

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

HPLC analýza isoxikamu v krvi s využitím fluorimetrické detekce

Rigorózní práce
Vědní obor: Analytická chemie

Konzultant rigorózní práce: Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Hradec Králové 2013

Mgr. Petra Pavelková

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za odborné vedení během zpracování této rigorózní práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Rigorózní práce vznikla za podpory projektu SVV-265-001

Obsah

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	3
2.1. Chromatografické metody	4
2.1.1 Chromatografické metody – rozdělení.....	4
2.1.2 Chromatografické metody – základní pojmy a definice	6
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	9
2.2.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	10
2.2.2 Modernizace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii	18
2. 3. Úprava vzorku biologického materiálu pro HPLC analýzu	19
2. 3. 1 Deproteinace biologického materiálu	19
2. 3. 2 Liquid – liquid extrakce	20
2. 3. 3 Solid - phase extrakce	21
2. 3. 4 Solid - phase mikroextrakce	24
2. 3. 5 Superkritická fluidní extrakce.....	25
2. 3. 6 Molekulárně vtištěné polymery	25
2.4. Validace bioanalytické metody	26
2.4.1 Selektivita	26
2.4.2 Správnost	26
2.4.3 Přesnost	26
2.4.4 Recovery	27
2.4.5 Kalibrační křivka	27
2.4.6 Rozsah.....	28
2.4.7 Robustnost	28
2.4.8 Detekční limit	28
2.4.9 Kvantitativní limit	28
2.5. Isoxikam	29
2.6. Analýza isoxikamu a dalších oxikamů – literární údaje.....	31
3. CÍL PRÁCE	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1 Použitý materiál a přístroje.....	40
4.2 Příprava roztoků	41
4.3 Chromatografické podmínky analýzy isoxikamu.....	42
4.4 Izolace léčiva z krve metodou solid-phase extrakce.....	43
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	44

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek	45
5.2 Výběr vnitřního standardu	47
5.3 Izolace isoxikamu ze vzorku plné krve extrakcí na pevné fázi.....	49
5.4 Extrakční účinnost (Recovery)	51
5.5 Kvantitativní hodnocení isoxikamu.....	52
5.5.1 Sestrojení kalibrační křivky	52
5.5.2 Ověření kalibrační křivky.....	56
5.5.3 Modelové vzorky	57
5.6 Validace.....	59
5.6.1 Selektivita.....	59
5.6.2 Přesnost	60
5.6.3 Správnost	63
5.6.4 Linearita	63
5.6.5 Detekční a kvantitativní limit	63
5.6.6 Robustnost	65
5.6.7 Souhrné zhodnocení validace metody.....	68
6. ZÁVĚR.....	69
7. LITERATURA.....	71
ABSTRAKT	75
ABSTRACT.....	76

1. ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je významnou a nepostradatelnou moderní analytickou metodou. Oblast jejího využití v praxi je velmi široká a zasahuje do širšího okruhu analytických problémů, neboť umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého množství organických i anorganických látek, také látek termolabilních a netěkavých, nízko- i vysokomolekulárních.

V posledních letech zaznamenala vysokoučinná kapalinová chromatografie významný pokrok ve vývoji instrumentace a nových typů kolon, které umožňují výrazně zrychlit analýzu, zvýšit počet látek separovaných v jednom nástřiku vzorku a rozšířit spektrum analyzovaných látek.

Moderní analytické metody představované vysokoučinnou kapalinovou chromatografií, plynovou chromatografií a imunochemickými metodami slouží klinickým laboratořím k zajištění terapeutického monitorování léčiv. Terapeutické monitorování léčiv chápáné jako stanovení léčiv a jejich metabolitů, umožnilo optimalizaci dávkování léčiv ve vztahu k terapeutickému účinku, výpočet farmakokinetických parametrů u léčiv nových a stanovení biologické dostupnosti léčiv při řízené terapii nebo při terapii otrav. Imunochemické metody neumožňují stanovit léčivo odděleně od metabolitů, což je často příčinou zkreslení vztahu mezi koncentrací léčiva a jeho účinkem. Náklady na jednu analýzu jsou při použití imunometod vyšší než u metod chromatografických. Chromatografické metody vyžadují přípravu vzorku a jsou časově náročnější, umožňují selektivní stanovení léčiva a jeho metabolitů.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je účinnou separační metodou, umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Její přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody nelze principiálně použít. V současné době je vysokoučinná kapalinová chromatografie pro své výhody nejužívanější metodou pro analýzu léčiv.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Nepohyblivá stacionární fáze různou měrou zadržuje jednotlivé součásti analyzované směsi, pohyblivá mobilní fáze eluuje jednotlivé součásti směsi ze stacionární fáze a odnáší je, čímž se složky od sebe separují. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha, každá molekula látky je mnohokrát zachycena sorbentem a uvolněna do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na velikosti interakcí při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami. ¹⁾

2.1.1 Chromatografické metody – rozdělení

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

Podle separačního děje

Adsorpční chromatografie

K separaci dochází v důsledku rozdílné schopnosti adsorpce složek na povrch stacionární fáze.

Rozdělovací chromatografie

K separaci látek dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů, odlišné rozpustnosti ve stacionární a mobilní fázi.

Iontově výměnná chromatografie

Separovat je možné elektrolyty schopné existence v iontové formě. Separace probíhá na základě různě velkých elektrostatických sil mezi ionty separované látky a funkčními skupinami iontoměniče, stacionární fáze.

Gelová chromatografie

Látky se dělí podle velikosti molekul na pórovité stacionární fázi (gelu) na základě molekulově síťového efektu. Menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle.

Afinitní chromatografie

Stacionární fáze selektivně váže určité složky vzorku na základě specifických interakcí.

Podle použité techniky a eluční síly mobilní fáze

Frontální chromatografie

Technika, při níž se vzorek zavádí na kolonu kontinuálně jako mobilní fáze. V čistém stavu je možno získat pouze nejslaběji sorbovanou složku.

Vytěšňovací chromatografie

Technika využívající nejsilněji sorbované složky jako vytěšňovadla. Vzorek se zavádí diskontinuálně, mobilní fáze má větší schopnosti sorbovat se stacionární fází, než jakou mají složky vzorku, které jsou proto úplně vytěšňovány ze stacionární fáze a vycházejí z kolony před čelem silně se sorbující složky mobilní fáze.

Eluční chromatografie

Technika, při níž je přiváděna mobilní fáze, která obsahuje analyzované látky. Vzorek se zavádí diskontinuálně a jeho složky jsou na koloně silněji sorbovány než molekuly mobilní fáze, takže látky jsou z kolony eluovány v pořadí podle velikosti sorpce na stacionární fází a jsou od sebe odděleny mobilní fází. Tímto způsobem se dosáhne nejlepšího rozdělení vzorku. Eluční způsob vyvíjení je možné realizovat v několika variantách.

Při jednoduché eluci se kolona promývá stále stejnou mobilní fází tak dlouho, až dojde k oddělení jednotlivých složek a oddělené látky postupně opustí kolonu v roztoku mobilní fáze. Velmi silně sorbované složky se nedají z kolony eluovat a je třeba použít některý z dalších postupů.

Vícestupňová eluce se provádí postupným promýváním kolony několika eluenty, z nichž každý následující má vždy vyšší eluční schopnost.

Při gradientové eluci se postupně plynule mění pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fází. Tento způsob vyvíjení se používá zejména při dělení komplikovanějších směsí.

Podle skupenství mobilní a stacionární fáze

Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC)

Mobilní fází je kapalina.

Chromatografie kapalina – pevná látka

Chromatografie kapalina – kapalina

Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GC)

Mobilní fází je plyn.

Chromatografie plyn – pevná látka

Chromatografie plyn – kapalina

Podle uspořádání stacionární fáze

Kolonová chromatografie

Stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).

Plošné techniky:

Papírová chromatografie (Paper Chromatography - PC): stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography - TLC): stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové folii).^{1, 2, 3)}

2.1.2 Chromatografické metody – základní pojmy a definice

Chromatogram

Chromatogram představuje grafický nebo jiný záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny, použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii. ⁴⁾

Retenční čas a retenční objem

Retenční čas a objem jsou veličinami charakteristickými pro každou chromatografovanou látku v daném chromatografickém systému. Retenční čas t_R je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a retenční objem V_R je objem mobilní fáze proteklé za tuto dobu. Tyto dvě veličiny spolu souvisejí vztahem:

$$V_R = t_R \cdot v$$

kde v je průtoková rychlost mobilní fáze. ^{2, 4)}

Hmotnostní distribuční poměr

Hmotnostní distribuční poměr D_m je definován jako poměr množství látky rozpuštěné ve stacionární fázi a množství látky rozpuštěné ve fázi mobilní. Hmotnostní distribuční poměr složky se může určit z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = (t_R - t_M) / t_M$$

kde t_R , je retenční čas nebo objem, vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídající dané složce. t_M je mrtvý čas nebo objem, tedy vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce. ⁴⁾

Faktor symetrie

Faktor symetrie píku A_S nebo také faktor chvostování píku se určí podle vzorce:

$$A_S = w_{0,05} / 2d$$

v němž značí $w_{0,05}$ šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky a d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 představuje úplnou, ideální symetrii píku. ⁴⁾

Počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra

Počet teoretických pater n se vypočítá podle vzorce, dosazením experimentálně získaných parametrů

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

kde Y_V je šířka píku v základně vyjádřená v jednotkách objemu.

Výškový ekvivalent teoretického patra H se určí z čísla n , počtu teoretických pater a celkové délky kolony L podle vzorce:

$$H = L / n$$

Tato data slouží k hodnocení účinnosti kolony. ^{2, 5)}

Rozlišení

Rozlišení R_S mezi píky dvou složek lze získat ze vzorce

$$R_S = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / w_{H1} + w_{H2}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} a t_{R2} značí retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků a w_{H1} a w_{H2} šířky píků v poloviční výšce.

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Výše uvedený vzorec nemusí být použitelný, nejsou-li píky rozděleny na základní linii. ⁴⁾

Poměr výšky píku k sedlu

Jestliže není dosaženo oddělení dvou píků na základní linii, lze použít jako kritérium způsobilosti systému ve zkoušce na příbuzné látky poměr výšky píku k sedlu p/v .

$$p/v = H_p / H_v$$

H_p značí výšku menšího píku nad extrapolovanou základní linií a H_v výšku nejnižšího bodu křivky oddělující menší a větší pík nad extrapolovanou základní linií. ⁴⁾

Poměr signálu k šumu

K výpočtu poměru signálu k šumu S/N slouží vzorec

$$S/N = 2H/h$$

H značí výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky. h je rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík. ⁴⁾

Kvantitativní analýza

Koncentrace separované látky se vyhodnocuje z plochy chromatografického píku, eventuelně z výšky píku.

Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje vždy relativně, tedy s použitím standardů. Nejčastěji se používají tyto metody. ²⁾

Metoda vnějšího standardu. Koncentrace stanovované složky se určí porovnáním odezvy píků složky naměřené pro zkoušený roztok a odpovídající odezvy naměřené pro porovnávací roztok. ⁴⁾

Metoda vnitřního standardu. Ke zkoušenému roztoku a porovnávacímu roztoku se přidají stejná množství látky, kterou lze rozlišit od zkoušené látky, vnitřní standard. Vnitřní standard nesmí reagovat se zkoušenou látkou, nesmí obsahovat nečistoty s retenčním časem podobným retenčnímu času zkoušené látky. Koncentrace zkoušené látky se stanoví porovnáním poměru ploch píků nebo výšek píků stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro porovnávací roztok. ⁴⁾

2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je instrumentální analytická metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi s vysokou selektivitou a citlivostí. Vysoké tlaky a malé částice s jednotnou velikostí, homogenně naplněné v koloně, zajišťují vysokou účinnost a rychlost analýzy.

Podstatný rozvoj této chromatografické disciplíny umožnila moderní instrumentace, vyvinutí citlivých detektorů, příprava náplní kolon s definovanými vlastnostmi a velmi malými rozměry částiček a dosažení reprodukovatelných průtoků mobilní fáze.²⁾

Jednou z hlavních předností kapalinové chromatografie je široká možnost využití různých vzájemných interakcí mobilní fáze se stacionární fází a dělenými látkami, což umožňuje ovlivňovat retenci chromatografovaných látek a selektivitu jejich dělení. Principem kapalinové chromatografie je tedy interakce analyzovaného vzorku se sorbentem kolony a protékající mobilní fází. V důsledku fyzikálně chemických vlastností sorbentu a mobilní fáze dochází k rozdělení analyzovaného vzorku na koloně do různých zón.⁶⁾

K hlavním přednostem HPLC patří možnost kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek, práce s minimálním množstvím vzorku, vysoká rychlost, účinnost a reprodukovatelnost analýzy a možnost automatizace.

Využití HPLC v praxi je velmi široké neboť umožňuje analýzy od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny a také analýzy termolabilních a netěkavých sloučenin.¹⁾

2.2.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Kapalinový chromatograf je tvořen částmi, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, jejich detekci a vyhodnocení získaného chromatogramu. V technické konstrukci kapalinových chromatografů existují dva přístupy. První přístup představuje stavebnicový systém, druhý je charakterizován kompaktní konstrukcí. Konkrétní uspořádání může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno řazení základních dílů za sebou.^{2, 6)}

Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze jsou skleněné nebo nerezové nádoby o objemu do dvou litrů, opatřené ryskami a uzávěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky. Mobilní fáze je čerpána přes filtry odstraňující mechanické nečistoty větší než 5 μm . Zásobníky mobilní fáze jsou spojeny s odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem. Mobilní fáze je při izokratické eluci vedena buď z jednoho zásobníku do vysokotlakého čerpadla, nebo se při gradientové eluci přiváděné proudy z několika zásobníků mísí podle programu ve směšovači zařazeném před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Mobilní fázi je třeba předem zbavit pohlcených plynů. Odvzdušnit je možné ultrazvukem, vakuem nebo probubláváním inertním plynem. Přívod inertního plynu dnes není potřeba, komerčně jsou dodávány pneumatické odplyňovače.^{2, 3, 6)}

Vysokotlaká čerpadla a tlumiče pulsů

Čerpadlo vysokoúčinného kapalinového chromatografu má za úkol dopravovat mobilní fázi konstantním průtokem a s minimem tlakových pulsů, případně zajistit mísení mobilní fáze pro gradientovou eluci. Mobilní fáze se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo docílí průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Materiálem čerpadla je nerezová ocel, keramika nebo plast.

Rozlišují se pístová a membránová čerpadla. Pístové čerpadlo se skládá z elektromotoru, převodního mechanismu, pístu, výtlačného ventilu a sacího ventilu. Membránové čerpadlo má prostor s pístem naplněný hydraulickou kapalinou, který je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou.

Pro eliminaci rušivých rázů jsou používána dvojčinná čerpadla, v sérii zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou nebo více pístů. Řízení čerpadla mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulsů.

Čerpadla bývají dále rozlišována na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají poměrně malý objem pracovní komory a potřebného průtoku je dosahováno opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory. Bezpulsni čerpadla pracují s velkým objemem pracovní komory, což umožňuje realizaci mnoha analýz bez obnovy náplně. Poskytují tak hladší průtok mobilní fáze, reprodukovatelnost tvorby gradientu mobilní fáze je však horší.^{2, 3, 6, 8)}

Dávkovací techniky

Analyzovaný vzorek je nejprve rozpuštěn ve vhodném rozpuštědle, nejlépe v mobilní fázi a je dávkován na kolonu chromatografu. Dávkovaný objem se pohybuje v rozmezí od 1 μ l až po 100 μ l, v průměru 10 až 50 μ l.

Dávkování injekčními mikrostříkačkami je již zastaralý způsob dávkování vzorku. Přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Injekční zařízení může být ovládáno ručně i automaticky. Techniky dávkování při zastavení toku mobilní fáze (stop flow) odstraňují některé tyto nedostatky, injekční dávkování je provedeno za běžného tlaku.

Injekční systémy bývají nahrazeny dávkováním obtokovým dávkovacím kohoutem, který zajišťuje konstantní aplikaci vzorku na analytickou kolonu. Dávkované množství je dáno objemem vnitřního prostoru ventilu nebo objemem kapiláry ve tvaru smyčky připojené k ventilu. Používá se šesticečný dávkovací ventil se smyčkou o obsahu 10 nebo 20 μ l. Oblíbený je i systém se sedmicečným kohoutem, který přináší možnost měnit dávkovací smyčky různého objemu. Smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky.

Autosampler je automatický dávkovač, který se vyznačuje vysokou přesností dávkování a umožňuje dávkovat řadu vzorků po sobě bez jakéhokoliv zásahu obsluhy přístroje. ^{1, 2, 3, 7)}

Chromatografické kolony

Ve vysokoučinné kapalinové chromatografii má výběr a volba kolon a jejich příslušenství rozhodující význam. Mnoho rozličných aplikací kapalinové chromatografie podmiňuje existenci velkého množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně. Na HPLC kolony jsou kladeny značné nároky s ohledem na reprodukovatelnost a robustnost analytických metod. Kolony musí být mechanicky stabilní, mají mít vysokou účinnost, poskytovat symetrické píky a měly by mít co nejvyšší permeabilitu, tzn. malý odpor i při vysokých průtocích mobilní fáze. Novým požadavkem na kolony je kompatibilita s technikou HPLC – MS.

Jako materiál na výrobu kolon se z kovů nejlépe osvědčila nerezová ocel. Jako skleněné kolony jsou nejvhodnější trubice z borosilikátového skla, odolávající silně kyselým roztokům.

Délka analytické kolony se pohybuje od 10 do 250 mm, závisí na materiálu, jímž je naplněna a na tom, kolika teoretických pater je zapotřebí k separaci dané směsi látek. Vnitřní průměr kolony se pohybuje od 1,0 do 4,6 mm. Běžný průtok eluátu je 1 až 2 ml/min.

Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater, jsou vhodné krátké analytické kolony délky jen 30 mm. Jsou levnější a spotřebují malé množství mobilní fáze, objemový průtok eluentu je 4 ml/min.

Kolony s velmi malým vnitřním průměrem, mikronáplňové, mají vnitřní průměr 1 až 2 mm a délku 250 až 500 mm, mají vysokou účinnost, nejsou drahé a spotřebují málo rozpouštědla, 10 až 100 μ l/min.

Kapilární kolony mají vnitřní průměr 10 µm a průtok eluentu v nl/min.

Náplňový materiál pro analytické kolony má průměr 3 až 10 µm, nejčastěji 3,5 µm, kratší kolony jsou plněny jemnější náplní. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se používají kolony plněné a testované výrobcem.

Účinnost kolony závisí nejen na kvalitě použitého sorbentu, ale i na délce kolony, jejím tvaru, na materiálu z něhož je zhotovena, jejím vnitřním povrchu, na spojovacích součástech a na různých dalších faktorech. Čím menší je velikost částic sorbentu, tím větší účinnosti separace je dosaženo.

Vhodnost kolony pro určitou separaci je třeba v konečné fázi vždy ověřit na separaci daného typu vzorku.^{2, 3)}

Náplně chromatografických kolon (stacionární fáze)

Sorbenty chromatografických kolon můžeme rozdělit podle struktury na partikulární a monolitní. Podle chemického základu rozlišujeme stacionární fáze na bázi silikagelu, hybridní (kombinace silikagelu s polymerním materiálem), polymerní, na bázi oxidu zirkoničitého, hlinitého, titaničitého a další.

Monolitické stacionární fáze

Na rozdíl od konvečních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitická kolona obsahuje pouze jeden blok zhotovený z porézní hmoty. Monolity si lze představit jako jednu jedinou velkou částici sorbentu. Monolitické kolony se prosazují všude tam, kde je třeba provádět rychlé a ultra rychlé separace. Jejich příprava je mimořádně jednoduchá. Klasické částicové kolony vykazují výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak a maximální rychlost průtoku je tedy omezená. Výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti, mohou být často provozovány při přibližně 5 krát větších průtocích než konvenční kolony plněné 5 µm sorbentem.

Monolitické kolony obsahují dva typy pórů, velké póry, makropóry zajišťující rychlý tok mobilní fáze monolitem a významně urychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, středně velké póry, mesopóry poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje provozování monolitů při značně vysokých rychlostech průtoku mobilní fáze bez zvýšení tlaku a bez ztráty separační účinnosti.

Makroporézní polymerní monolity jsou připravovány přímo v chromatografické koloně, která se naplní polymerační směsí. Příprava spočívá v naplnění trubice směsí monomerů, radikálového iniciátoru a porogenu. Následně je trubice uzavřena, utěsněna a provedena polymerace za pečlivě kontrolované teploty. Monolit je následně promyt vhodným solventem pro odstranění nepolymerizovaných látek a může být použit pro HPLC separace.

Silikagelové monolity na rozdíl od makroporézních polymerních monolitů nemohou být připraveny přímo v chromatografické koloně z důvodu objemové kontrakce, ke které v důsledku zrání monolitu dochází. Technologie výroby umožňuje přípravu monolitů s přesně definovanou strukturou, kdy vznikají výhradně mesopóry a makropóry vhodných, nastavitelných rozměrů. Připravené kolony mohou být snadno modifikovány, např. zavedením oktadecylových funkčních skupin pro použití v chromatografii s reverzními fázemi.

Díky svým unikátním vlastnostem, tj. snadné přípravě a toleranci k vysokým průtokům, jsou monolity již dnes v řadě konkrétních případů preferovány před klasickými partikulárními sorbenty.^{9,10)}

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které v mnoha případech vykazují srovnatelnou účinnost jako silikagelové částice stejných rozměrů. Materiály na bázi ZrO_2 mají vynikající stabilitu až do pH 14, vysokou tlakovou i tepelnou odolnost, takže je lze využít i pro rychlé separace při vysokých teplotách (i nad $100^\circ C$). Na rozdíl od silikagelu nejsou na povrchu silanolové skupiny vykazující silné interakce s basickými látkami, přítomnost adsorpčních center charakteru silných Lewisových kyselin však vyžaduje přísadu pufrů, které kompenzují silné interakce center s hydroxylovými, fosfátovými, fluoridovými či karboxylovými funkčními skupinami v molekulách látek. Nemodifikovaný ZrO_2 lze použít pro separace v systémech s normálními fázemi, častěji se však používá ZrO_2 s povrchem pokrytým polybutadienem nebo tenkou vrstvou pyrolyticky vyloučeného uhlíku, které lze případně modifikovat i zavedením C_{18} alkyků pro separace v systémech s obrácenými fázemi. Selektivita zirkonových stacionárních fází je odlišná od alkylsilikagelových fází, často umožňuje lepší separace stereoisomerů a silně polárních látek.^{10, 11)}

Stacionární fáze na bázi silikagelu

Nejčastěji používaným nosičem pro přípravu HPLC kolon je stále silikagel. Silikagel pro kapalinovou chromatografii má nejčastěji porézní amorfní formu $SiO_2 \cdot xH_2O$. Voda je chemicky vázána v nestechiometrickém množství za vzniku silanolových skupin. Pro HPLC se nejčastěji užívá silikagel o velikosti částic 3 až 5 μm a velikosti pórů kolem 10 nm. Silanolové skupiny udělují povrchu silikagelu polární charakter a jsou pro svoji reaktivitu využívány k přípravě kovalentně vázaných fází. Chemicky vázané fáze se připravují reakcí silanolových skupin s organickými sloučeninami jako jsou alkoholy, alkylchlorsilany, trialkylmonochlorsilany, alkyhalogensilany. Polysiloxany vytváří polymerní stacionární fáze.

Stacionární fáze vázané na nosič chemicky mají řadu výhod, nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče ani vlivem částečného rozpouštění v eluentu ani mechanickým strháváním při velkém průtoku eluentu. Změnou teploty nebo malou změnou ve složení mobilní fáze nedochází snadno k porušení rovnováhy na koloně, proto se při použití chemicky vázaných fází mohou volit různé programované změny podmínek v průběhu eluce.

Polární sorbenty (v systému s normálními fázemi): s OH - skupinami
Nepolární sorbenty (v systému s obrácenými fázemi): s alkylovými řetězci různé délky, C₈, C₁₈, C₂
Středně polární sorbenty: s nitrilovými, fluoretherovými skupinami
Měníče kationtů: s aminoskupinami
Měníče aniontů: se sulfoskupinami

Reverzní fáze na bázi silikagelu a zejména oktadecylová modifikace, představují stále nejrozšířenější typ sorbentů v HPLC. Nejběžněji jsou dnes připravovány reakcí vhodného monofunkčního organosilanu (např. trialkylchlorosilany) se silikagelem. Kovalentně vázaný alifatický řetězec, kterým je nejčastěji oktadecylová nebo oktylová skupina, uděluje vzniklé stacionární fázi hydrofobní charakter. Při této reakci však nedochází ke zreagování všech přítomných silanolových skupin na povrchu silikagelu a zbytkové silanoly se mohou podílet na retenci analytů. Tato obvykle nežádoucí reakce je často doprovázena snížením separační účinnosti a chvostováním píků. Uvedený efekt se projevuje především při dělení bazických látek, které mohou být protonizovány, což vede k jejich zadržování na deprotonizovaných silanolech elektrostatickou interakcí. Jednou z velkých slabín reverzních fází na bázi silikagelu je omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí. Při chromatografii na nepolárních sorbentech se jako mobilní fáze používá voda a polární organické rozpouštědlo. Nepolární sorbent poutá molekuly látky pouze slabými disperzními silami. Eluční síla mobilní fáze roste s její klesající polaritou.

V současné době jsou komerčně dostupné stacionární fáze s nejdelšími chemicky vázanými alkyly C₃₀.

Vývoj nových materiálů pro chromatografii v obráceném módu není zdaleka ukončen, kvalita sorbentů se stále zvyšuje díky vyšší čistotě vstupních surovin, detailnější kontrole výrobních procesů a využití nových poznatků. ^{2, 3, 10, 11)}

Detektory

Funkcí detektorů je monitorovat eluované látky z kolony a převést je na elektrický signál, který je registrován zapisovačem nebo vyhodnocen počítačovým systémem, ten poskytuje záznam intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich určitých vlastností, kterými se liší od složek mobilní fáze. Vlastností detektorů je kvalitativní a kvantitativní schopnost analyzovat aplikovaný vzorek.

Detektory se nejčastěji dělí na detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu do detektoru. Jiný způsob dělení je na detektory nedestrukční a detektory destruktivní. V nedestrukčních detektorech nedochází k chemické změně detekované komponenty, v destruktivních detektorech se detekovaná komponenta ireverzibilně mění. V podstatě všechny

typy používaných detektorů jsou koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin, na selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluentu a univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty.

Na detektor jsou kladeny požadavky jako možnost detekce všech přítomných komponent, linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací, vysoká citlivost a nízká úroveň šumu, malý mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón, robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty a umožnění gradientové eluce.

Nejpoužívanějšími detektory jsou spektrofotometrický, fluorescenční, elektrochemický a hmotnostně spektrometrický detektor.^{2, 3, 6)}

Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Nejběžněji používanými jsou detektory pracující v oblasti ultrafialového, případně viditelného záření. Velkou výhodou je, že řada rozpouštědel, užívaných v kapalinové chromatografii jako mobilní fáze ani ve viditelné ani v ultrafialové oblasti spektra neabsorbují. Jednodušší detektory pracují s jednou fixní vlnovou délkou, nejčastěji 253,7 nm, jako zdroj záření používají nízkotlakou rtuťovou výbojku. Dále existují detektory s programovatelnou vlnovou délkou, vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí pomocí monochromátoru, vlnová délka je měnitelná během analýzy. Detektory diodového pole proměřují absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek bez přerušení chromatografické separace a uloží ho do paměti. Detekční limit je až 10^{-10} g/ml.

UV – VIS detektor patří mezi nejrozšířenější detektory, je selektivní, vyniká vysokou citlivostí a dobře se hodí pro gradientovou eluci.^{2, 3, 6)}

Fluorimetrický detektor

Fluorimetrický detektor je vysoce selektivní, citlivý detektor. Detekční limit je 10^{-9} - 10^{-15} g/ml. Je založen na principu fluorescence, tedy měření sekundárního, emisního záření o vyšší vlnové délce, které látka vydá po absorpci primárního, excitačního ultrafialového záření. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič a je přeměněno na elektrický signál, jehož velikost je úměrná toku fluorescenčního záření. Fotonásobič je umístěn kolmo na směr vstupujícího excitačního záření. Fluorescence, emise sekundárního záření, trvá krátce 10^{-8} – 10^{-5} sekundy. Selektivita fluorimetrie vyplývá ze skutečnosti, že pouze omezený počet látek vykazuje fluorescenci, a že vedle vlnové délky emise je volitelná i délka excitačního záření. Použití detektoru musí předcházet derivatizace reagentů, která obsahuje fluorofor. Z organických sloučenin fluoreskují zejména takové sloučeniny, které mohou tvořit isomerii, tautomerii, mají konjugovaný systém nebo kondenzované heterocykly. Patří sem karboxylové kyseliny, alkoholy, aldehydy, fenoly, aminy, peptidy, ketony, fenoly a thioly. Fluorescenční detekce umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek, pg/ml.

Fluorimetrický detektor je konstruován ze zdroje záření, který může mít buď úzké spektrální ohraničení (zinkové, rtuťové nebo kadmiové zdroje), nebo je schopen vyzařovat široké spektrum vlnových délek (xenonové a deuteriové výbojky). Excitační filtr, po průchodu záření z výbojky, poskytuje monochromatické záření požadované vlnové délky, pro excitaci molekul analytů. V průtokové cele záření prochází sloupcem eluentu. Pokud celou prochází látka, která fluoreskuje, dochází k absorpci excitačního záření a látka přitom vydává záření emisní. Emisní záření má nižší energii a tedy vyšší vlnovou délku, než záření excitační. Další součástí je emisní filtr, který sbírá záření ve směru kolmém k původnímu excitačnímu záření. Fotoelektrický násobič přeměňuje emitované záření na elektrický signál. Detektory mohou být sestaveny jako filtr-filtr, mřížka-filtr nebo mřížka-mřížka. Mřížka umožňuje výběr vlnové délky, filtr limituje jednu vlnovou délku. Uspořádání typu mřížka-mřížka umožňuje výběr excitační a emisní vlnové délky a je tedy vhodné pro vývoj metody. Konstrukce filtr-filtr je jednodušší, levnější a více senzitivní. ^{2, 3, 8)}

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory využívají dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí, která probíhá na rozhraní elektroda – roztok. Měří proud vyvolaný při průchodu redukovatelné nebo oxidovatelné látky měrnou celou, kde jsou umístěny elektrody, na než je vloženo napětí potřebné k průběhu elektrochemické reakce. Elektrochemické principy lze využít k detekci řady látek, které přicházejí k analýze ve velmi malých koncentracích. ²⁾

Hmotnostně spektrometrické detektory

Hmotnostní spektrometr může být použit samostatně, k identifikaci látek pomocí naměřených spekter jednotlivých látek nebo jako detektor některých separačních metod. Hmotnostní spektrometr jako HPLC detektor poskytuje kromě chromatografických údajů spektrální údaje o identitě látky. Hmotnostní spektrometr je univerzální detektor, jeho citlivost dosahuje obvykle kolem 10^{-15} g/ml, podle typu analytu a použitého analyzátoru.

Hmotnostní spektrometr má tři základní části. Iontový zdroj, sloužící k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice, tzv. ionizace, jeho konstrukce se liší podle použité ionizační techniky. Hmotnostní analyzátor, který slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje, m/z . Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Dalšími částmi přístroje jsou vakuový systém, zařízení pro zavádění vzorků, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat a na porovnání spekter s knihovnou.

Existuje několik způsobů ionizace analytu, volba ionizační techniky je ovlivněna těkavostí látky, její tepelnou stabilitou, molekulovou hmotností a polaritou. Nejpoužívanějšími způsoby ionizace ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

Cílem hmotnostního analyzátoru je separace iontů v plynné fázi podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Separace probíhá za vysokého vakua, přibližně 10^{-3} - 10^{-6} Pa, což výrazně závisí na typu analyzátoru. Existují různé typy analyzátorů, které mohou využívat různé principy, magnetický analyzátor, kvadrupólový analyzátor, trojitý kvadrupól, iontová past, průletový analyzátor, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací.

Pro detekci iontů se v hmotnostní spektrometrii používá elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova klec.

Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda v HPLC je vysoce citlivá, kromě separace a kvantifikace, poskytuje informaci o molekulové hmotnosti látky a o její struktuře. Ve spojení HPLC s MS detekcí se mobilní fáze obvykle přímo účastní ionizačního procesu, např. APCI či ESI. V HPLC systému s obrácenými fázemi se jako mobilní fáze obvykle používá vodný methanol nebo acetonitril. U systémů s normálními fázemi musí v mobilní fázi být určitý obsah (> 5%) proton – donorního rozpouštědla, např. 2 - propanol.

Trendy v hmotnostní spektrometrii zahrnují vývoj co nejlepších softwarů, velmi se také rozvíjí tandemové spojení hmotnostních spektrometrů MS/MS. Taková spojení poskytují další selektivitu a citlivost, což je užitečné při stopových analýzách a metabolických studiích. Hlavními aplikačními oblastmi je sledování metabolismu léčiv v biologických materiálech, rychlá identifikace syntetických produktů, neonatální screening, stanovení reziduí pesticidů, dále se uplatňuje ve farmaceutickém průmyslu, v klinických studiích léčiv, v biochemii, biotechnologii nebo proteomice. ^{14, 15)}

Záznam a zpracování dat

K vyhodnocování chromatogramů se používají automaticky pracující zařízení, které jsou schopny automaticky vyhodnotit a zaznamenat veškerá eluční data a poskytnout i kvantitativní údaje ze zabudovaného integrátoru. Kapalinové chromatografy jsou vybaveny mikroprocesory, které automaticky ovládají chod přístroje. ²⁾

2.2.2 Modernizace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Kolony jsou plněny velmi jemnými částicemi sorbentu a je užíváno vysokých průtoků mobilní fáze. Proto se používají vysokotlaká čerpadla, kontinuální detektory, dávkovací systémy a nové druhy chromatografických sorbentů. K současným vylepšením patří zmenšování velikosti částic a průměru kolony, μ HPLC. Výhodou je snížení spotřeby a odpadu rozpouštědel, stacionární fáze a vzorku, vyšší účinnost separace, vyšší citlivost detekce a kompatibilita s hmotnostní spektrometrií.⁷⁾

UPLC (ultra performance liquid chromatography)

Jedná se o novou techniku v oblasti kapalinové chromatografie, která využívá analytických kolon o malém průměru naplněných malými částicemi. Oproti klasické HPLC vyniká řadou předností, kratší doba analýzy, menší spotřeba rozpouštědel, zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce a zvýšení citlivosti. Do konstrukce systému musely být vneseny určité změny, které optimalizují jeho účinnost.

Binární pumpa umožňuje nastavení průtoků v rozmezí 0,01 – 2,00 ml/min. Výhodou pumpy při tvorbě gradientu je možnost výběru ze čtyř solventů. Maximální pracovní tlak je 100 MPa, pozitivním důsledkem je zvýšení účinnosti separace, zlepšení rozlišení a zkrácení doby analýzy. K odplynění vstupujících rozpouštědel slouží šesti komůrkový degaser.

Automatický dávkovač umožňuje dávkování v rozsahu 0,1 – 50,0 μ l.

UPLC analytické kolony mají malé vnitřní průměry 1,0 nebo 2,1 mm, jsou plněny speciálním sorbentem X – Terra 2. generace, který má dostatečnou mechanickou odolnost a účinnost pro rychlou a citlivou analýzu. Výroba sorbentu využívá „bridged ethyl/siloxane silica hybrid“ technologii, která k zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení jeho mechanické odolnosti využívá tzv. ethylenových můstků. Velikost částic sorbentu se pohybuje okolo 1,7 μ m, což je optimální velikost pro UPLC.

