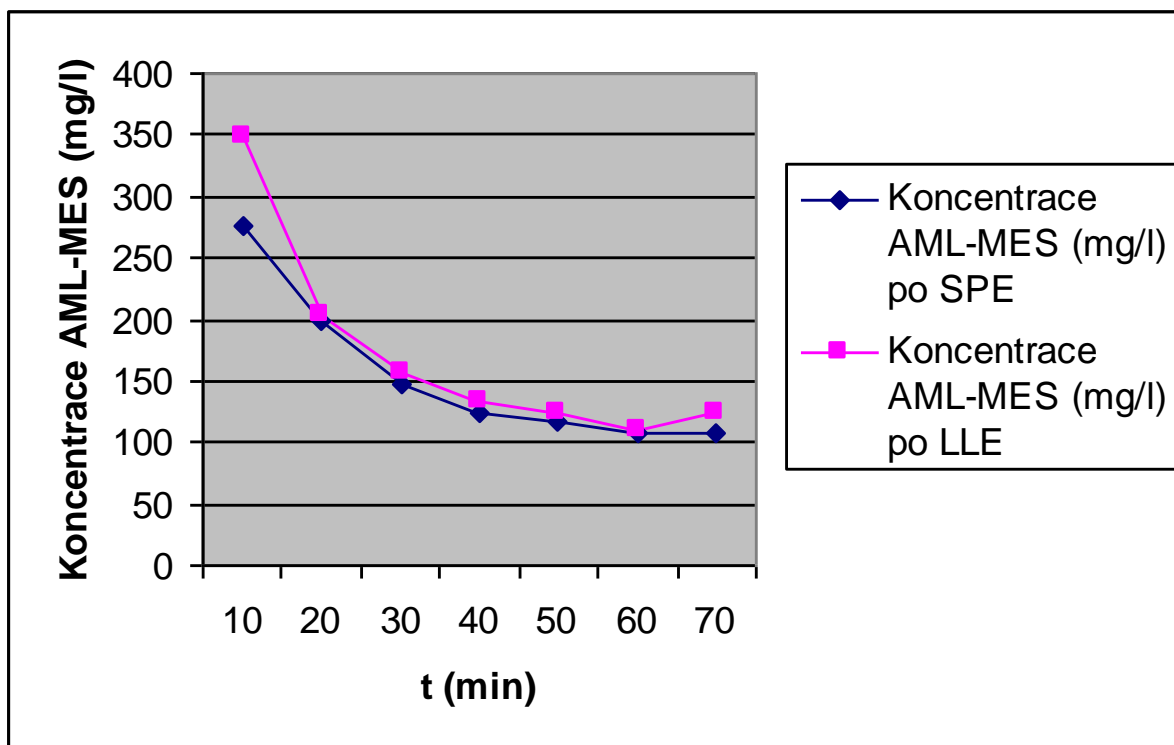
## 6. Výsledky chromatografického stanovení léčiva AML-MES v extraktech z biologického materiálu.

Výsledky, které jsem získala po předchozí SPE, jsem měla možnost konfrontovat s výsledky stejně provedené chromatografické analýzy stejných biologických vzorků po předextrakci kapalina-kapalina (LLE)<sup>[28]</sup>. Tabulka 14 zobrazuje vedle sebe výsledky obou extrakčních metod. Obrázek 11 znázorňuje pokles hladiny léčiva v biologických vzorcích v čase.

Tabulka 14: Výsledky chromatografické analýzy extraktů biologických vzorků získaných optimalizovanou SPE na kyanopropylových tuhých fázích a extrakcí kapalina-kapalina.

čas (minuty)	koncentrace AML-MES (mg/l) po SPE	koncentrace AML-MES (mg/l) po LLE
10	277	349
20	200	204
30	148	156
40	125	134
50	116	125
60	108	111
70	108	123