Pro snažší sledování životního cyklu kolon, především v prostředí správné výrobní nebo laboratorní praxe, jsou kolony standardně vybaveny neodnímatelným mikročipem, který pomocí technologie eCord™ zaznamenává kompletní historii kolony, celkový počet nástřiků, provedené nástřiky, tlakovou historii kolony.

UPLC je vhodnou alternativou HPLC ve vysoce produktivních analytických laboratořích. Přenos metod mezi HPLC a UPLC je relativně jednoduchý, neboť jsou zachovány stejné mechanismy separace a chromatografické principy. Obvykle je nutné snížení průtokové rychlosti, zvýšení rychlosti sběru dat a snížení objemu vzorku dávkovaného na chromatografickou kolonu, přičemž dochází ke zvýšení citlivosti, zlepšení rozlišení a urychlení analýzy.^{16, 17)}

2. 3. Úprava vzorku biologického materiálu pro HPLC analýzu

Biologický materiál obsahuje léčiva nebo jejich metabolity v nízkých koncentracích a naopak řadu endogenních látek v koncentracích vysokých, působících rušivě při kvantitativním záznamu signálu a jeho vyhodnocování. Hlavním cílem preanalytické úpravy vzorku je zvýšení selektivity metody, odstraněním interferentů zasahujících v průběhu separace nebo detekce a zvýšení citlivosti metody, zvýšením koncentrace analytů. Výběr metody úpravy vzorku záleží na chemické struktuře, polaritě, rozpustnosti, ionizaci vzorku i na druhu biologického materiálu. Většina analýz je prováděna v séru, plazmě, plné krvi a moči, dále také ve slinách, erytrocytech, žluči, cerebrospinální tekutině a tkáňových homogenátech.^{6, 18)}

2. 3. 1 Deproteinace biologického materiálu

Prvním stupněm zpracování biologického materiálu pro další analytický postup je odstranění přítomných bílkovin, které mohou interferovat při vlastní analýze. Tímto způsobem se zabrání vysrážení proteinů na chromatografické koloně při styku vzorku s mobilní fází obsahující organická rozpouštědla nebo koncentrovanější pufrů. Při deproteinaci biologického materiálu pro potřeby monitorování lékových hladin musí být kompletně odstraněny proteiny i o malé molekulové hmotnosti. Samotný precipitát nesmí adsorbovat na svůj povrch sledované léčivo. Deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo, ovlivňovat další pracovní postupy, interferovat při vlastní detekční reakci a ani jinak ovlivňovat analytickou výtěžnost. Odstranění proteinů může být provedeno řadou postupů.^{6, 19)}

Precipitační deproteinace

Precipitace proteinů bývá prováděna vhodnými deproteinačními činidly.

a) přidáním organických rozpouštědel mísitelných s vodou: acetonitril, aceton, ethanol, methanol

b) silnými kyselinami: trichloroctová, trifluoroctová, chloristá, mravenčí

c) solemi těžkých kovů: síran zinečnatý, hydroxid litný, wolframan sodný, chlorid rtuťnatý, chlorid hlinitý

d) kombinací několika deproteinačních činidel

Před precipitační deproteinací lze doporučit předběžné zředění analyzovaného vzorku, tím se získá jemnější precipitát a sníží se možnost adsorpce na koagulát.^{6, 19)}

Enzymová deproteinace

Probíhá působení proteolytických enzymů jako trypsin, papain, ketodasa. Enzymová deproteinace je výhodná pro své neagresivní účinky a tam kde je těžké upřesňovat deproteinační a extrakční podmínky.¹⁹⁾

Ultrafiltrace

Touto technikou jsou proteiny z biologického materiálu separovány přes semipermeabilní membrány. Ultrafiltrací nedochází ke změně koncentrace vzorku zředěním nebo přítomností jiných iontů z deproteináčních roztoků. Tento způsob deproteinace vzorků před analýzou je vhodný pro stanovení látek, které nejsou vázány na proteiny a nevykazují specifickou vazbu na užití membrány.⁶⁾

Úprava vzorku biologického materiálu deproteinací je jednoduchá a rychlá, její použití je ale omezené. Deproteinací se vzorky obvykle zředí a při nízkých koncentracích analytů by mohla přítomnost interfečních látek ovlivnit přesnost stanovení. Tato neselektivní úprava biologických vzorků bývá nahrazena selektivními extrakčními metodami.⁶⁾

2. 3. 2 Liquid – liquid extrakce

Princip extrakce spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny v rozdělovacím poměru K podle Nernstova zákona.

$$K = c \text{ (v organické fázi) [mg/ml]} / c \text{ (ve vodné fázi) [mg/ml]}$$

Nernstův rozdělovací zákon platí pro ideální roztoky, v nichž extrahovaná látka nereaguje s žádnou složkou v obou fázích a je obsažena v roztoku v nízké koncentraci. Rozpouštědlo jako extrakční fáze je voleno podle charakteru extrahované látky. Látky hydrofobní se snáze rozpouštějí v rozpouštědlech nepolárních (s nízkou dielektrickou konstantou), rozpouštědla polární (s vysokou dielektrickou konstantou) jsou vhodná pro hydrofilní látky. Sestaví – li se rozpouštědla podle vzájemné rozpustnosti v pořadí se vzrůstající dielektrickou konstantou, vznikne tzv. mixotropní řada. Čím vzdálenější jsou v ní dvě rozpouštědla, tím hůře se navzájem mísí. Rozpouštědlo nesmí reagovat ani s extrahovanou látkou.

Úpravou pH vodné fáze je dosaženo vyšší selektivity extrakce. Při pH nižším (<5) se méně disociují a tedy lépe extrahují látky kyselého charakteru, při pH vyšším (>7) snáze přecházejí do extrakčního činidla látky bazické.

Vhodně zvoleným poměrem vodné a organické fáze se zlepšuje extrahovatelnost látky. Větším množstvím organického rozpouštědla je dosaženo vyššího výtěžku extrakce. Vyšší objem rozpouštědla způsobuje nižší koncentraci extrahované látky v extraktu.

Intenzita extrakce a doba třepání musí být natolik účinná, aby přechod látky do rozpouštědla byl co nejúplnější. Podmínky extrakce a její výtěžnost jsou zjišťovány především empiricky.^{6, 18, 19)}

2. 3. 3 Solid - phase extrakce

Extrakce pevnou fází je výkonnou technikou dostupnou pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Její podstatou je selektivní zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, který je umístěn ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu.

SPE nabízí mnoho výhod oproti tradičním separačním technikám, mezi něž patřila zejména LLE, a to především pro dobrou selektivitu, úsporu organických rozpouštědel, úplnější extrakci analytu, efektivnější separaci analytu a interferujících látek, jednodušší sběr frakce analytů a pohodlný, lépe automatizovatelný postup.

U SPE je kapalný vzorek nanesen na kolonku a je vybráno rozpouštědlo tak, aby byl analyt zadržen silně nebo se nezadržoval. Pokud je analyt zadržen silně, interferující složky jsou vymyty z kolonky, tak je minimalizován jejich podíl na konečné frakci analytu. Analyt je pak eluován v malém objemu silným elučním činidlem, sesbírán a buď přímo dávkován na kolonu, nebo odpařen do sucha a následně rozpuštěn v HPLC mobilní fázi. V opačném případě je analyt zadržován na kolonce slabě a interferující složky silně. Analyt je sesbírán pro další nakládání.

Použití SPE

Univerzálnost SPE jí dovoluje, aby byla užitečně používána pro různé účely.

Odstranění interferujících složek a látek poškozujících kolonu. Interferující složky překrývají analyt při separaci a nepříznivě ovlivňují výsledky analýzy. Látky poškozující kolonu jsou hydrofobní substance (tuky, oleje), polymerní materiály a částice, které ucpávají nebo deaktivují kolonu a mohou být odstraněny pomocí RP - SPE.

Zakoncentrování stopových množství látek.

Odsolení vzorku pomocí RP-SPE je výhodné pro iontově – výměnnou chromatografii. Anorganické soli jsou z kolonky vymyty vodou, analyt může být eluován organickým rozpouštědlem.

Výměna rozpouštědel, kdy je analyt převeden z jedné specifické matrice do jiné, například z vodné do organické.

Derivatizace, analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a následně eluován.

Instrumentace SPE

SPE je velmi jednoduchou technikou. Základem je upotřebením nepříliš drahých extrakčních kolonek na jedno použití (mohou zde zůstat potenciální interferenty) o nejrůznějších velikostech a náplních sorbentů. Často se jedná o lékařskou injekční stříkačku naplněnou 0,1 až 0,5 gramy sorbentu. Sorbent bývá obvykle reverzní fáze, v plastickém barelu je držen fritou. Velikost částic sorbentu je větší než 40 μm .

Nejpopulárnější sestava pro SPE zařízení je kartridž (stříkačkový válec). Obvykle bývá vyroben z polypropylenu pro lékařské účely, vybraný pro jeho čistotu. Vzhledem k široké paletě použití SPE jsou dostupné kazety s nádržkou o objemu od 0,5 až 10 mililitrů a náplní o hmotnosti 35 miligramů až 2 gramy. Pro velmi objemné vzorky existují kazety se 60. mililitrovou nádržkou a hmotností náplně 10 gramů. Tyto kartridže mohou být použity pro znečištěné vzorky. Pro čisté, kapalné vzorky se používají kazety s náplní 100 miligramů a menší. V mnoha případech je žádoucí, aby byl vzorek sbírán v nejmenších možných objemech, což znamená, že i SPE kartridže mohou být malé.

Další oblíbenou sestavou je SPE disk, který zahrnuje výhody membránové a SPE extrakce. Disk je podobně jako membránové filtry plochý, obvykle 1 milimetr nebo méně. Disk je tvořen flexibilním nebo rozšířeným polytetrafluorethylenovým síťovým systémem naplněným silikagelem nebo pryskyřicí, rigidním skleněným vláknem se začleněním náplňového materiálu, náplní impregnovanou polyvinylchloridem a derivatizačními membránami. SPE disky byly vynalezeny pro environmentální aplikace, jako jsou analýzy stopových množství organických látek v povrchových vodách, které obvykle vyžadují velký objem vzorku k docílení potřebné citlivosti. Náplně impregnované polyvinylchloridem byly původně navrženy pro purifikaci proteinů, mohou být využívány i pro jiné SPE aplikace. Použitá rozpouštědla musí být kompatibilní s polyvinylchloridem. Mnoho stacionárních fází však není přístupných k polyvinylchloridovým diskům.

Potahovaná vlákna jsou používána pro solid-phase mikroextrakci.

Zařízení pro SPE je velmi jednoduché. Průtok kapalin vedených přes kolonku může být urychlen třemi metodami, vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky a centrifugací. Jako hnací síla může být použita gravitace, ale průtok kolonkou by byl velmi pomalý. Tudíž nejvíce používaný základní systém využívá injekční stříkačky k ručnímu nadávkování na kolonku. Tento přístup může být obtížný v případě viskózních vzorků nebo vzorků obsahujících částice. V těchto případech může být použita vakuová nádoba s držákem na kolonku. V případě, že musí být zpracováno více vzorků současně, doporučuje se použít systém vakuové komory. Do některých jednotek je začleněn vakuový ventil, ventil pro kontrolu průtoku a měřidlo pro lepší kontrolu průtoku rozpouštědla. V nejdokonalejších jednotkách jsou individuální kontroly pro každou kolonku, které zajišťují rovnoměrnou distribuci mezi všechny kolonky. Průtok kolonkou nesmí být příliš rychlý, jinak by nedošlo k dostatečnému kontaktu vzorku se stacionární fází. Pro typické SPE aplikace je u většiny kolonek doporučován průtok 10 ml/min a menší, u disků 50 ml/min.

SPE sorbenty

Kolonky na SPE obsahují sorbenty založené nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Při této modifikaci se na povrchové silanolové skupiny chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Nechá-li se část silanolových skupin volných, spoluúčastní se na výsledných vlastnostech sorbentu (non end – capped, neuzavřený sorbent), jestliže se silanolové skupiny zcela pokryjí vázanou fází, uplatní se jen její vlastnosti (end – capped, uzavřený sorbent). Chemicky vázané fáze vznikají již známou reakcí silanolové skupiny silikagelu s trialkylchlorsilany.

Při separaci jsou využívány různé mechanismy zachycování látek. Mezi běžně uplatňované patří van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a dipól – dipólové interakce, kation – aniontové interakce.

Při volbě vhodného sorbentu je zvažována podstata analytu, vyžadovaný stupeň čistoty, vlastnosti matrice vzorku a hlavních kontaminantů a finální analytický postup.

Nepolární vázané fáze

Vyznačují se hydrofobními vlastnostmi. Lze je využít pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Uplatněním silanolových skupin u neuzavřených sorbentů vzrůstá selektivita pro bazické sloučeniny.

Oktadecylsilyl silikagel, oktylsilyl silikagel.

Polární vázané fáze

Polární vázané fáze jsou selektivní pro polární sloučeniny.

Silikagel, CN, NH₂, oxid hlinitý.

Každý použitelný sorbent nabízí jedinečné charakteristické retenční vlastnosti, dané primárními a sekundárními interakcemi, které se kombinují s vlastnostmi analytu.

Postup SPE

Příprava vzorku před extrakcí, jejímž cílem je vytvořit vzorek, jehož fyzikální a chemické vlastnosti podporují zadržení analytů v extrakční kolonce.

Solvatace kolonky organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril), aby byl lipofilní kartáč sorbentu připraven k zachytu analytu.

Předrovnovážná úprava kolonky nasycením čistým rozpouštědlem analytu. Ustaví se rovnováha mezi sorbentem v kolonce a tímto rozpouštědlem. Tento stupeň vytváří podmínky podporující retenci analytu.

Aplikace vzorku, který se nalije do kolonky a nechá se dostatečný čas protékat. Pro kolonku se 100 mg náplně je vhodný průtok 1 – 2 ml/min, pro vyšší hmotnosti sorbentů je přiměřený vyšší průtok.

Promývání kolonky, jehož účelem je selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny z vázaných fází, aniž by byly eluovány analyty.

Eluce analytu z kolonky je provedena promytím kolonky rozpouštědlem, které eluuje analyty z vázaných fází do vhodné jímací nádoby.

SPE a jejích modifikací je využíváno v přípravě vzorků na formu vhodnou pro analýzu. Často je nezbytné analyt zakoncentrovat, např. v monitorování životního prostředí nebo při monitorování lékových hladin v humánních vzorcích, kde je požadováno stanovit sloučeniny nízkých koncentrací.^{3, 13, 20)}

2. 3. 4 Solid - phase mikroextrakce

Modifikací extrakce pevnou fází je mikroextrakce tuhou fází. Jde o postup přípravy organických vzorků k analýze bez použití rozpouštědel, nevyžadující složitou instrumentaci. Vlákno z taveného křemene potažené polymerní stacionární fází jako polydimethylsiloxan nebo polyakrylát je ponořeno do kapalného vzorku nebo umístěno nad kapalnou vzorkem do prostředí nasyceného těkavými analyty. Analyty pronikají a participují na potahování podle jejich distribučních koeficientů. Po dosažení sorpční rovnováhy (obvykle 2 – 30 minut) se vlákno opět zasune dovnitř jehly a spolu s ní je vytaženo ze zkumavky se vzorkem a umístěno do injekčního portu HPLC, kde jsou analyty vymyty silným rozpouštědlem, analogickým k elučnímu kroku SPE. Následujícím analytickým stupněm může také být plynová chromatografie.

Z důvodů mechanické ochrany bývá křemenné vlákno pokryté sopčnou vrstvou zasunuto v duté ocelové jehle a napojeno na ocelový píst. Vzorky pro chromatografii bývají běžně připraveny ve vialkách jejichž septum se propíchno ocelovou jehlou, z níž se vysune vlákno do vzorku nebo nad jeho hladinu a nastává sorpce analytu do vrstvy pokrývající vlákno.

Analyt není extrahován ze vzorku v co nejvyšší koncentraci, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu. Rovnovážný stav SPME techniky je závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a tloušťce polymeru, který pokrývá křemenné vlákno. Množství sorbovaného analytu závisí také na distribuční konstantě. Doba extrakce je určována analytem s nejvyšší distribuční konstantou. Distribuční konstanta obecně vzrůstá s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu analytu. Selektivitu extrakčního procesu lze ovlivnit typem polymeru pokrývající vlákno.

Nepolární vlákna by se měla používat pro extrakci nepolárních analytů a naopak.

V analytickém přístroji dochází k desorpci. Existují dva typy desorpce, termální (pro GC aplikace) a desorpce mobilní fází (pro HPLC aplikace).

Zautomatizováním celého systému lze spojit přípravu vzorku i analýzu do jednoho kroku.^{3, 20, 21)}

2. 3. 5 Superkritická fluidní extrakce

Principem SFE je uvedení rozpouštědla do superkritického stavu, to je překonání kritického bodu a diagramu teplota – tlak, za němž není možno ani sebevětším tlakem dosáhnout zkapalnění látky. K extrakci je běžně používán CO₂, který má kritickou teplotu 31 °C a tlak 7149 kPa. Extrakce probíhá za teplot 25 – 200 °C a tlaku 7 – 60 MPa. SFE je tedy použitelná jen pro látky snášející tyto podmínky. Nadkritický oxid uhličitý je ideálním extrakčním činidlem pro analyty dále analyzované instrumentálními metodami. Je nepolární, a proto rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny. Použití oxidu uhličitého má velké výhody, jeho kritický bod je snadno dosažitelný, je netoxický a levný. Změnami teploty a tlaku v extraktorů lze měnit jeho rozpouštěcí sílu a řídit tak selektivitu reakce. Rozpouštěný analyt se snadno jímá a koncentruje, neboť oxid uhličitý lze lehce odpařit.