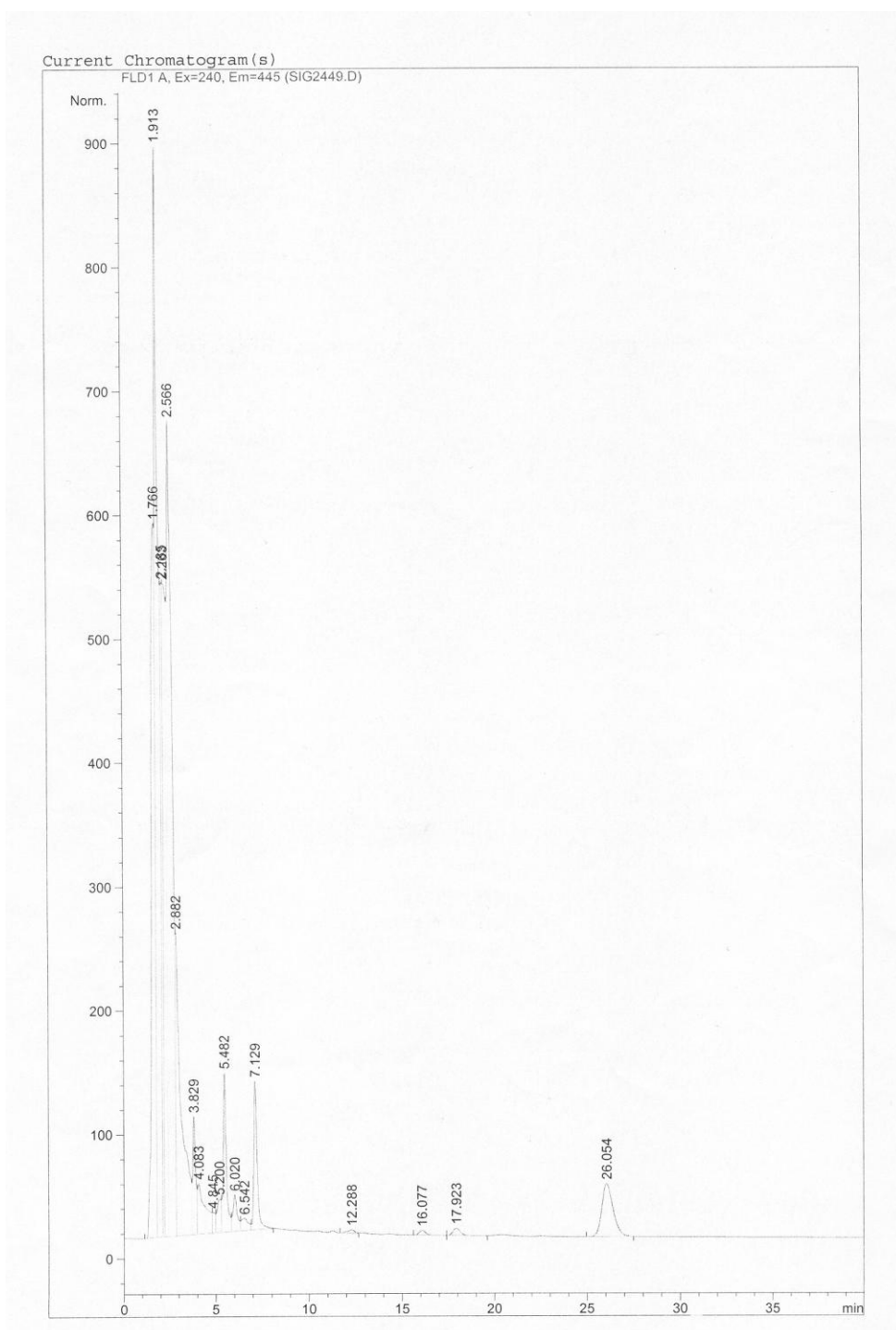
Obr. 11: Pokles hladiny léčiva amlodipinu ve vzorcích biologického materiálu v čase. Koncentrace AML-MES stanovené chromatografickou analýzou po SPE a po předextrakci LLE. Hodnoty vycházejí z tabulky 14.





Obrázek 12 představuje vzorový chromatogram biologického vzorku moči králíků podrobeného SPE na kyanopropylových tuhých fázích. Na chromatografickém záznamu je dobře rozlišitelný pík amlodipinu s retenčním časem  $t_R = 26,054$  min. Počátek chromatogramu zaujímají málo separované píky polárních sloučenin z moči králíků, které se nepodařilo na kolonkách pro SPE oddělit.

*Obr. 12: Vzorový chromatogram biologického vzorku po proběhnutí SPE amlodipinu na kyanopropylových tuhých fázích. Retenční čas AML-MES činí  $t_R = 26.054$  min.*



## Diskuse

### 1. SPE amlodipinu na testovaných SCX sorbentech

Myšlenka použít k SPE amlodipinu SCX tuhé fáze vycházela z poznatků, které jsem nabyla po prostudování některých firemních materiálů [22] a [27] zabývajících se metodou SPE. Firemní materiály zvažují teoreticky vazby charakteristických funkčních skupin obsažených v nejrůznějších analytech na odpovídající sorbenty. S ohledem na charakter léčiva amlodipinu a s využitím teorie zmíněných firemních materiálů hraje zřejmě největší úlohu v navázání amlodipinu na SCX sorbent interakce, ke které dochází mezi kyselou sulfonovou funkční skupinou sorbentu a bazickou aminoskupinou léčiva. Že se AML-MES na SCX sorbent bude skutečně vázat, se potvrdilo během předběžných extrakcí na LC-SCX kolonkách (orientační pokusy, jejichž výsledky ani popis nebyly do diplomové práce [DP] zahrnuty). Na předběžné extrakce navázalo vlastní hodnocení SPE na LC-SCX sorbentech.

S kolonkami LC-SCX jsem provedla postupně tři pokusy, které měly sloužit jako výchozí pro optimalizaci podmínek SPE na kolonkách, zároveň pokusy sledovaly opakovatelnost. Z tabulky 5 ve výsledkové části je patrné, že pokusy č. 1 a č. 2 přinesly přibližně konstantní výsledky, avšak že výsledek pokusu č. 3 se výrazně odlišuje. Vysoká relativní směrodatná odchylka ( $RSD_1$ ) naměřených hodnot koncentrací tří pokusů, která činí 51,2%, koreluje se špatnou opakovatelností SPE na kolonkách LC-SCX. Nízký výtěžek extrakce v pokusu č. 3 byl způsoben s největší pravděpodobností použitím zcela nové kolonky a silnou schopností kyseliny bezensulfonové vázané v kolonkách LC-SCX, zadržovat léčivo, pokud jsou použity kolonky úplně nové. Že je vazba léčiva AML-MES na SCX sorbent skutečně silná potvrdila i měření koncentrací léčiva ve vodě, která prošla kolonkou po nanesení vzorku (pokus č. 3 na SCX sorbentech, tabulka 4). Množství léčiva, které zůstalo po proběhnutí kompletní SPE navázáno na sorbent, odpovídá 1,698 mg/l AML-MES (hodnota vychází z tabulky 4) v rozpouštědle. Výchozí koncentrace AML-MES ve vzorku činila 2,320 mg/l.

Obtíže s mechanickou pevností a následně s opakovatelností, které se objevily během testování fází SCX, způsobily, že jsem tyto tuhé fáze opustila a dál

nezkoumala optimální složení elučního činidla a podmínky pro provedení SPE na LC-SCX kolonkách.

## 2. SPE amlodipinu na kyanopropylových tuhých fázích

Další pokusy s SPE amlodipinu probíhaly na kolonkách naplněných kyanopropylovými sorbenty. Kyanopropylové tuhé fáze vedou k do značné míry nespécifickému zadržení analytů v kolonce, a pokud váží léčivo amlodipin, působí na ně patrně několika typy vazebných interakcí.

Nejdůležitější roli v navázání slabě bazického amlodipinu na tyto fáze hraje interakce koncové primární aminoskupiny léčiva, která je v prostředí vhodného pufru ionizovaná a kladně nabitá, s bazickou funkční CN skupinou tuhé fáze. Vedle slabých iontových vazeb zadržují kyanopropylové sorbenty analyt na svém povrchu také nepolárními vazbami prostřednictvím interakcí uhlovodíkových řetězců. Polárními vazbami působí na analyt reziduální silanolové funkční skupiny sorbentu [22], [29]

Amlodipin (pKa 8,6) může v prostředí acetátového pufru pH=5,23 vázat proton. Prostřednictvím tohoto navázaného protonu se následně může vázat donor-akceptorovou vazbou na CN skupinu sorbentu, která nese volný elektronový pár.

Oproti iontovým interakcím zprostředkovaným SCX sorbenty, které jsem testovala jako první tuhé fáze pro SPE amlodipinu, a které poutaly léčivo velmi silně, se slabší vazby, kterými na AML-MES působí kyanopropylové fáze, zdály být pro SPE léčiva výhodnější.

S Accu Bond Elut CN kolonkami vyplněnými kyanopropylovou tuhou fází jsem prováděla pokusy, při kterých jsem optimalizovala složení elučního činidla pro SPE na těchto kolonkách, sledovala, jak se na výtěžcích extrakcí projeví použití píšťů injekčních stříkaček k protlačování kapalin sorbentem (přetlak) a jak použití vakua (podtlak), hodnotila jsem opakovatelnost.