Výhodou této extrakce je vysoká účinnost a velmi malá spotřeba rozpouštědel, nevýhodou je její instrumentální náročnost.

Zařízení je možné přímo spojit s analyzátořem a kombinovat například s GC nebo HPLC.^{3, 18)}

2. 3. 6 Molekulárně vtištěné polymery

MIP (Molecularly imprinted polymers) jsou vysoce zesíťované polymery, které mají předurčený vysoký stupeň selektivity pro jeden analyt nebo skupinu strukturálně podobných analytů. Syntéza je založena na nekovalentních interakcích mezi analytem a funkčním monomerem. V procesu tvorby MIP asociuje templátová molekula s monomerem do formy komplexu, který je následně zesíťován. Templátová molekula je z výsledného polymeru extrahována a vzniklá dutina je komplementární tvarem a funkcí a je prezentována v matrix, která bude vázat molekuly identické nebo podobné templátu. MIP je polymerem s paměťí tvaru a funkčních skupin templátové molekuly.

Jako monomer může být použita metakrylová kyselina.

Vyextrahovaný MIP se naplní do SPE kolonek a další postup je identický jako u SPE.

Tato metoda extrakce je efektivní a nespotebovává velké množství organických a toxických rozpouštědel.^{22, 29)}

2.4. Validace bioanalytické metody

Validace metody je definována jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny.²⁵⁾

Hlavním cílem validace bioanalytické metody je demonstrovat spolehlivost konkrétní metody pro určení koncentrace analytu ve specifickém biologické matrix jako je krev, plazma, sérum, moč, sliny.²⁴⁾

Validace se provádí před zavedením nové metody, před aplikací nového analytického měřicího systému, při rozšíření stávající metody o další účel.²⁵⁾

2.4.1 Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody rozlišit a kvantifikovat analyt v přítomnosti ostatních složek ve vzorku. Pro určení selektivity se analyzují prázdné vzorky příslušného biologického materiálu. Možné interferující látky v biologickém materiálu zahrnují endogenní komponenty matrice, metabolity, degradační produkty, původní medikamenty a jiná exogenní xenobiotika. Jestliže je metoda zamýšlena pro stanovení více než jednoho analytu, musí být zajištěno, že mezi analyty není vzájemná interference.²³⁾

2.4.2 Správnost

Správnost analytické metody charakterizuje těsnost shody výsledku testu získaného analytickou metodou se správnou hodnotou analytu. Správnost je určena opakovanou analýzou vzorku obsahujícího známé množství analytu. Při určení správnosti by měla být jedna koncentrace analytu změřena minimálně pět krát. Je doporučeno proměřit minimálně tři koncentrace v očekávaném rozsahu. Střední hodnota by měla ležet v rozmezí 15% od skutečné hodnoty, vyjma dolního kvantitativního limitu, kde by střední hodnota neměla být odchýlena o více než 20%. Odchylka střední hodnoty od hodnoty správné slouží jako vyjádření správnosti.²³⁾

2.4.3 Přesnost

Přesnost udává shodu mezi individuálními měřeními analytu, postupem aplikovaným opakovaně s alikvoty jednoho homogenního vzorku. Při určení přesnosti by jedna koncentrace analytu měla být změřena minimálně pět krát. Je doporučeno proměřit minimálně tři koncentrace v očekávaném rozsahu. Přesnost určená u každé koncentrace by neměla přesáhnout 15% variačního koeficientu, vyjma dolního kvantitativního limitu, kde nesmí přesáhnout 20% variačního koeficientu.

Přesnost se dále rozčleňuje:

Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje přesnost měření za stejných podmínek, v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je také nazývána jako přesnost v sérii.

Mezilehlá přesnost

Vyjadřuje odchylky měření v laboratoři, kdy je jeden vzorek analyzován v různé dny, různými analyticky i přístroji.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost vyjadřuje mezilaboratorní přesnost.²³⁾

Přesnost analytické metody je obvykle vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka (RSD) v procentech.

$$RSD = S_n \cdot 100 / X$$

Kde X je průměrná hodnota analytu a S_n je směrodatná odchylka.^{5, 27)}

2.4.4 Recovery

Výtěžnost analytu z analýzy je odezva detektoru dosažená množstvím analytu přidaného a extrahovaného z biologického materiálu proti odezvě detektoru dosažené skutečnou koncentrací čistého standardu.

Výtěžnost analytu nemůže být 100%, ale míra výtěžnosti analytu a vnitřního standardu by měla být stálá, přesná a reprodukovatelná. Určení výtěžnosti by mělo být provedeno srovnáním výsledků extrahovaného vzorku o třech koncentracích, nízké, střední a vysoké, s neextrahovaným standardem, který představuje 100% výtěžnost.²³⁾

Matematicky je výtěžnost R_f definována jako poměr:

$$R_f = C_{obs} / C_{ref} \cdot 100 (\%)$$

kde: C_{obs} ... pozorovaný obsah, množství, koncentrace

C_{ref} ... skutečná hodnota obsahu, množství či koncentrace

2.4.5 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka je vztahem mezi odezvou přístroje a koncentrací analytu. Je generována pro každý analyt ve vzorku. K adekvátní definici závislosti mezi koncentrací analytu a odezvou přístroje musí být použit dostatečný počet standardů. K sestrojení kalibrační křivky jsou připravovány standardy o známé, rostoucí koncentraci analytu ze stejného biologického materiálu jako vzorky v zamýšlené studii. Počet standardů použitých při konstrukci kalibrační křivky je funkcí předpokládaného rozsahu analytických hodnot a charakteru analytu, vztahu odezvy. Koncentrace standardů jsou vybírány na základě předpokladu rozsahu koncentrací v zamýšlené studii. Při sestrojení kalibrační křivky by měli být splněny podmínky, že odchylka kvantitativního limitu od nominální hodnoty koncentrace

nebude větší než 20% a odchylka ostatních standardů vyjma kvantitativního limitu nesmí být větší než 15% od nominální hodnoty koncentrace.²³⁾

2.4.6 Rozsah

Rozsah analytické metody je interval mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku, včetně těchto koncentrací, pro které je prokázáno, že analytická metoda má vyhovující úroveň přesnosti, správnosti a linearity.²³⁾

Rozsah je odvozen z linearity metody a závisí na zamýšlené aplikaci metody.²⁶⁾

2.4.7 Robustnost

Robustnost analytické metody je měřením její schopnosti zůstat neovlivněnou při malých, ale rozhodujících odchylkách parametrů metody a poskytovat indikaci spolehlivosti během normálního použití.²³⁾

Vyhodnocení robustnosti probíhá ve fázi vývoje metody. Měla by ukázat spolehlivost analýzy při záměrných odchylkách v parametrech metody. Typickými jsou například odchylky ve stabilitě analytických vzorků, času extrakce. U kapalinové chromatografie jsou to odchylky v pH mobilní fáze, složení mobilní fáze, průtoku mobilní fáze, odlišných analytických kolonách, šarže, dodavatel, teplota.²⁶⁾

2.4.8 Detekční limit

Detekční limit analytické metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nestanovené kvantitativně jako exaktní hodnota.²³⁾

Detekční limit je vypočten jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Vypočtený detekční limit se ověří experimentálně.^{5, 27)}

2.4.9 Kvantitativní limit

Kvantitativní limit jednotlivé analytické metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být kvantifikováno s vyhovující přesností a správností. Kvantitativní limit je parametrem kvantitativní analýzy složek ve vzorku s nízkou hladinou a zejména je používán pro stanovení nečistot a degradačních produktů.²³⁾

Teoretickou hodnotu kvantitativního limitu lze vypočítat jako koncentraci s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.^{5, 27)}

2.5. Isoxikam

Isoxikam je nesteroidním antiflogistikem skupiny oxikamů. Nesteroidní protizánětlivé látky jsou známé svými antipyretickými, analgetickými a protizánětlivými účinky. Hlavní indikací je tlumení projevů zánětlivých onemocnění zejména pohybového ústrojí a degenerativních změn pojivové tkáně. Některé léky z této skupiny látek byly označeny jako schopné působit protinádorově v počátečních stádiích u pacientů, kterým bylo léčivo podáváno v prodlouženém časovém období. V poslední době bylo identifikováno několik dalších funkcí této skupiny léčiv jako chemoprevence, chemosuprese, UV – protekce. Epidemiologické studie ukázaly, že dlouhodobé užívání nesteroidních antiflogistik redukuje riziko vývoje Alzheimerovy choroby a oddaluje její nástup.

Nesteroidní antiflogistika jsou převážně syntetické sloučeniny kyselé povahy. Ve své molekule obsahují volnou karboxylovou funkční skupinu nebo se jedná o látky enolického charakteru. Mechanismus účinku spočívá především v blokaci syntézy prostaglandinů, což jsou silné mediátory zánětu a bolesti, inhibicí cyklooxygenázy. Působením cyklooxygenázy na arachidonovou kyselinu vznikají cyklické endoperoxidy, které se dále přeměňují na prostaglandiny, prostacyklin a tromboxan. Účinek nesteroidních antiflogistik může mít charakter kompetitivní inhibice aktivního místa enzymu nebo se jedná o ireverzibilní inaktivaci cyklooxygenázy. Tato inhibice se projeví protizánětlivými účinky i odstraněním periferní bolesti. Vedle důsledků přímého působení na prostaglandiny se uplatní i nepřímé účinky, které se projeví inhibicí dalších mediátorů zánětu.

Oxikamy jsou deriváty 2*H*-1,2-benzothiazin-3-karboxamidu. Jsou to kyselé látky typu enolů, mohou se vyskytovat ve dvou tautomerních formách. Účinek závisí na přítomnosti methylové skupiny na dusíku, dále je důležité, aby dusík karboxamidové skupiny byl substituován dusíkatým heterocyklem. Mechanismus účinku spočívá v blokování syntézy prostaglandinů inhibicí cyklooxygenázy. Od ostatních látek se liší dlouhým biologickým poločasem v plazmě, což umožňuje snížení dávkování v delších časových intervalech. Hlavním nežádoucím účinkem je zvýšení rizika gastrointestinálních potíží, především vředové choroby.^{28, 29, 34)}

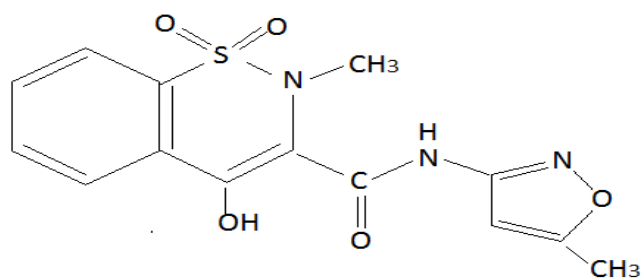
Název látky:

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

Sumární vzorec: C₁₄ H₁₃ N₃ O₅ S₁

Molekulová hmotnost: 335,34

Strukturní vzorec:



Isoxikam je účinným zástupcem nesteroidních antiflogistik s dlouhotrvajícím působením. Velmi efektivně tiší symptomy revmatoidní artritidy a degenerativních kloubních onemocnění. Důležitým benefitem je jeho použití v systému domácí péče starší populace. Udávanými vedlejšími účinky jsou hepatotoxicita, nefrotoxicita a kožní onemocnění.^{29, 34)}

2.6. Analýza isoxikamu a dalších oxikamů – literární údaje

B. Rezaei a kol. ²⁹⁾ vyvinuli jednoduchou, rychlou, ekonomickou a citlivou metodu zakoncentrování a stanovování stopových množství isoxikamu ve farmaceutických a biologických vzorcích. Analýzu provedli v lidském séru, využili metodu standardního přídávku. V této práci byly užity SPE kolony naplněné MIP polymery a spektrofotometrická detekce isoxikamu založená na vodíkových interakcích mezi zkoumaným léčivem a alizarinem. Roztok standardu isoxikamu připravili rozpuštěním isoxikamu v acetonitrilu. Vodný roztok alizarinu připravili rozpuštěním v destilované vodě. K přípravě vzorku lidského séra bylo vzato 0,5 ml plné krve, temperováno po dobu 5 minut na teplotu 37 °C, k plné krvi byly přidány 2 ml methanolu, směs byla centrifugována po dobu 5 minut při 3000 otáčkách. Získané deproteinované lidské sérum pak naředili 20 ml destilované vody, alikvoty pak použili pro každý experiment. Syntéza isoxikam-vtištěných polymerů byla založena na nekovalentních interakcích mezi analytem a funkčním monomerem tepelnou radikálovou kopolymerizací. V procesu tvorby MIP asociovala templátová molekula s monomerem do formy komplexu. Tento komplex byl následně zesíťován. Experimentálně zjistili, že nejvhodnějším monomerem pro přípravu isoxikam – MIP je metakrylová kyselina. SPE kartridž byla naplněna připraveným MIP. Aplikovaný isoxikam vymývali z polymerů směsí octové kyseliny a methanolu v poměru 1:9, která nejlépe redukovala nespecifické adsorpce analytu. Příprava sorbentu byla sice časově náročná, ale množství nasyntetizovaného polymeru bylo velké a jedna naplněná kolonka mohla být použita nejméně pět krát. Tato metoda extrakce byla efektivní a nespotebovala velké množství organických a toxických rozpouštědel. Spektrofotometrická detekce založená na vodíkových interakcích mezi léčivem a alizarinem měla absorpční maximum při 354 nm, vzrůst absorbance je úměrný koncentraci analytu. Tato metoda je schopná stanovit isoxikam v rozsahu $1,0 \cdot 10^{-3} - 20,0 \mu\text{g/ml}$, limit detekce 1,0 ng/ml.

R. Punith a kol. ³⁰⁾ studovali mechanismus interakcí nesteroidních antiflogistik, isoxikamu a tenoxikamu, s albuminem bovinního séra užitím spektroskopických technik, spektrofluorescence, cirkulárního dichroismu, UV – VIS absorpce a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, za simultánních fyziologických podmínek. Tyto metody jsou citlivé a jejich použití je relativně jednoduché. Hlavní roli v interakcích těchto léčiv s albuminem hrají hydrofobní interakce. Studie s cirkulárním dichroismem a infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací ukázaly, že vazbou isoxikamu a tenoxikamu dochází ke konformačním změnám albuminu. Roztoky isoxikamu a tenoxikamu připravili rozpuštěním ve fosfátovém pufru 0,1 mol/l, pH 7,4. Biologický význam této práce spočívá ve funkci albuminu jako přenašeče pro mnohá léčiva.

A. Nakamura a kol. ³¹⁾ vyvinuli jednoduchou a rychlou semi – mikro kolonovou HPLC metodu s UV detekcí pro stanovení oxikamů, nesteroidních antiflogistik ve vzorku lidské krve. Oxikamy piroxikam, tenoxikam a lornoxikam, včetně isoxikamu, který byl použit jako vnitřní standard, byly extrahovány ze vzorků pufrované lidské plazmy pH 3 dichlormethanem a výsledné extrakty byly podrobeny HPLC analýze. Separace byla provedena na C₁₈ reverzních fázích semi – mikro kolony (250 x 1,5 mm i.d.) při 35 °C. Jako mobilní fázi užíli směs acetonitrilacetátového pufru pH 5 s methanolem. UV detekci realizovali při 365 nm. Čtyři oxikamy byly dobře separovány do 30 minut bez interference se složkami krve. Detekční limity tenoxikamu, piroxikamu a lornoxikamu byly 2,3, 4,2, 6,4, ng/ml v séru a 2,7, 4,7, 9,3 ng/ml v plazmě. Metoda byla použita ke stanovení lornoxikamu v séru pacientů.

G. Tamasi a kol. ³²⁾ prezentovali práci zabývající se novými komplexy platiny s oxikamy. Podali informace o syntéze a charakterizaci nových platinových komplexů s oxikamy, reaktivitě komplexů s vybranými proteiny a cytotoxicitě vůči lidským nádorovým buňkám in vitro. Připravili komplexy platiny s isoxikamem a meloxikamem. Oxikamové ligandy vybrali pro jejich protizánětlivé účinky, univerzální vysokou vaznost s ionty d – kovů, a protože většina lokalizovaných jednotlivých karcinomů jsou obklopeny těžce zánětlivou tkání, vznikající následkem dlouhotrvající radiační terapie. Získané výsledky byly slibné a svědčily pro vyšetřování antiproliferační aktivity in vivo.

R. Cini a kol. ³³⁾ se zabývali neobvyklým vazebným chováním třech nesteroidních antiflogistik ze skupiny oxikamů s Cu(II). Studovali syntézu, strukturu a cytotoxickou aktivitu Cu(II) – isoxikam, - meloxikam, - cinnoxikam odvozených komplexů. Aktivita působila proti širokému spektru nádorových buňek jako jsou ovariální nádorové buňky, buňky malobuňčného plicního karcinomu, melanomové buňky a nádorové buňky nervového systému.

H. Bartsch a kol. ³⁴⁾ uvedli srovnání tří různých metod, HPTLC densitometrie, HPLC a kapilární elektroforézy, vyvinutých pro testování fotostability isoxikamu. Schopnost metody indikovat stabilitu byla prověřena užitím nucené degradace expozicí roztoku vzorku umělému ozáření xenonovou výbojkou. V chromatogramech a elektroforeogramu byl roztok isoxikamu dobře oddělen od degradačních produktů. Fotodegradaci isoxikamu studovali se speciálním důrazem na vyšetření korelace mezi koncentrací roztoku vzorku a stabilitou. Roztoky isoxikamu o třech různých koncentracích podrobili simulovanému slunečnímu záření po 480 minut a testovali jejich stabilitu. Metody srovnávali z hlediska přesnosti a detekčních a kvantitativních limitů. Roztoky isoxikamu byly připraveny rozpuštěním v 2,5 % NH₄OH, pH 11,8. Analýza byla přenesena na HPLC systém Shimadzu, použita byla kolona C₁₈ s reverzními fázemi (119 mm x 3 mm I.D.), velikost částic 5 μm. Jako mobilní fázi zvolili methanol – acetátový pufr, pH 4,6 (40 : 60). Před použitím mobilní fázi zfiltrovali a odplynili, průtok chromatografickým systémem zvolili 0,8 ml/min. Detekce byla realizována pomocí DAD

detektoru při vlnové délce 280 nm. Podle očekávání HPLC vykazovala nejlepší výsledky ze třech metod z hlediska RSD. HPLC ukázala nejnižší a HPTLC nejvyšší detekční a kvantitativní limity ze třech užitých metod. Kvantitativní výsledky dokázali, že fotodegradace isoxikamu je vysoce závislá na koncentraci roztoku vzorku.