Z pokusů, které byly zaměřené na optimalizaci složení elučního činidla na kyanopropylových tuhých fázích, vyšlo mj. najevo, že se zvyšujícím se zastoupením amoniakálního 25% roztoku v elučním činidle (eluční činidlo se ve zmíněných pokusech vždy sestávalo z 25% amoniaku a acetonitrilu smíšených v různých objemových poměrech), se také zvyšuje extrakční účinnost SPE na těchto tuhých

fázích. Vůbec nejvyšší extrakční účinnosti (57,6 % v pokusu č. 8 na kyanopropylových tuhých fázích) SPE na kyanopropylových sorbentech jsem dosáhla s elučním činidlem, ve kterém se mísí amoniak 25 % a acetonitril rovným dílem. Protože však poměr 1:1 (v/v) amoniak 25% : ACN příliš nesvědčí materiálům, ze kterých jsou zhotovovány kolonky, a protože výtěžky extrakce, kterých jsem dosáhla s elučním činidlem o složení 1:3 (v/v) amoniaku 25% : ACN, byly jen o málo nižší než předchozí (extrakční účinnost dosáhla 50,79 %), zvolila jsem jako optimum složení elučního činidla pro SPE amlodipinu poměr 1:3 (v/v) v zastoupení obou komponent v elučním činidle.

Během pokusů s SPE na kyanopropylových tuhých fázích jsem také v určitém okamžiku změnila způsob provedení extrakce. Změna přinesla především úsporu času stráveného v laboratoři. Namísto protlačování kapalnou fází kolonkou pomocí pístu injekční stříkačky, jsem začala používat odsávací zkumavku a působit na kapalnou fázi podtlakem. Výsledky, kterých jsem dosáhla při práci s pístem a s odsávací zkumavkou, porovnává tabulka 6 uvedená ve výsledkové části. Z tabulky 6, jejíž součástí jsou také hodnoty RSD pro uvedená měření, a dále z obrázků 6 a 7 vyplynulo, že oba způsoby protlačování kapalných fází kolonkou vedou k prakticky stejným výtěžkům eluce. Rozdíly v nalezených množstvích mg/l AML-MES v extraktech jsou v řádu setin mg/l. Relativní směrodatné odchylky koncentrací léčiva v extraktech z pokusů č. 1 a 5 a č. 2 a 6, přesněji řečeno jejich průměr, který činí 1,9 %, je srovnatelný s relativní směrodatnou odchylkou koncentrací AML-MES v extraktech zjištěnou při sledování opakovatelnosti SPE na kyanopropylových tuhých fázích v pokusech č. 2, č. 3 a č. 4 ( $RSD_4$  je rovna 1,7 %, viz. tabulka 7).

Opakovatelnost SPE prováděné na kolonkách vyplněných kyanopropylovou tuhou fází (vyjádřena jako  $RSD_4$  koncentrací léčiva v extraktech, zmíněna výše) byla na rozdíl od předchozích SPE na LC-SCX kolonkách velmi dobrá. Rozdíly v řádu setin mg/l nalezených hodnot koncentrací AML-MES v extraktech mohly být způsobeny opakovaným použitím jediné kolonky Accu Bond Elut CN během testování opakovatelnosti. Výsledky uvedené v tabulce 7, z nichž je patrná tendence zhoršení retenční schopnosti kolonky při jejím opakovaném použití (každá další SPE měla za následek snížení koncentrace AML-MES v extraktu: nejprve o 0,03 mg/l v pokusu č. 3, později o 0,007 mg/l v pokusu č. 4), jenom potvrzují obecná doporučení výrobců kolonek, používat tyto pouze jedinkrát. Na druhou stranu z pokusů provedených v této práci vyplývá, že při pečlivé reaktivaci sorbentu po

každé proběhlé SPE, lze dosáhnout velmi dobré opakovatelnosti metody i přes několikanásobné použití jediné kolonky.

Pokusy s kolonkami Accu Bond Elut CN doplňují výsledky kontroly adsorpce analytu na tuhou fázi kolonek (tabulka 9). Zde je vhodné poukázat na výsledek této kontroly u pokusu č. 1. Množství léčiva AML-MES v rozpouštědle prošlém kolonkou při SPE spolu se vzorkem při pokusu č. 1 (odpovídá koncentraci 0,240 mg/l AML-MES v rozpouštědle) totiž řádově převyšuje nenavázaná množství léčiva nalezená v následujících pokusech. Větší ztrátu léčiva si vysvětlují nedostatečným zvlhčením sorbentu a málo účinnou kondicionací při prvním použití kolonky. Pro kolonku zcela novou by bylo zřejmě lépe, kdyby EČ použité v pokusu č. 1 ke zvlhčení a kondicionaci tuhé fáze působilo o něco déle nebo vícekrát. Výsledek kontroly adsorpce analytu na sorbent z pokusu č. 1 (vysoká ztráta) vypovídá o situaci, kdy zřejmě první nanášené množství vzorku AML-MES působilo samo zpočátku na sorbent jako kondicionační činidlo a teprve později v dalších pokusech byl AML-MES tuhou fází účinněji zadržován.

Vzhledem ke zmíněným odlišným podmínkám adsorpce analytu na tuhou fázi, které nastaly v pokusu č. 1, není oprávněné zahrnovat výsledek pokusu č. 1 do průměru, jak je uvedeno ve výsledkové části. Pokud výsledek pokusu č. 1 nebudeme při výpočtu průměru uvažovat a použijeme pouze hodnoty koncentrací AML-MES zjištěné v pokusech č. 2-8, sníží se hodnota průměrného množství AML-MES, které se nepodařilo na kolonkách zadržet, z původních 0,063 mg/l AML-MES v rozpouštědle na hodnotu 0,038 mg/l.

### **3. SPE amlodipinu na C<sub>2</sub> tuhých fázích**

Testování použitelnosti C<sub>2</sub> tuhých fází pro SPE amlodipinu mělo své opodstatnění především v odkazech týkajících se SPE léčiva zveřejněných v odborné literatuře.

Kolektiv B.Streela, C. Lainého, C. Zimmera a dalších, jako jeden z mála popisuje ve své práci zabývající se enantioselektivní detekcí amlodipinu kapalinovou chromatografií <sup>[31]</sup> mj. optimalizaci podmínek pro SPE léčiva. Autoři využili k automatické SPE systém ASPEC XL4 (Automated Sample Preparation with Extraction Cartridges). Detaily provedení této SPE jsou součástí článku <sup>[31]</sup>. Jeho

autoři se ve své práci věnovali mj. výběru vhodného sorbentu pro extrakci amlodipinbesylátu. Postupně otestovali  $C_2$ ,  $C_4$ ,  $C_8$  a  $C_{18}$  tuhé fáze, některé z nich s maskováním koncových hydroxylů silanolových reziduálních skupin, kdy nejlepších výsledků (porovnávali extrakční výtěžnost na jednotlivých kolonkách) dosáhli s  $C_8$  a  $C_2$  tuhými fázemi. Jako optimální pro své zkoumání zvolili nakonec  $C_2$  tuhé fáze s „endcappovanými“ koncovými hydroxylovými skupinami. Pokusy s kyanopropylovými sorbenty nejsou součástí jejich práce.

Vedle B. Streela a jeho kolegů používali  $C_2$  tuhé fáze pro SPE amlodipinu před následnou HPLC analýzou léčiva také M. Josefsson, A.L. Zackrisson a B. Norlander <sup>[32]</sup>, kteří ovšem neuvádějí optimalizaci podmínek SPE.

S ohledem na oblíbenost  $C_2$  sorbentů pro SPE léčiva amlodipinu, jak jsem ji našla v dostupné literatuře, zkoušela jsem pro porovnání ve své práci rovněž  $C_2$  sorbenty.

Pokusy s SPE amlodipinu na  $C_2$  tuhých fázích jsem prováděla se vzorky AML-MES rozpuštěnými postupně ve dvou odlišných prostředích. Nejprve jsem vyšla na  $C_2$  tuhých fázích ze stejných podmínek jako při SPE na kyanopropylových sorbentech [AML-MES ve vzorku se nacházel v prostředí směsi acetátového pufru (pH 5,23): acetonitrilu 7:3 (v/v)]. Následně jsem pro SPE na nepolárních  $C_2$  fázích volila rozpuštění AML-MES v pufru borátovém (pH 9,20), který se ukázal ve vztahu k pKa léčiva 8,6 a hydrofobním interakcím, které by měly mezi  $C_2$  tuhou fází a léčivem působit, výhodnější. Rozpuštění AML-MES v pufru borátovém (pH 9,20) jsem upřednostnila po provedení pokusu č. 1 na  $C_2$  fázích (tabulka 10).

Další pokusy s  $C_2$  sorbenty pro SPE amlodipinu (č. 2 a 3), ve kterých jsem sledovala vliv složení elučního činidla na výtěžek extrakce, potvrdily zkušenosti s elučními činidly získané při testování kyanopropylových tuhých fází. Totiž, že zvyšujícím se zastoupením amoniaku 25% v elučním činidle se zvyšuje také výtěžek extrakce.

Pro porovnání SPE na  $C_2$  tuhých fázích s výsledky SPE, kterých jsem dosáhla na kyanopropylových sorbentech, jsem provedla pokus č. 4. Výsledek, který tento pokus přinesl, je součástí tabulky 12. Z výsledků obsažených v tabulce 12 vyplývá, že SPE na kyanopropylových tuhých fázích je pro amlodipin výhodnější nežli SPE na fázích  $C_2$ .