H. Ibrahim a kol. ³⁵⁾ vyvinuli rychlou selektivní metodu pro simultánní analýzu tří nesteroidních antiflogistik a salicylové kyseliny pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Separace byla provedena na C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) koloně, velikost částic 5 µm. Jako vnitřní standard vybrali naproxen. Mobilní fází byl acetonitril – fosforečná kyselina (99 : 1), kyselá mobilní fáze byla zvolena k supresi ionizace a pro zvýhodnění vlastností systému reverzních fází. Všechny roztoky standardů nesteroidních antiflogistik, salicylová kyselina a vnitřní standard byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml. Acetylsalicylová kyselina byla připravena v acetonitrilu – fosforečné kyselině (99 : 1), salicylová kyselina a piroxikam v acetonitrilu, mefenamová kyselina v acetonitrilu a dimethylsulfoxidu (4 : 1), vnitřní standard v methanolu. Vzorky byly ošetřeny 0,1% fosforečnou kyselinou v acetonitrilu, aby došlo k precipitaci proteinů. Rozpuštění sloučenin bylo dosaženo v ultrazvukové lázni. Vzorky byly po 30 sekund promýchávány a centrifugovány 10 minut při 12 000 otáčkách. Supernatant byl ihned převeden do injekční vialky. Fluorescenční detekce byla realizována při excitační vlnové délce 290 nm a emisní vlnové délce 445 nm. Navrhovaná metoda je vhodná pro rutinní analýzu acetylsalicylové kyseliny, piroxikamu a mefenamové kyseliny v lidském séru a farmaceutických přípravcích, může být také využita pro stanovení salicylové kyseliny jako nečistoty ve formulích obsahujících acetylsalicylovou kyselinu. Zpracovaná procedura využívá deproteinaci vzorků séra a přímého nástřiku bez předchozí liquid – liquid nebo SPE extrakce. Dosažená výtěžnost ze séra byla více než 90%, opakovatelnost a mezilehlá přesnost byly shledány jako vyhovující, RSD byla v akceptovatelném rozmezí, menší než 10%. Hlavní výhodou metody byla možnost analýzy čtyř sloučenin za stejných podmínek.

H. Y. Ji a kol. ³⁶⁾ uvedli LC – MS/MS metodu pro stanovení piroxikamu, meloxicamu a tenoxicamu v lidské plazmě. Primární zásobní roztoky piroxikamu, meloxicamu, tenoxicamu a isoxikamu, vnitřní standard, byly připraveny v acetonitrilu o koncentraci 1 mg/ml. Pracovní roztoky byly připraveny naředěním acetonitrem. Všechny standardní roztoky byly skladovány v temnu při 4 °C. Příprava vzorku proběhla smícháním 100 µl prázdné plazmy s 10 µl vnitřního standardu a 200 µl 0,5 mol/l HCl. Vzorky byly extrahovány 1 ml ethylacetátu ve 2 ml polypropylenové tubě za protřepávání po dobu 5 minut a centrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 5 minut. Organická vrstva byla převedena a odfoukána do sucha dusíkem při teplotě 35 °C. Rezidua byla rozpuštěna v 40 µl methanol : voda (1 : 1) za protřepávání po dobu 2 minut, centrifugována po dobu 5 minut při 5 000 otáčkách, převedena do vialky, na HPLC kolonu bylo aplikováno 10 µl. Analýza byla provedena na koloně (100 mm x 2,1 mm I. D.), velikosti částic 5 µm s použitím směsi methanolu : formiátu amonného (15 mmol/l, pH 3,0), (60 : 40) jako mobilní fáze, průtok systémem byl 0,2 ml/min, čas analýzy byl 6 minut. Eluent byl

zaveden přímo do elektrospreje hmotnostního spektrometru. Kolizním plynem byl argon. Analyzátozem byl kvadrupól. Vyvinutá metoda byla úspěšně využita ve farmakokinetické studii po transdermální aplikaci piroxikamu formou náplastí na čisté a suché paže čtyř dobrovolníků po 24. hodinách.

Y. H. Kim a kol. ³⁷⁾ vyvinuli metodu pro stanovení lornoxikamu v lidské plazmě pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem, ionizace proběhla elektrosprejem. Jako vnitřní standard byl vybrán isoxikam. Lornoxikam a isoxikam byly extrahovány z lidské plazmy ethylacetátem s kyselým pH a analyzovány na C₁₈ koloně. Mobilní fází byla směs methanol – formiát amonný (10 mmol/l, pH 3), (70 : 30). Bylo dosaženo výtěžnosti 87,8% u lornoxikamu a 66,5% u isoxikamu a spodního kvantitativního limitu 0,5 ng/ml u lornoxikamu. Tato metoda byla úspěšně aplikována ve farmakokinetické studii lornoxikamu po perorálním podání 8 mg lornoxikamu lidem.

M. Sultan a kol. ³⁸⁾ se zabývali stanovením nesteroidních antiflogistik ve farmaceutických formulích a biologickém materiálu, krev, plazma, erytrocyty a preanalytickou úpravou vzorku. Prozkoumána byla liquid – liquid a solid – phase extrakce. Analýzu provedli pomocí HPLC spojenou s UV detekcí a hmotnostní spektrometrií, nakonec byl použit μ HPLC systém se separační kolonou (8 cm x 200 μ m I. D.).

J. Joseph-Charles a M. Bertucat ³⁹⁾ vyvinuli jednoduchou a rychlou HPLC metodu pro stanovení tenoxikamu, piroxikamu, meloxikamu a lornoxikamu. Vnitřním standardem byl isoxikam. Separace proběhla na C₁₈ koloně s reverzními fázemi. UV detekce byla realizována při 360 nm. Metoda byla užita na farmaceutické formule obsahující jednu aktivní složku.

A. Doliwa a kol. ⁴⁰⁾ vyvinuli a validovali HPLC metodu pro stanovení piroxikamu. Zásobní roztok piroxikamu byl připraven rozpuštěním ve fosfátovém pufru pH 7,4. Vnitřním standardem byl tenoxikam, který byl rozpuštěn v methanolu. Pro analýzu byl použit detektor s diodovým polem, detekce byla realizována při 354 nm. Separace byla provedena na reverzních fázích, kolona C₁₈ (12 x 0,46 cm), velikost částic 5 μ m. Mobilní fází byla směs acetonitril – kys. octová 4% pH 2,8 (45 : 55). Mobilní fáze byla filtrována přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μ m. Průtok chromatografickým systémem byl 1 ml/min. Na kolonu bylo dávkováno 100 μ l. Čas analýzy byl kratší než 8 minut. Tato HPLC metoda byla aplikována k měření in vitro percutánního prostupu piroxikamu přes kůži břicha u kryš pro získ časově – koncentračních profilů piroxikamu.

H. M. Rigato a kol. ⁴¹⁾ srovnávali dostupnost meloxikamu ze dvou různých 15 mg tablet v lidském organismu. Vzorky plazmy byly získávány v 96. hodinových intervalech a koncentrace meloxikamu byly analyzovány pomocí HPLC spojené s hmotnostní spektrometrií.

Ionizace proběhla pomocí elektrospeje. Separace proběhla na koloně C₈ (150 mm x 4,6 mm I. D.). Jako vnitřní standard byl vybrán tenoxikam.

H. Bartsch a kol. ⁴²⁾ vyšetřovali fotodegradaci piroxikamu se zvláštním důrazem na korelaci mezi koncentrací roztoku vzorku a jeho stabilitou. Vytvořili srovnání tří různých metod, HPTLC - denzitometrie, HPLC a kapilární elektroforézy. Schopnost metody indikovat stabilitu byla prověřena užitím nucené degradace expozicí roztoku vzorku umělému ozáření xenonovou výbojkou. V chromatogramech a elektroforeogramu byl roztok piroxikamu dobře oddělen od degradačních produktů. Roztoky piroxikamu o třech různých koncentracích byly podrobeny simultánnímu slunečnímu záření po dobu 480 minut. Stabilita byla vyšetřována kvantifikací piroxikamu výše zmiňovanými metodami. Metody byly srovnány z hlediska provedení a přesnosti, náklady a čas analýzy byly rovněž zohledněny. Roztoky obsahující piroxikam ve třech různých koncentracích byly připraveny rozpuštěním v 2,5% NH₄OH, pH 11,8. Analýza byla přenesena na HPLC systém Shimadzu, použita byla kolona C₁₈ s reverzními fázemi (119 mm x 3 mm I.D.), velikost částic 5 μm. Jako mobilní fázi zvolili methanol – acetátový pufr, pH 4,3 (45 : 55). Před použitím mobilní fázi zfiltrovali a odplynili. Detekce byla realizována pomocí detektoru s diodovým polem při vlnové délce 280 nm. Podle očekávání podala HPLC nejlepší výsledky RSD. HPTLC a CE ukázaly vyšší směrodatnou odchylku obzvláště u nízkých koncentrací vzorku. HPTLC byla časově nejnáročnější metodou. Kvantitativními výsledky dokázali, že fotodegradace piroxikamu je vysoce závislá na koncentraci roztoku vzorku.

G. M. Escandar a kol. ⁴³⁾ prezentovali jednoduchou a vysoce selektivní metodu pro stanovení piroxikamu a pyridoxinu ve farmaceutických preparátech. Přístup je založen na kombinaci SPE extrakce a fluorimetrie za pokojové teploty. SPE extrakce za optimálních pH podmínek poskytuje separaci mezi piroxikamem a pyridoxinem. Zásobní roztok piroxikamu byl připraven rozpuštěním piroxikamu v 0,5 mol/l NH₃. Směs byla ponořena na 10 minut do ultrazvukové lázně, zfiltrována a naředěna vodou. Tento roztok byl dále ředěn HCl, dokud nebylo dosaženo pH 3. Pro SPE byl použit C₁₈ disk, který byl poté převeden na laboratorně vyrobený SPE nosič membrány, fluorescenční spektra byla sbírána v 90°, ozáření proběhlo při vlnové délce 320 nm a získaná emisní vlnová délka byla 440 nm. Neboť polarita zadržovaných molekul hraje důležitou roli v interakci s extrakční membránou, vyšetřovali retenci piroxikamu jako funkci jeho ionizačního stavu. Nenabitě molekuly převládaly při pH 3, toto pH bylo zvoleno jako pracovní. Ve srovnání s HPLC má tento přístup kratší čas analýzy a nespotebovává rozpouštědla a tedy redukuje náklady analýzy.

H. A. Mohamed a kol. ⁴⁴⁾ využili potenciometrické a spektrofluorimetrické metody ke studiu interakcí tenoxikamu se šesti kovovými ionty, Fe(III), Bi(III), Sb(III), Cr(II), Cd(II), Al(III). Byla studována fluorescence tenoxikamu za absence a přítomnosti kovových iontů. Léčivo v 0,5 mol/l HNO₃ bylo stanovováno fluorimetricky při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm. Roztok standardu tenoxikamu byl připraven rozpuštěním léčiva

v acetonitrilu. Roztok byl chráněn před světlem a byl připravován denně čerstvý. Standardní roztok byl naředěn 0,5 mol/l HNO_3 . Prezentovaná práce popisuje jednoduchou, časově nenáročnou metodu stanovení tenoxikamu měřením intenzity fluorescence v médiu kyseliny dusičné. Bylo zjištěno, že intenzita fluorescence tenoxikamu se zvyšuje v komplexu s hlinitými ionty. Metoda byla úspěšně aplikována pro stanovování tenoxikamu ve farmaceutických formulích.

P. C. Damiani a kol. ⁴⁵⁾ popsali spektrofluorimetrickou detekci piroxikamu ve farmaceutických tabletách. Metoda vyžadovala excitaci okyseleného roztoku léčiva 0,5 mol/l HNO_3 při 330 nm a měření intenzity fluorescence při 440 nm. Zásobní roztok piroxikamu byl připraven rozpuštěním piroxikamu v 0,5 mol/l NaOH, směs byla protřepávána nejméně 10 minut, pak byla přidána 0,5 mol/l HNO_3 . Standardní roztok piroxikamu byl připraven naředěním zásobního roztoku 0,5 mol/l HNO_3 . Intenzita fluorescence byla měřena 2 hodiny po naředění, neboť bylo zjištěno, že intenzita vzrůstá s časem, dokud nedosáhne maxima.

A. Marland a kol. ⁴⁶⁾ studovali eliminačními profily tenoxikamu a hydroxytenoxikamu v koňské moči a séru, které byly založeny na kvantifikaci těchto analytů pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Tenoxikam byl podán čtyřem koním v dávce 200 mg.

M. Yritia a kol. ⁴⁷⁾ vytvořili srovnávací studii dvou analytických metod pro kvantifikaci piroxikamu v plazmě pomocí připojené a nepřipojené SPE extrakce a HPLC. SPE kartridže obsahovali C_8 sorbent pro obě extrakční metody. Jako vnitřní standard byl vybrán tenoxikam. Analyty piroxikam a tenoxikam byly separovány na C_{18} koloně. Mobilní fází byla směs acetonitril – fosfátový pufr 20 mmol/l pH 3,1, (50 : 50). Následovala UV detekce při 360 nm. Metody byly validovány z hlediska citlivosti, přesnosti a správnosti.

3. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce je vypracování metody pro kvantitativní hodnocení isoxikamu, obsaženého ve vzorku plné krve pomocí solid-phase extrakce. Při HPLC analýze isoxikamu byla využita fluorimetrická detekce.

Tato problematika zahrnuje několik dílčích úkolů:

1. Ověření chromatografických podmínek
2. Výběr vhodného vnitřního standardu pro HPLC analýzu isoxikamu
3. Výpočet účinnosti extrakce vzorku upraveného pomocí SPE
4. Kvantitativní hodnocení isoxikamu ze vzorku plné krve s využitím SPE
5. Validace metody

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a přístroje

Léčiva a chemikálie

isoxicam (Sigma, St. Louis, USA)
diflunisal (Sigma, St. Louis, USA)
methanol p.a. (Penta, Praha, ČR)
acetonitril HPLC-grade (Merk, Darmstadt, BRD)
chloroform HPLC-grade (Merk, Darmstadt, BRD)
kyselina fosforečná 85% č. (Lachema, Neratovice, ČR)
kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Praha, ČR)

Biologický materiál

plná králičí krev (ELDORET s.r.o, Praha, ČR)

Kolony

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

Přístroje

analytické váhy ALS 220-4N (Kern, Německo)
digitální pH-metr Acidimetr 333 (Druopta, Praha, ČR)
elektrická třepačka LT2 (Kavalier, Votice, ČR)
ultrazvuková lázeň K 10 (Kraintek, Slovensko)
centrifuga CL 31R Multispeed (Thermo, Château-Gontier, Francie)
extrakční vakuové zařízení Visiprep SPE (Supelco, Bellefonte, USA)
koncentrátor vzorků Evap EV 01 (ECOM, Praha, ČR)

HPLC sestava Shimadzu

kapalinový chromatograf LC – 10 Shimadzu (Tokyo, Japan): řídicí jednotka SCL – 10A vp, autoinjektor SIL – 10AD vp, degasér DGU – 14A, zařízení pro nastavení teploty kolony CTO – 10ASvp, UV-VIS detektor SPD – 10A vp, fluorimetrický detektor RF – 10Axl a analytický software Class-VP Shimadzu (Tokyo, Japan)

Pomůcky

Mikrodávkovač Hamilton o objemu 10 µl, 50 µl, 100 µl, 250µl (ECOM, Praha, ČR)

4.2. Příprava roztoků

Roztok standardu isoxikamu

Isoxikam byl rozpuštěn v acetonitrilu, 10 mg isoxikamu bylo odváženo do 10 ml odměrné baňky a doplněno acetonitrilem po rysku. Vznikl roztok o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byl do 10 ml baňky odpipetován 1 ml a byl doplněn acetonitrilem po rysku, vznikl roztok o koncentraci 0,1 mg/ml.

Roztok standardu diflunisalu (vnitřní standard)

Diflunisal byl rozpuštěn v acetonitrilu, 10 mg diflunisalu bylo odváženo do 10 ml odměrné baňky a doplněno acetonitrilem po značku. Vznikl roztok o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byl do 10 ml baňky odpipetován 1 ml a byl doplněn acetonitrilem po rysku, vznikl roztok o koncentraci 0,1 mg/ml. Z tohoto roztoku byl do baňky odpipetován 1 ml a byly přidány 3 ml acetonitrilu, vznikl roztok o koncentraci 0,025 mg/ml.

Roztok kyseliny chlorovodíkové

4,5 ml kyseliny chlorovodíkové 35% bylo odměřeno a rozpuštěno v 500 ml destilované vody.⁴⁾ Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l má pH 1,33, pro potřebu extrakce bylo pH upravováno přidávkem vody na požadovanou hodnotu pH = 2,5 a kontrolováno pomocí acidimetru.

Roztok kyseliny fosforečné

Byl připraven roztok kyseliny fosforečné 0,1%. K 84,9 ml destilované vody bylo přidáno 0,1 ml kys. fosforečné 85%.

4.3 Chromatografické podmínky analýzy isoxikamu

Analýza byla provedena na analytické koloně Separon SGX C₁₈ o velikosti částic sorbentu 7 µm a parametrech 150 x 3,0 mm I. D.

Jako mobilní fáze pro analýzu isoxikamu byl zvolen roztok kys. fosforečná 0,1% – methanol (30 : 70), pH 3,0. Před analýzou byla mobilní fáze zfiltrována pomocí vodní vývěvy filtrem Sintr S₄. Průtok mobilní fáze chromatografem byl nastaven na 0,7 ml/min.

Detekce byla provedena pomocí fluorimetrického detektoru. Fluorimetrická detekce byla realizována při excitační vlnové délce 335 nm a emisní vlnové délce 470 nm.

Na kolonu bylo dávkováno 10 µl analyzovaného vzorku.

Pro kvantitativní analýzu isoxikamu ve vzorcích plné krve byla zvolena metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl vybrán diflunisal.

4.4 Izolace léčiva z krve metodou solid-phase extrakce

Vzorek byl připraven tímto postupem: k 0,5 ml plné králičí krve byl přidán potřebný objem roztoku isoxikamu 0,1 mg/ml a diflunisalu (vnitřní standard) 0,025 mg/ml a vzorek byl mírně protřepán. Poté bylo přidáno 0,5 ml vody a vzorek byl ponořen na dobu 5 minut do ultrazvukové lázně, aby nastala hemolýza.

Ke vzorku byly přidány 2 ml kyseliny chlorovodíkové pro úpravu kyselosti a 5 minut byl vzorek protřepáván v uzavřené zkumavce na elektrické třepačce. Po pětiminutové centrifugaci (při 5 000 otáček/min) byl supernatant aplikován na předem aktivovanou extrakční kolonku SILICA-Cart s náplní Separon SGX C₁₈ (60µm) napojenou na vakuové extrakční zařízení.

Chronologický postup extrakce:

- Aktivace kolonky promytím 5ml methanolu
- Promytí 3 ml kyseliny chlorovodíkové (*pH 2,5*)
- Aplikace vzorku
- Promytí 3 ml kyseliny chlorovodíkové (*pH 2,5*)
- Vymytí analytu z kolonky 3 ml chloroformu

Analyzovaná látka se eluuje ze sorbentu kolonky chloroformem. Tento extrakt byl odpařen do sucha proudem dusíku v koncentrátoru vzorků a rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu. Roztok byl přelit do vialky a umístěn do autosampleru.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

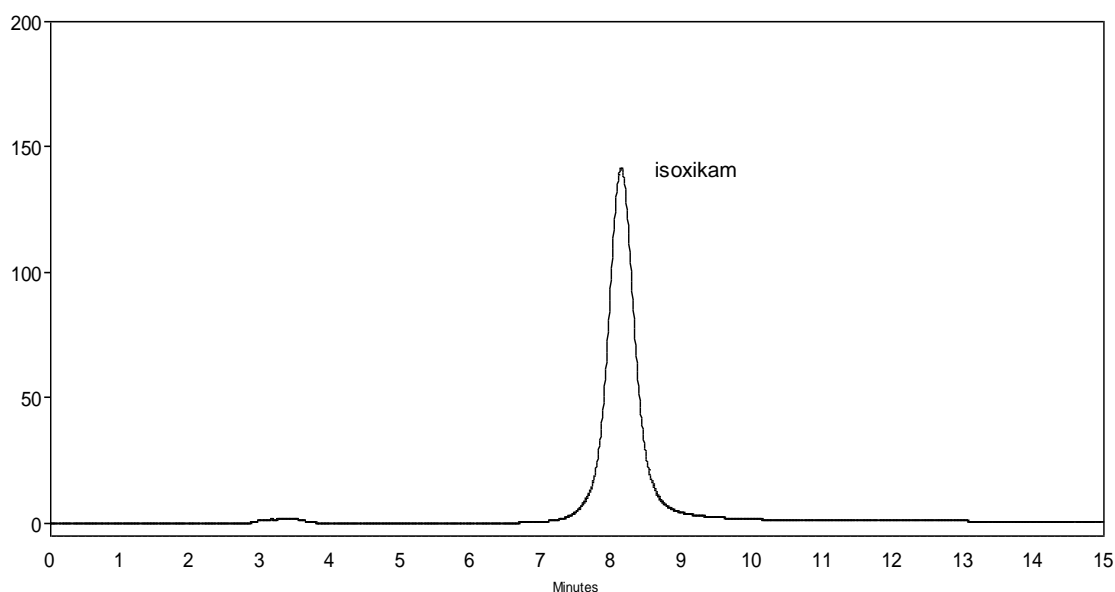
Pro analýzu isoxikamu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí byly vybrány optimální chromatografické podmínky. Vycházelo se z poznatků získaných autorkou při vypracování bakalářské a diplomové práce,^{48, 49)} které navazovaly na předchozí diplomové práce,^{50, 51)} řešící problematiku HPLC analýzy isoxikamu a tenoxikamu v biologickém materiálu při detekci v UV oblasti spektra. V bakalářské práci⁴⁸⁾ byla porovnána UV a fluorimetrická detekce při hodnocení obou léčiv ve vzorku krve po SPE úpravě. Oba způsoby detekce byly využity i v diplomové práci⁴⁹⁾ při kvantitativním hodnocení tenoxikamu v plné krvi.

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

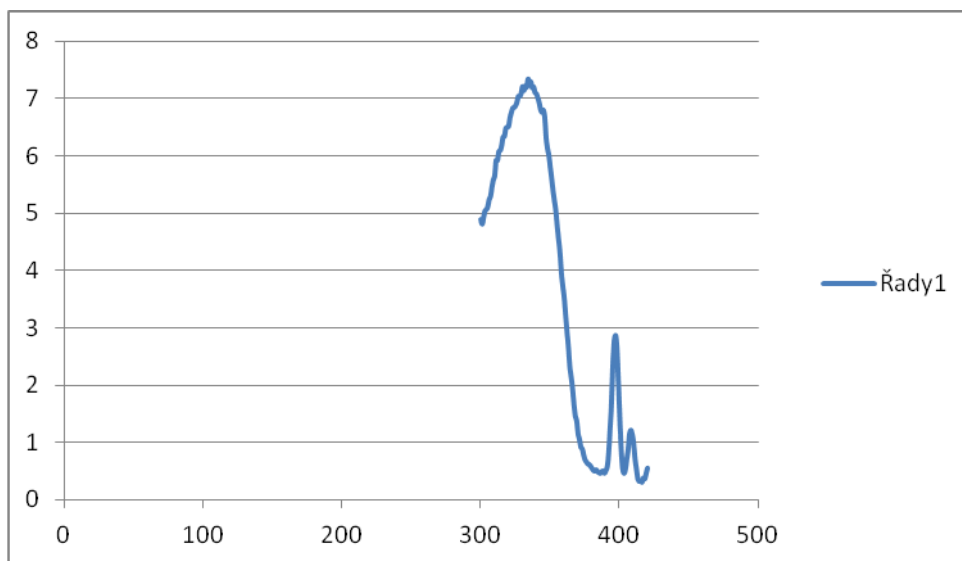
Pro detekci isoxikamu byla využita fluorimetrická detekce. Pro zjištění vlnových délek vhodných k fluorimetrické detekci bylo proměřeno excitační a emisní spektrum isoxikamu (viz obr. č. 2, 3). K měření byl připraven roztok isoxikamu 0,01 mg/ml v acetonitrilu. Jako vlnové délky vhodné k detekci byly určeny hodnoty $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$.

Mobilní fází byla směs methanol – roztok kys. fosforečné 0,1% v poměru 70 : 30, pH 3,0. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,7 ml/min. Bylo dosaženo symetrických, štíhlých píků s retenčními časy isoxikamu 8,2 minut.

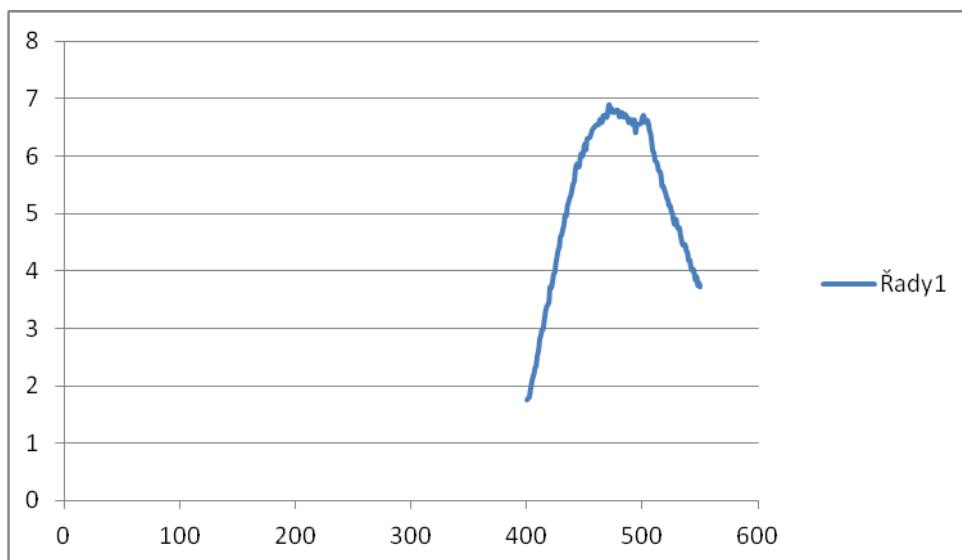
chromatogram



Obr. č. 1: HPLC chromatogram standardu isoxikamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



Obr. č. 2: Excitační spektrum isoxikamu (maximum 334 nm)



Obr. č. 3: Emisní spektrum isoxikamu (maximum 471 nm)

5.2. Výběr vnitřního standardu

Pro účely kvantitativního hodnocení byla využita metoda vnitřního standardu, hledali jsme tedy látku, která by se eluovala v blízkosti píku isoxikamu.

Za chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4. 3., byl retenční čas isoxikamu 8,2 minut.

Biologický materiál se vymývá z kolony do páté minuty.

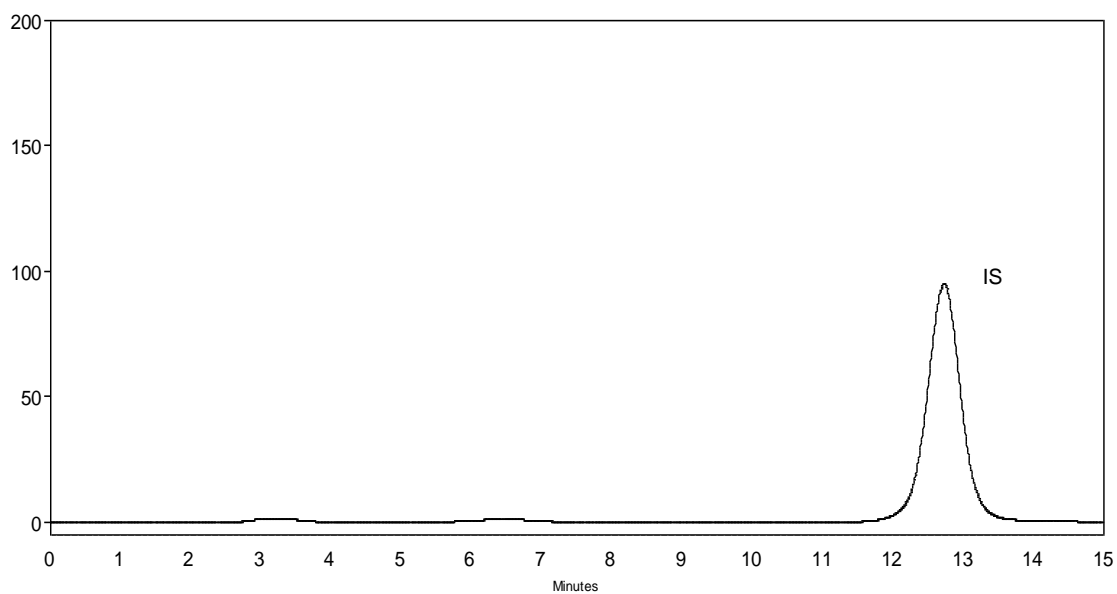
fluorimetrická detekce 335 nm/470 nm	
zkoušené látky	retenční čas (min)
diklofenak	10,6
ketoprofen	5,8
indometacin	7,7
tolmetin	5
ibuprofen	*
diflunisal	13
fenazon	8,6
theofylin	*
fenylbutazon	10,2
vanillin	4,1
diazepam	*
khellin	8,9

Tabulka 1: Údaje pro výběr vnitřního standardu (*...pík se do patnácti minut neobjevil)

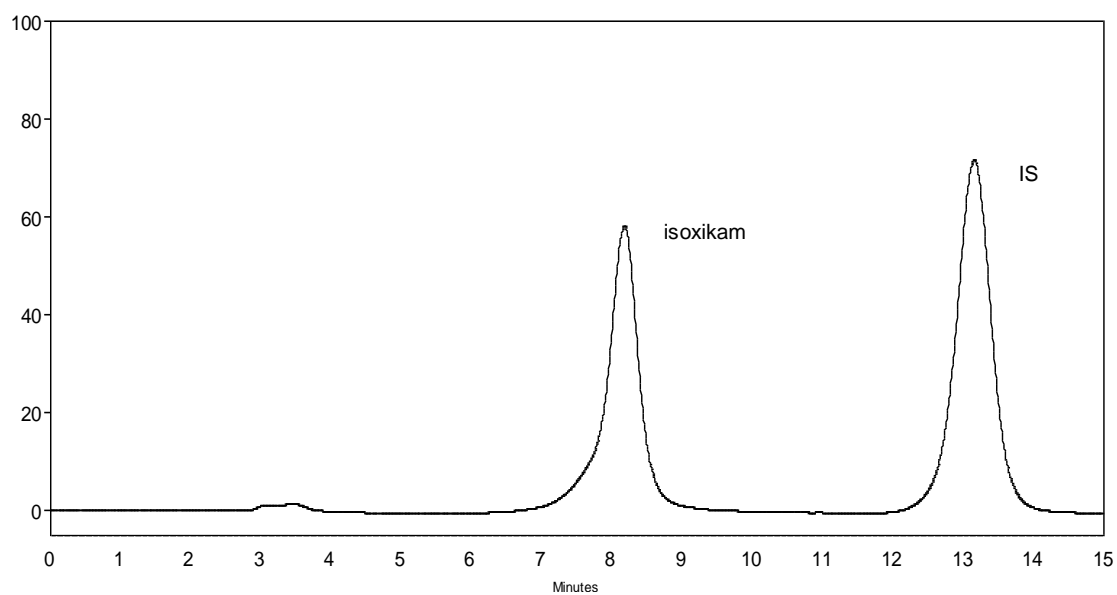
Jako vnitřní standard byl tedy testován diflunisal, diklofenak a fenylbutazon. Tyto látky by byly pro analýzu výhodné, neboť se eluovali až za isoxikamem a při jejich použití by nehrozilo riziko interference píků s píky balastních látek ze vzorku krve. Na chromatogramu se ukázal nejvhodněji diflunisal, jehož pík měl dobrý tvar a eluoval se v blízkosti isoxikamu.

Retenční čas diflunisalu byl 13 min.

chromatogramy



Obr. č. 4: HPLC chromatogram standardu diflunisalu (IS) v acetonitrilu 0,01 mg/ml, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



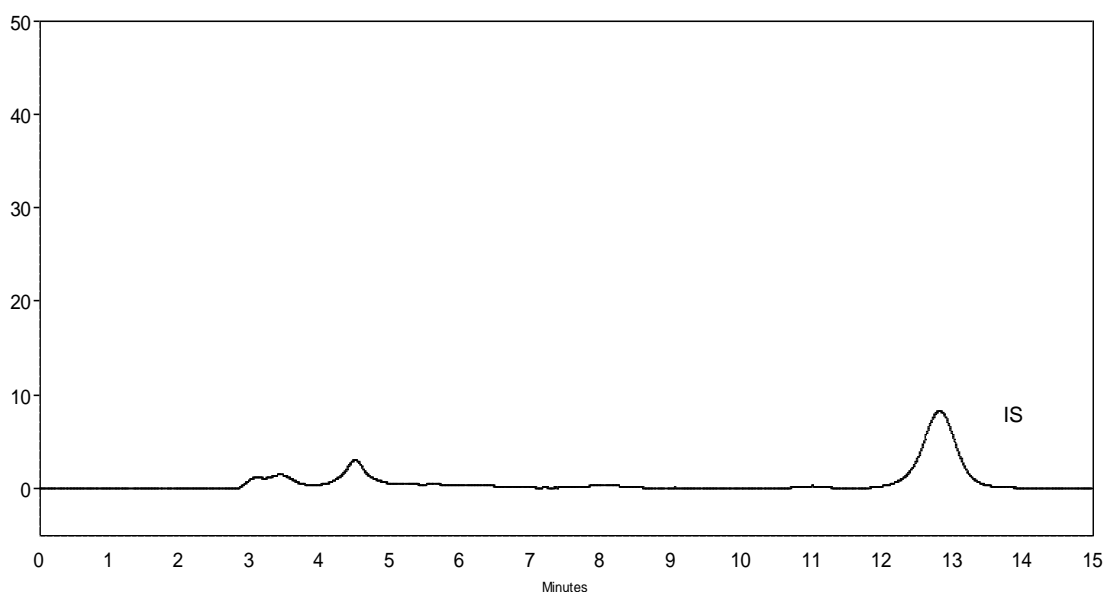
Obr. č. 5: HPLC chromatogram standardu isoxikamu v acetonitrilu 0,1 mg/ml a diflunisalu (IS) v acetonitrilu 0,025 mg/ml v poměru 1:1, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3

5. 3. Izolace isoxikamu ze vzorku plné krve extrakcí na pevné fázi

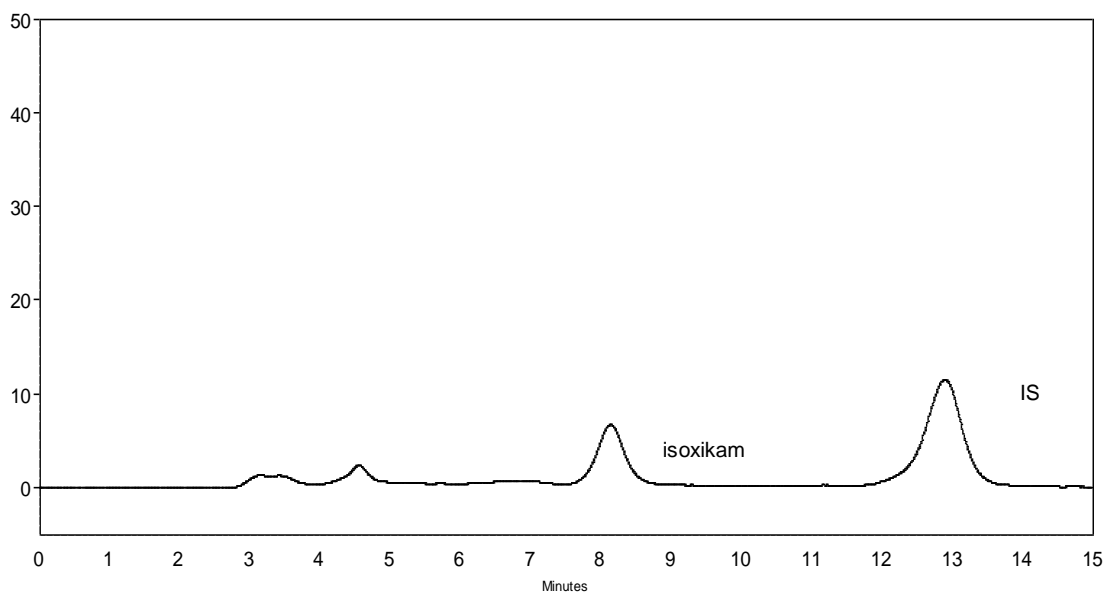
Pro extrakci léčiva ze vzorku byly využity komerčně vyráběné kolonky SILICA-Cart s náplní Separon SGX C₁₈ (60µm). Chronologický postup extrakce je uveden v kapitole 4. 4. Před aplikací vzorku je třeba kolonku promýt organickým rozpouštědlem a poté vodnou fází. Kolonka byla aktivována promytím methanolem a následně roztokem kyseliny chlorovodíkové o pH 2,5. Po aplikaci vzorku byla kolonka promyta opět roztokem kyseliny k vymytí balastních látek. Ze sorbentu kolonky byl isoxikam eluován chloroformem. Při izolaci isoxicamu bylo vycházeno z postupu uvedeného v bakalářské práci.⁴⁸⁾ Extrakt byl odpařen do sucha proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu. Tento roztok byl dávkován na kolonu chromatografu.