Vzhledem k tomu, že se AML-MES lépe sorbuje na C<sub>2</sub> tuhé fáze ze zásaditějšího prostředí by bylo možné soudit, že interakce amlodipinu s volnými silanolovými skupinami sorbentu nehraje žádnou vážnou roli. Při vyšším pH je samotný amlodipin v nedisociované formě, což jej preferuje pro vazbu hydrofobní interakcí na C<sub>2</sub> řetězce, zatímco volné silanolové skupiny jsou již disociovány, proto amlodipin neváží. Při nižším pH je vazba amlodipinu hydrofobní interakcí oslabena jeho protonizací. Avšak studium podmínek eluce svědčí spíše o tom, že vazba na silanoly svůj význam má, neboť lze vyzorovat jistou závislost výtěžku SPE na obsahu amoniaku v elučním činidle (viz výše). Je totiž zřejmé, že amoniak způsobí deprotonizaci amlodipinu a naváže se sám na volné silanolové skupiny. Je totiž možné, že vzhledem k hodnotě pKa 8,6 amlodipinu je jistá malá část molekul této látky při pH 9,20 (pH, při kterém byl vzorek nanášen na kolonky) v protonizovaném stavu a silanolové skupiny již mohou být částečně disociovány. Na základě těchto skutečností se lze domnívat, že při vazbě amlodipinu na C<sub>2</sub> tuhé fáze se uplatňují jak hydrofobní interakce, tak interakce prostřednictvím vodíkových můstků.

Stejný názor zastávají M. Josefsson a jeho spolupracovníci [32], kteří se domnívají, že za vazbu na amlodipin jsou u C<sub>2</sub> tuhých fází vedle hydrofobních interakcí zodpovědné především residuální silanolové skupiny s afinitou k bazické primární aminoskupině léčiva.

#### 4. SPE vnitřního standardu pyrenu

Optimální postup SPE (extrakce na kyanopropylové tuhé fázi), kterým jsem zpracovávala vzorky AML-MES, jsem používala také při SPE vzorků pyrenu, vnitřního standardu pro předpokládané HPLC analýzy amlodipinu s fluorimetrickou detekcí. Výsledky SPE, kterých jsem dosáhla s kyanopropylovými sorbenty u pyrenu, jsou součástí tabulky 13 uvedené ve výsledkové části. Emisní vlnová délka amlodipinu a pyrenu se liší. Různé vlnové délky fluorescenčních maxim léčiva a vnitřního standardu však nejsou překážkou pro chromatografickou analýzu látek, neboť současné HPLC detektory, včetně detektoru, pro který byla metodika vyvíjena, umožňují měření při více vlnových délkách současně. Intenzity fluorescence zjištěné

u vzorků pyrenu po proběhnutí SPE ukazují, že tato látka by mohla sloužit v roli vnitřního standardu při HPLC analýze vzorků amlodipinu.

## **5. SPE a LLE biologického materiálu**

Závěrem diskuse je třeba se zmínit o výsledcích SPE amlodipinu z biologického materiálu. Součástí výzkumu, který se zabýval amlodipinem a který proběhl svého času na FaF UK v HK, byly i nepublikované výsledky Ing. Kubíčka týkající se LLE amlodipinu<sup>[28]</sup>. Konkrétní čísla jsou uvedena ve výsledkové části (viz. tabulka 14). Tabulka 14 nabízí srovnání výsledků z pokusů provedených dvěma izolačními metodami - LLE a SPE - léčiva amlodipinu. U zmíněných pokusů nebyla hodnocena extrakční účinnost, přesto lze, vzhledem k tomu, že k měření hladin léčiva v extraktech získaných oběma extrakčními metodami byla použita tatáž metoda HPLC a naměřené hladiny jsou přibližně stejné, soudit, že právě extrakční účinnost obou metod je stejná.

## **6. Nástin dalších kroků v problematice SPE amlodipinu s ohledem na výsledky dosažené v diplomové práci**

Způsob, kterým jsem zpracovávala vzorky AML-MES pomocí SPE pro následnou HPLC analýzu léčiva, mi umožnil po optimalizaci metodiky připravovat tyto vzorky v relativně krátkém čase. Vlastní manuální práce, která připadla na zpracování jednoho vzorku biologického materiálu při manipulaci s předem připravenými činidly a roztoky a s použitím dvou odsávacích zkumavek (do jedné jsem sbírala všechny frakce z SPE před elucí, do druhé eluát s léčivem), nakonec po optimalizaci podmínek SPE trvala asi 6 minut. Určitě by bylo možné metodiku, jak je u SPE obvyklé, automatizovat a zkrátit čas potřebný k úpravě vzorků. Toto je jedna z výhod SPE oproti LLE, která je stále rovněž doporučována k předextrakci vzorků AML-MES před chromatografickou analýzou.