Byla ověřena čistota chloroformu při fluorimetrické detekci (viz Obr. č. 8) odpařením 3 ml chloroformu a rozpuštěním odparku v 1 ml acetonitrilu.

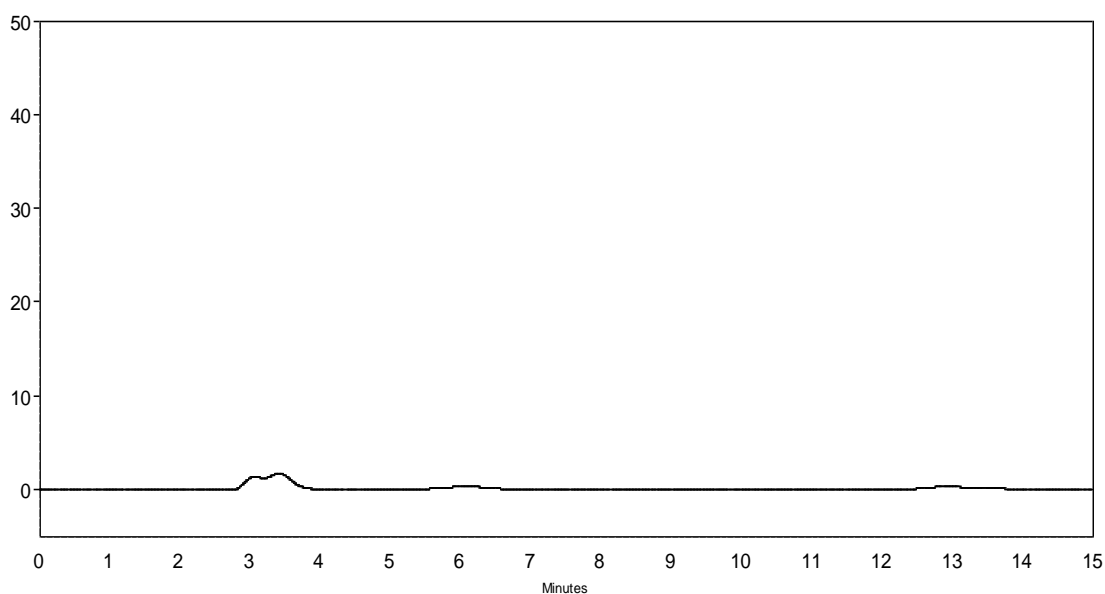
Chromatogramy



Obr. č. 6: HPLC chromatogram vzorku diflunisalu (IS) v plné krvi (5 µg/ml), upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



Obr. č. 7: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 20 μg isoxikamu a 5 μg diflunisalu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



Obr. č. 8: HPLC chromatogram chloroformu – 3 ml chloroformu zahuštěny do sucha a odparek rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3

5. 4. Extrakční účinnost (Recovery)

Recovery vyjádřená v procentech, udává množství látky extrahované z biologického materiálu. Odezva detektoru dosažená množstvím léčiva přidaného a extrahovaného z biologického materiálu je porovnána s odezvou detektoru dosaženou při nástřiku téhož množství standardu.

Procenta výtěžnosti byla vypočtena z plochy píku isoxikamu ve vzorku krve a plochy píku standardu isoxikamu. Stejně byla vypočtena i výtěžnost diflunisalu, používaného jako vnitřní standard.

Pro výpočet recovery byl připraven roztok standardu isoxikamu o koncentraci 0,02 mg/ml a diflunisalu o koncentraci 0,005 mg/ml.

	plocha píku standard	
	isoxikam	diflunisal
1	275 023	511 279
2	251 274	593 512
3	270 412	532 745
4	275 306	566 748
5	273 801	582 618
6	270 570	496 885
průměr	269 398	547 298

Tabulka 2: Údaje pro výpočet recovery – plochy píků standardu

Pro výpočet recovery byl vybrán vzorek obsahující 20 µg isoxikamu a 5 µg diflunisalu.

	plocha píku vzorek	
	isoxikam	diflunisal
1	177 649	414 500
2	195 977	419 783
3	201 014	409 527
4	193 650	419 403
5	196 874	426 937
6	178 945	400 284
průměr	190 685	415 072

Tabulka 3: Údaje pro výpočet recovery – plochy píků po extrakci ze vzorku

Při analýze vzorku s přidaným množstvím isoxikamu 10 µg bylo vypočteno získané množství isoxikamu 7,08 µg. Byla vypočtena výtěžnost 70,8%.

Při analýze vzorku s přidaným množstvím diflunisalu 2,5 µg bylo vypočteno získané množství diflunisalu 1,9 µg. Byla vypočtena výtěžnost 75,8%.

5. 5. Kvantitativní hodnocení isoxikamu

Pro kvantitativní hodnocení isoxikamu byla zvolena metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl vybrán diflunisal 0,025 mg/ml v acetonitrilu. K vyhodnocení výsledků byla vypracována kalibrační křivka.

5. 5. 1. Sestrojení kalibrační křivky

Pro sestrojení kalibrační křivky bylo připraveno 6 vzorků krve s odstupňovanou koncentrací tak, aby v jednom mililitru plné krve bylo 5, 10, 20, 40, 60, 80 µg isoxikamu a 5 µg diflunisalu.

Úprava vzorků proběhla pomocí SPE na kolonce se sorbentem Separon SGX C₁₈ - postup je uveden v kapitole 4. 4. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4. 3.

Kalibrační křivka je grafem závislosti poměru plochy píku isoxikamu a plochy píku vnitřního standardu na koncentraci isoxikamu ve vzorku plné krve.

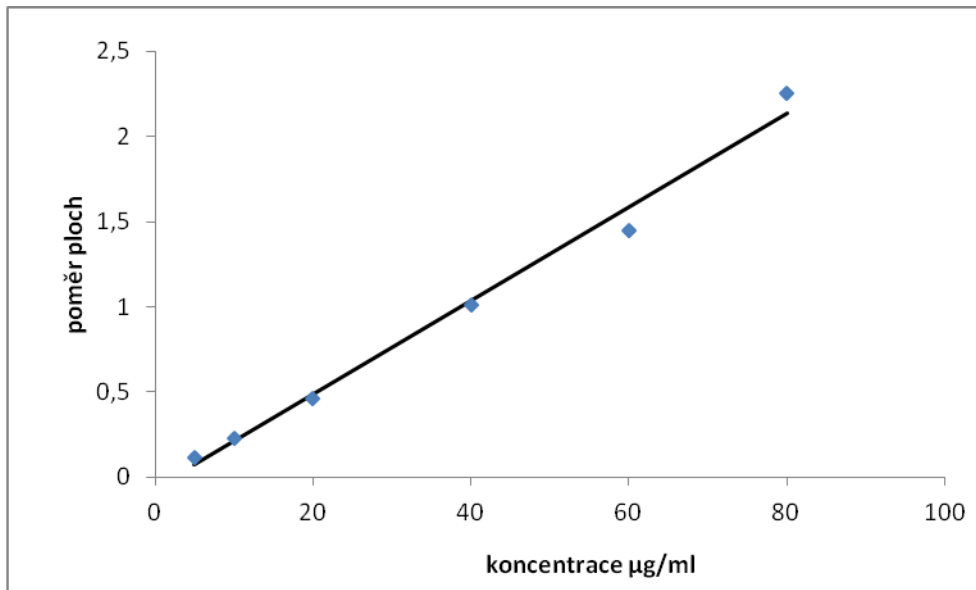
koncentrace (µg/ml)		plocha píku	
		isoxikam	diflunisal
5	1	36 022	359 698
	2	48 015	371 697
	3	45 149	379 296
	4	43 791	381 362
	5	46 574	392 507
10	1	92 267	393 136
	2	99 441	407 929
	3	90 433	411 543
	4	93 196	416 268
	5	97 142	415 094
20	1	177 649	414 500
	2	195 977	419 783
	3	201 014	409 527
	4	193 650	419 403
	5	196 874	426 937
40	1	384 384	387 063
	2	387 078	393 045
	3	413 308	395 690
	4	405 327	390 208
	5	397 524	399 219
60	1	558 883	390 679
	2	613 018	414 308
	3	619 481	427 255
	4	597 127	414 728
	5	627 949	439 828
80	1	955 845	438 929
	2	1 008 960	439 809
	3	976 102	438 936
	4	1 015 802	441 885
	5	1 002 410	443 003

Tabulka 4: Údaje pro sestrojení kalibrační křivky – plochy píků

koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)		poměr plochy píků		průměr
		isoxikam / diflunisal		
5	1	0,1001451		0,116369
	2	0,1291778		
	3	0,1190337		
	4	0,1148279		
	5	0,1186578		
10	1	0,2346949		0,231223
	2	0,2437704		
	3	0,2197413		
	4	0,2238846		
	5	0,2340241		
20	1	0,4285863		0,461829
	2	0,4668531		
	3	0,4908443		
	4	0,4617277		
	5	0,4611313		
40	1	0,9930787		1,011385
	2	0,9848185		
	3	1,0445248		
	4	1,0387460		
	5	0,9957548		
60	1	1,4305427		1,445518
	2	1,4796190		
	3	1,4499093		
	4	1,4398039		
	5	1,4277149		
80	1	2,1776757		2,251421
	2	2,2940868		
	3	2,2237912		
	4	2,2987927		
	5	2,2627612		

Tabulka 5: Údaje pro sestavení kalibrační křivky – poměry ploch

Kalibrační křivka



Regresní funkce : $y = k x + q$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

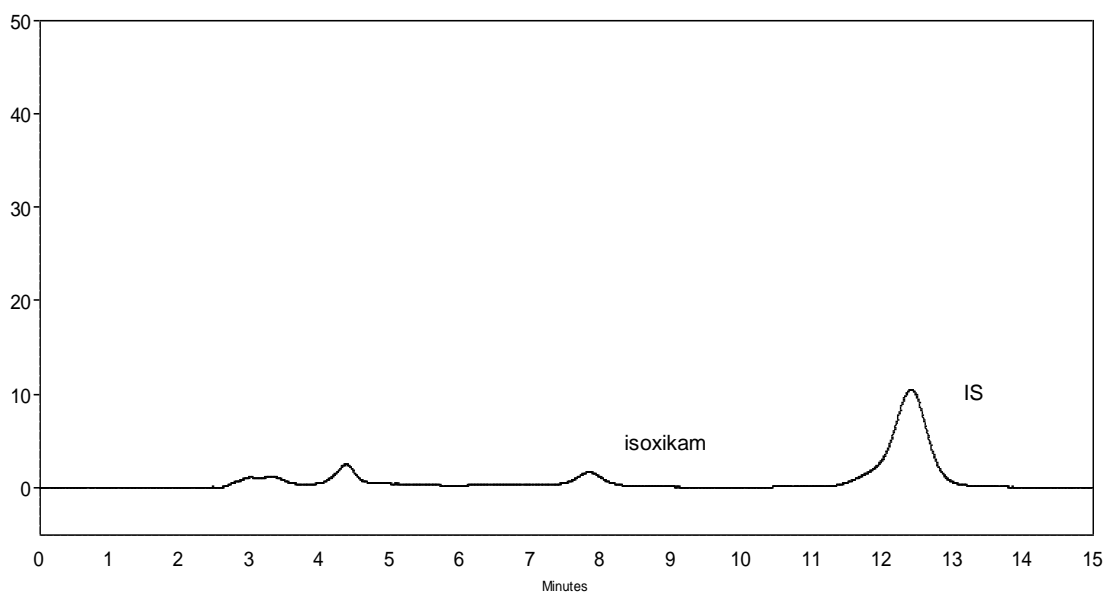
Směrnice: $k = 0,0275 \pm 0,0014$

Absolutní člen: $q = -0,067 \pm 0,065$

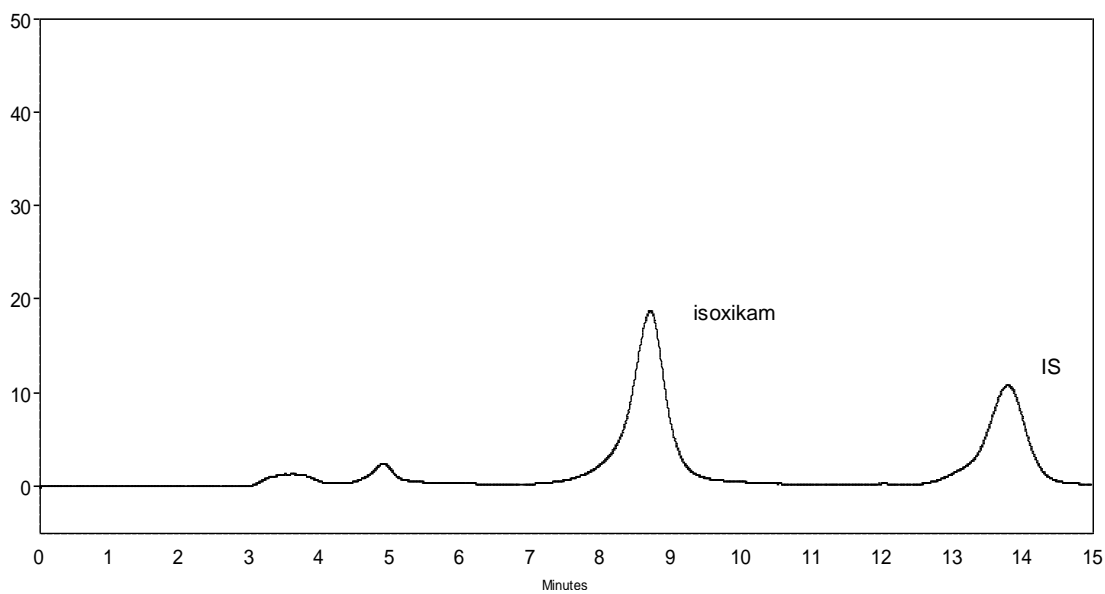
Koeficient korelace: $r = 0,995$

Reziduální odchylka: $s_{rez} = 0,0955$

chromatogramy



Obr. č. 9: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 5 µg isoxikamu a 5 µg diflunisalu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



Obr. č. 10: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 60 µg isoxikamu a 5 µg diflunisalu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3

5. 5. 2 Ověření kalibrační křivky

Ověření kalibrační křivky bylo provedeno pomocí čtyř vzorků krve o známých koncentracích isoxikamu. Vzorky byly připraveny tak, aby v jednom mililitru plné krve bylo 8, 30, 50, 70 µg isoxikamu a 5 µg diflunisalu.

Vzorky byly upraveny SPE extrakcí a analyzovány stejným způsobem jako vzorky kalibrační křivky.

Poměry ploch pík isoxikamu a diflunisalu získané z chromatografických záznamů byly dosazeny do rovnice kalibrační křivky $y = 0,0275x - 0,067$. Byly zjištěny koncentrace analyzovaných vzorků.

koncentrace (µg/ml)		poměr plochy píků		průměr
		isoxikam / diflunisal		
8,0	1	0,1467004		0,150453
	2	0,1470101		
	3	0,1556928		
	4	0,1524095		
30	1	0,7169172		0,715581
	2	0,7097982		
	3	0,7208719		
	4	0,7147358		
50	1	1,2648583		1,200917
	2	1,1942448		
	3	1,1257685		
	4	1,2187964		
70	1	1,8098685		1,802208
	2	1,8261138		
	3	1,7789479		
	4	1,7939037		

Tabulka 6: Údaje pro ověření kalibrační křivky – poměry ploch

koncentrace (µg/ml)	průměr poměrů plochy píků isoxikam / diflunisal	určená koncentrace (µg/ml)	určené množství (%)
8,0	0,150453	7,907	98,84
30,0	0,715581	28,458	94,86
50,0	1,200917	46,106	92,21
70,0	1,802208	67,971	97,10

Tabulka 7: Ověření kalibrační křivky – určené koncentrace

Při ověření kalibrační křivky bylo zjištěno 92,2% - 98,8% přidaného množství isoxikamu.