Ačkoli není jasné proč většina autorů, kteří se dosud vyjádřili k SPE amlodipinu, s oblibou používá k vyčištění biologických vzorků tohoto léčiva extrakci na C<sub>2</sub> tuhých fázích, domnívám se, že upřednostnění C<sub>2</sub> fáze plyne především z univerzálnosti vazeb, kterými působí. Výzkumníci většinou sledují především hlavní



cíl své práce, který často spočívá v optimalizaci chromatografických podmínek pro analýzu AML-MES, a v otázce izolace léčiva ze vzorku biologického materiálu vsadí buď na pracnou, ale osvědčenou LLE, nebo pokud volí SPE, řídí se materiály, které poskytují výrobci SPE kolonek. Firemní materiály, i když se snaží všemožně usnadnit výběr vhodného typu sorbentu, se nezabývají konkrétní sloučeninou. Léčiva jsou většinou velmi slabé kyseliny nebo báze, proto není divu, že pracovníci analytických laboratoří často inklinují k v chromatografii osvědčeným nepolárním sorbentům. Nakonec výsledky, které s nimi dosahují jsou zřejmě dostatečné, proto necítí potřebu metodiku SPE pro HPLC amlodipinu dále vylepšovat.

SPE léčiva amlodipinu před jeho chromatografickou analýzou je alternativní metodou LLE tohoto léčiva. LLE amlodipinu je však přes řadu svých nesporných výhod (jednoduchost provedení, nenáročnost ve vztahu k potřebnému laboratornímu zařízení) na rozdíl od SPE izolační metodou obtížně automatizovatelnou a výrazně pracnější. SPE amlodipinu na kyanopropylových tuhých fázích by tak mohla najít uplatnění například v případě potřeby rychlého zpracování řady biologických vzorků jako tomu bývá v rámci terapeutického nebo toxikologického monitorování lékových hladin, právě pro možnost své snadné automatizace.

## Závěr

Cílem této diplomové práce bylo nalézt vhodný postup předextrakce amlodipinu pomocí SPE pro HPLC analýzu, aby bylo možné změřit poměrně nízké koncentrace tohoto léčiva v plazmě a v jiných biologických vzorcích, které jsou získávány od pacientů. Práce přinesla podle mého názoru některé použitelné výsledky a nalezený postup SPE amlodipinu pro HPLC analýzu je možné doporučit pro laboratorní využití.

Během práce jsem otestovala řadu sorbentů vhodných pro SPE léčiva amlodipinu a metodu na vybraných kolonkách zdokonalila. Nejlepších výsledků a tedy nejvyšších výtěžků léčiva v extraktech biologických vzorků jsem dosáhla s kyanopropylými tuhými fázemi. SPE na těchto sorbentech probíhala nejlépe pokud jsem k eluci a také kondicionaci sorbentu použila směs amoniaku 25% a acetonitrilu 1:3 (v/v) a upravovala chemický charakter léčiva ve vzorcích přidávkem acetátového pufru (pH 5,23).

Z hlediska využití pro prvotní úpravu biologických vzorků před následující HPLC analýzou studovaného léčiva se výše popsany postup SPE amlodipinu ukázal jako s LLE srovnatelná izolační metoda. Do budoucna by mohla být rozvíjená především automatizace metody, neboť právě možnost automatizace metody SPE je její nespornou výhodou oproti LLE.

## Použitá literatura:

- [1] R.D. McDowall, Review: Sample preparation for biomedical analysis, *J. Chromatogr.*, 492, 3 (1989).
- [2] M. Moors, D.L. Massart, R.D. Mc Dowall: Analyte Isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 66, No.2, 227, 1994.
- [3] R.D.McDowall, J.C. Pearce a G.S. Murkitt: Liquid-solid sample preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 3 (1986).
- [4] L.R. Snyder, J.J. Kirkland: Introduction to modern liquid chromatography, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc. 1979.
- [5] M. Zief and R. Kiser: Solid phase extraction for sample preparation, J.T. Baker, Phillipsburg, PA, 1988.
- [6] J.V. Greenwood: Bonded-phase extraction for rapid sample preparation, *Bio/Technology*, 5, 76 (1987).
- F.J. Al-Shammary, Review: Sample preparation of catecholamines and biologically active peptides by solid phase extraction, *J. of High Res. Chromatogr.*, 13, 309 (1990).
- [7] Z.L. Rosseti, G. Mercurio and C.A. Rivano: A study of the parametres affecting flow gradient analysis of catecholamines, DOPA and DOPAC by ion pair liquid chromatography with electrochemical detection, *Life Sciences*, 33, 2387 (1983).
- [8] I. Liška, J. Krupčík, P.A. Leclercq: The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices – a review of solid-phase extraction techniques, *J. of High Res. Chromatogr.*, 12, 577 (1989).
- [9] E. Doyle, R.D. McDowell, G.S. Murkitt, V.S. Picot , S.J. Rogers: Two systems for the automated analysis of drugs in biological fluids usig high-performance liquid chroatography, *J. Chromatogr.*, 527, 67 (1990).
- [10] G. Musch, D.L. Massart: Isolation of basic drugs from plasma using solid-phase extraction with a cyanopropyl bonded phase, *J. Chromatogr.*, 432, 209 (1988).
- [11] M.W.F.Nielen, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman: Selective sample handling and detection in high-performance liquid chromatography, část A, kap. 1, 1989, Elsevier, Amsterdam.
- [12] S. Süß, W. Seiler, C. Hiemke a kol.: Determination of benperidol and its reduced metabolite in human plasma by HPLC and electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, 565, 363 (1991).

- [13] W.H. Bradbury, R.D. Coldwell, D.J. Trafford: A semi-automated high-performance liquid chromatographic system for determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6, 919 (1988).
- [14] H. Terada, Z. Sakabe: Studies on the analysis of food additives by HPLC: Simultaneous determination of preservatives and saccharin in foods by ion-pair chromatography, *J. Chromatogr.*, 346, 333 (1985).
- [15] D.E.M.M. Vendrig, J. Teeuwssen, J.J.M. Holthius: Determination of vinca alkaloids in plasma and urine using ion-exchange chromatography on silica gel and fluorescence detection, *J. Chromatogr.*, 434, 145 (1985).
- [16] K.H. Lehr, P. Damm: Quantification of ciclopirox by HPLC after pre-column derivatization, *J. Chromatogr.*, 339, 451 (1985).
- [17] G.A. Junk, J.J. Richard: Organics in water: Solid phase extraction on a small scale, *Anal. Chem.*, 60, 451 (1988).
- [18] K.G. Furton, J. Rein: Trends in techniques for the extraction of drugs and pesticides from biological specimens prior to chromatographic separation and detection, *Anal. Chim. Acta*, 236, 99 (1990).
- [19] K.C. Horne (Editor): Sorbent technology handbook, Analytichem International, Harbor City, 1985.
- [20] A.L. Lafleur, P.A. Monchamp, N.T. Chang a kol.: Evaluation of cyano bonded phases for the fractionation of bioactive mixtures, *J. of Chromatogr. Sci.*, 26, 337 (1988).
- [21] G.A. Junk, M.J. Avery, J.J. Richard: Interferences in solid-phase extraction using C-18 bonded porous silica cartridges, *Anal. Chem.*, 60, 1347 (1988).
- [22] Guide to solid phase extraction, firma SUPELCO, Bulletin 910, 1998.
- [23] T. Toyooka, W.G. Nayler, *Blood Pressure* 5, 206 (1996). Převzato z Klasifikace blokátorů kalciového kanálu <sup>[24]</sup>.
- [24] Klasifikace blokátorů kalciového kanálu, *Medicína 3/VII, Kardiologie*, 11 (2000).
- [25] Souhrn údajů o přípravku, <http://agen.zentiva.cz/agen2.html>
- [26] Summary of product characteristic Lotrel, Novartis, T2004-36, 89008409, <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/lotrel.pdf>
- [27] firemní materiál Lambda Life a.s., [www.lambda.sk](http://www.lambda.sk)
- [28] V. Kubíček : Nепublikované výsledky.
- [29] [http://www.weber.hu/PDFs/Argonaut/SPE\\_Foods\\_Szeged.pdf](http://www.weber.hu/PDFs/Argonaut/SPE_Foods_Szeged.pdf)

[30] J. Lukša, Dj. Josič, M. Kremser a kol.: Pharmacokinetic behavior of R –(+)- and S-(-)-amlodipine after single enantiomer administration, J. Chromatogr. B, 703, 185 (1997).

[31] B. Streel, C. Lainé, C. Zimmer a kol.: Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Biochem. Biophys. Methods 54, 357 (2002).

[32] M. Josefsson, A. Zackrisson, B. Norlander: Sensitive HPLC analysis of amlodipine in human plasma with amperometric detection and a single step solid-phase sample preparation, J. Chromatogr. B, volume 672, 310 (1995).