5. 5. 3 Modelové vzorky

Byly připraveny dva modelové vzorky isoxikamu v plné králičí krvi, na kterých byl testován vliv zmražení.

K jednomu mililitru plné krve bylo přidáno 20 µg a 50 µg isoxikamu. Vzorek byl protřepán a zmražen po dobu 48 hodin. Poté byl vzorek rozmražen a byl přidán vnitřní standard. Vzorek byl dále upraven postupem uvedeným v kapitole 4. 4. a analyzován.

Z chromatografických záznamů byly vypočteny poměry ploch píků isoxikamu a vnitřního standardu a jejich průměrná hodnota byla dosazena do rovnice kalibrační křivky. Zjištěná koncentrace modelových vzorků je uvedena v tabulce 9.

koncentrace (µg/ml)		poměr plochy píků		průměr
		isoxikam / diflunisal		
20	1	0,4689947		0,471687
	2	0,4814565		
	3	0,4741982		
	4	0,4620986		
50	1	1,2294129		1,229563
	2	1,2159897		
	3	1,2415281		
	4	1,2313195		

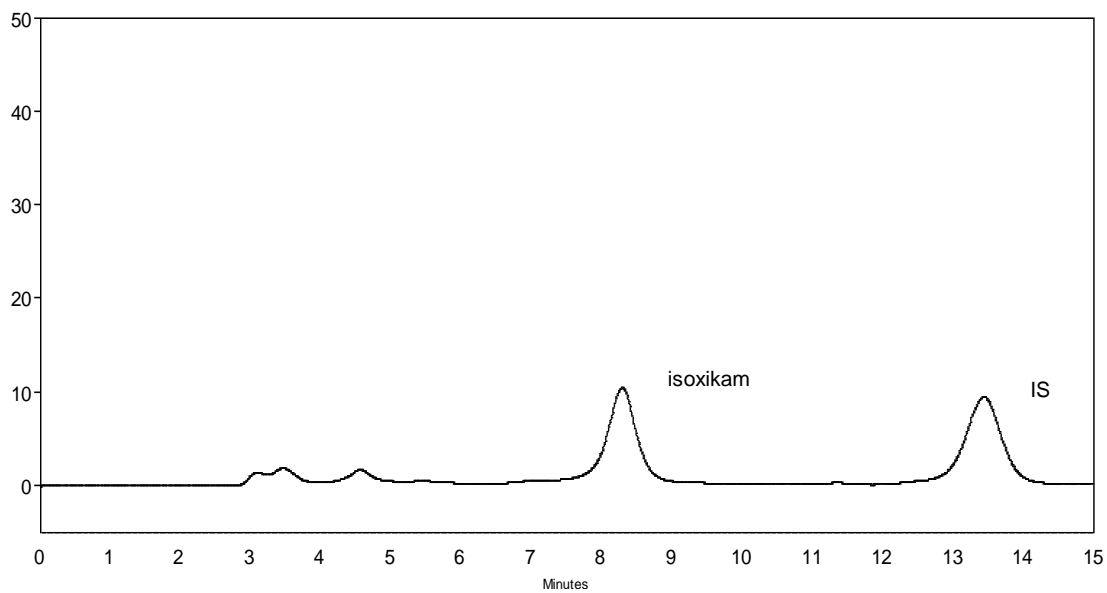
Tabulka 8: Modelové vzorky – poměry ploch

koncentrace (µg/ml)	průměr poměrů plochy píků isoxikam / diflunisal	určená koncentrace (µg/ml)	určené množství (%)
30,0	0,471687	19,589	97,94
50,0	1,229563	47,148	94,30

Tabulka 9: Modelové vzorky – určené množství

Při analýze modelových vzorků bylo zjištěno 97,9% a 94,3 % přidaného množství isoxikamu. Zmražení vzorku krve s isoxikamem před vlastní analýzou nemá vliv na hodnocení isoxikamu. Ani na HPLC chromatogramu (obr. č. 11) nejsou patrné žádné změny.

chromatogram



Obr. č. 11: HPLC chromatogram modelového vzorku isoxikamu z plné krve - 50 μg isoxikamu a 5 μg difenisalu (IS), upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3

5. 6. Validace

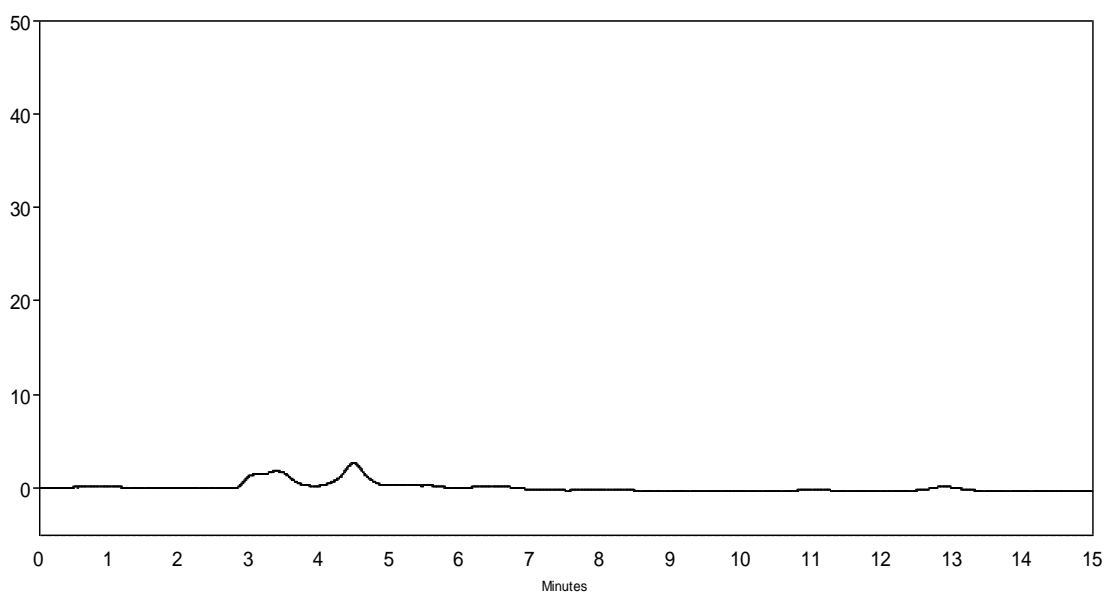
Cílem validace analytické metody je prokázat pomocí experimentálních dat a jejich matematického a statistického zpracování, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití a získané výsledky analýz jsou spolehlivé.

Vypracovaná metoda byla validována z hlediska parametrů selektivita, přesnost, správnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, robustnost.

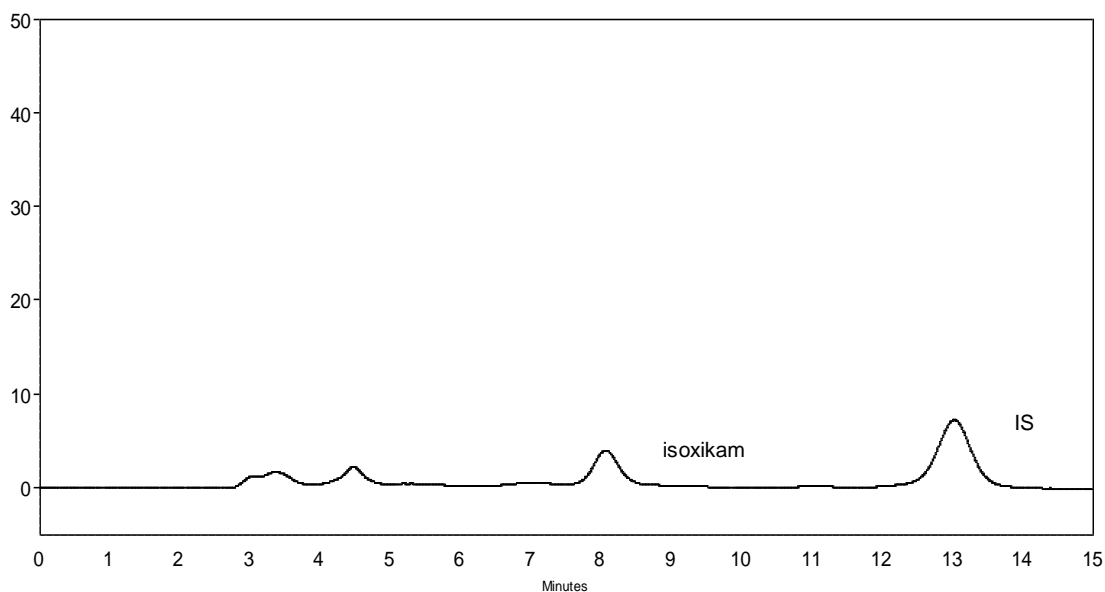
5. 6. 1. Selektivita

Pro ověření selektivity metody byly připraveny a analyzovány vzorky prázdné krve a krve s přidavkem isoxikamu a vnitřního standardu. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 4. 4.

chromatogramy



Obr. č. 12: HPLC chromatogram vzorku prázdné krve, upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3



Obr. č. 13: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 20 μg isoxikamu a 5 μg diflunisalu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Za použitých chromatografických podmínek byl retenční čas isoxikamu 8,2 minut a retenční čas vnitřního standardu 13 min. Biologický materiál se eluoval z kolony do páté minuty, jak potvrzuje chromatogram krve bez přídavku obou látek.

Z chromatografických záznamů je patrné, že žádný pík ze vzorku plné krve neinterferuje s píkem isoxikamu a ani s píkem vnitřního standardu.

5. 6. 2. Přesnost

Pro určení přesnosti bylo připraveno šest vzorků krve o stejné koncentraci isoxikamu. K jednomu mililitru plné krve bylo přidáno 200 μl isoxikamu o koncentraci 0,1 mg / ml a 200 μl diflunisalu o koncentraci 0,025 mg/ml (vnitřní standard). Vzorky byly upraveny postupem uvedeným v kapitole 4. 4.

isoxikam		plocha píku		poměr plochy píků	průměr
		isoxikam	IS	isoxikam / IS	
1. vzorek	1	183 665	409 698	0,4482936	0,466760
	2	192 713	407 280	0,4731708	
	3	205 327	423 179	0,4852013	
	4	184 786	405 248	0,4559825	
	5	197 667	413 429	0,4781160	
	6	188 342	409 622	0,4597946	
2. vzorek	1	185 482	405 354	0,4575803	0,461762
	2	179 655	404 638	0,4439894	
	3	186 249	403 973	0,4610432	
	4	180 821	399 618	0,4524846	
	5	201 174	423 215	0,4753471	
	6	202 182	421 099	0,4801294	
3. vzorek	1	183 199	403 399	0,4541385	0,451961
	2	189 681	408 511	0,4643229	
	3	175 176	401 087	0,4367531	
	4	188 160	411 238	0,4575453	
	5	179 466	398 596	0,4502454	
	6	178 548	397 871	0,4487585	
4. vzorek	1	189 630	414 187	0,4578353	0,479123
	2	198 176	420 802	0,4709483	
	3	207 871	418 060	0,4972277	
	4	193 539	415 550	0,4657418	
	5	206 094	411 358	0,5010089	
	6	198 018	410 849	0,4819727	
5. vzorek	1	187 016	412 497	0,4533754	0,465906
	2	183 889	409 894	0,4486257	
	3	181 497	410 125	0,4425407	
	4	201 902	419 187	0,4816514	
	5	197 005	411 208	0,4790884	
	6	199 912	407 853	0,4901570	
6. vzorek	1	186 926	398 653	0,4688914	0,473916
	2	198 929	418 375	0,4754801	
	3	195 392	406 863	0,4802402	
	4	191 808	405 870	0,4725848	
	5	184 712	401 736	0,4597845	
	6	206 957	425 385	0,4865169	

Tabulka 10: Údaje pro výpočet přesnosti – plochy píků a poměry ploch

Výpočet relativní směrodatné odchyly RSD:

$$\text{RSD} = 100 \cdot S_n / X \quad (\%)$$

S_n je směrodatná odchylna

X je průměr poměru ploch píků

vzorek	poměr ploch píků
1	0,4667598
2	0,4617623
3	0,4519606
4	0,4791227
5	0,4659064
6	0,4739163
aritmetický průměr	0,466571
směrodatná odchylna	0,009472
RSD %	2,0301

Tabulka 11: Údaje pro výpočet relativní směrodatné odchyly

Zjištěná relativní směrodatná odchylna byla 2,03%.

5. 6. 3. Správnost

Správnost je definována jako těsnost shody střední hodnoty velkého počtu výsledků zkoušek a známé referenční hodnoty.

Správnost byla testována na analýze šesti vzorků krve se stejnou koncentrací isoxikamu. Připravené vzorky krve o známé koncentraci isoxikamu byly hodnoceny vypracovaným postupem uvedeným v kapitole 4. 4.

isoxikam koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	průměr poměrů plochy píků	určená koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	určené množství (%)
	isoxikam / diflunisal		
20	0,466760	19,41	97,05
20	0,461762	19,23	96,14
20	0,451961	18,87	94,36
20	0,479123	19,86	99,30
20	0,465906	19,38	96,89
20	0,473916	19,67	98,35
průměr			97,02

Tabulka 12: Správnost– určené množství

Při analýze šesti vzorků krve o stejné koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ byla zjištěna koncentrace v rozmezí 94,4 % - 99,3 % přidaného množství isoxikamu.

5. 6. 4. Linearita

Linearita byla hodnocena v rozsahu 5 - 80 μg isoxikamu v 1 ml krve.

Rovnice kalibrační křivky je $y = 0,0275x - 0,067$. Korelační koeficient $r = 0,995$.

5. 6. 5. Detekční a kvantitativní limit

Detekční limit analytické metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nestanovované kvantitativně jako exaktní hodnota. Kvantitativní limit jednotlivé analytické metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být kvantifikováno s vyhovující přesností a správností.

Detekční a kvantitativní limit se vypočtou podle vzorců

$$\text{LOD} = 3 \cdot s_n \cdot K / b_1 \quad \text{LOQ} = 10 \cdot s_n \cdot K / b_1$$
$$S_n = (r^+ - r^-) / 5$$

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

S_n je směrodatná odchylka.

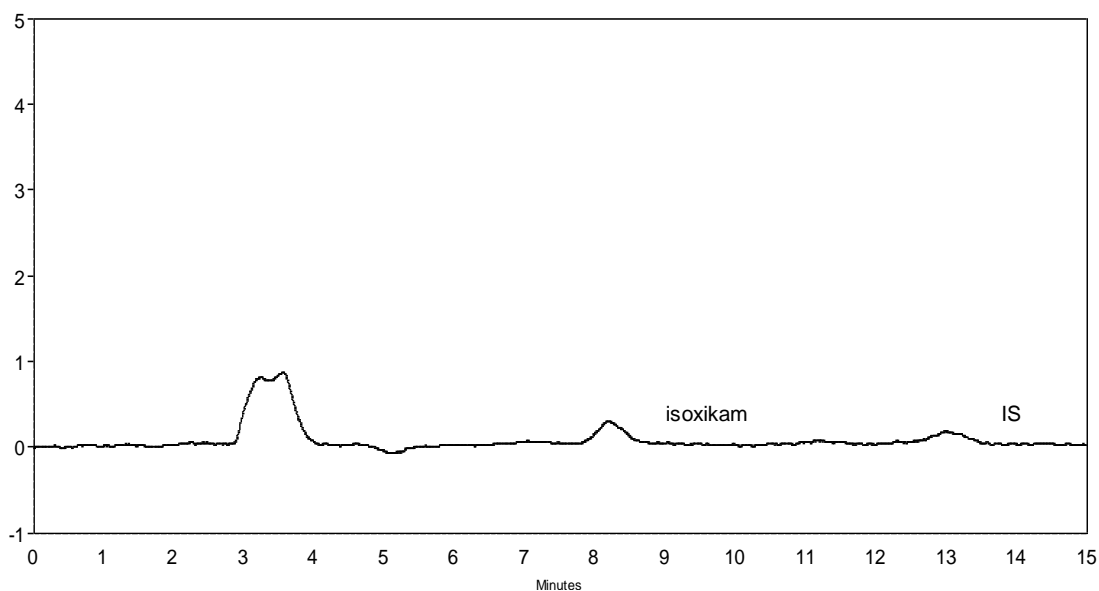
Pro isoxikam (i vnitřní standard) bylo vypočteno LOD a LOQ. Výška šumu baseline byla odečtena ze vzorku prázdné krve analyzované za uvedených chromatografických podmínek. Výška a plocha píků isoxikamu a diflunisu byla určena ze vzorku o koncentraci isoxikamu 10 $\mu\text{g/ml}$ a diflunisu 5 $\mu\text{g/ml}$.

	isoxikam	diflunisal
výška píku	1,292	5,897
výška šumu	0,015	0,015
S_n	0,003	0,003
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,0697	0,0076
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0,2322	0,0254

Tabulka 13: Údaje pro výpočet LOD a LOQ

Vypočtený detekční limit byl 0,0697 $\mu\text{g/ml}$ pro isoxikam a 0,0076 $\mu\text{g/ml}$ pro diflunisal. Kvantitativní limit 0,2322 $\mu\text{g/ml}$ pro isoxikam a 0,0254 $\mu\text{g/ml}$ pro diflunisal. Podle vypočtených limitů byly připraveny vzorky o uvedených koncentracích isoxikamu a diflunisu a analyzovány.

chromatogram



Obr. č. 14: HPLC chromatogram vzorku o koncentraci isoxikamu 0,07 $\mu\text{g/ml}$ a 0,0076 $\mu\text{g/ml}$ diflunisu (IS), chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Podle obr. č. 14 je zřejmé, že isoxikam je ještě kvantifikovatelný při koncentraci odpovídající detekčnímu limitu. Experimentálně zjištěná hodnota limitu detekce by byla ještě nižší než vypočtený limit 0,07 µg/ml.

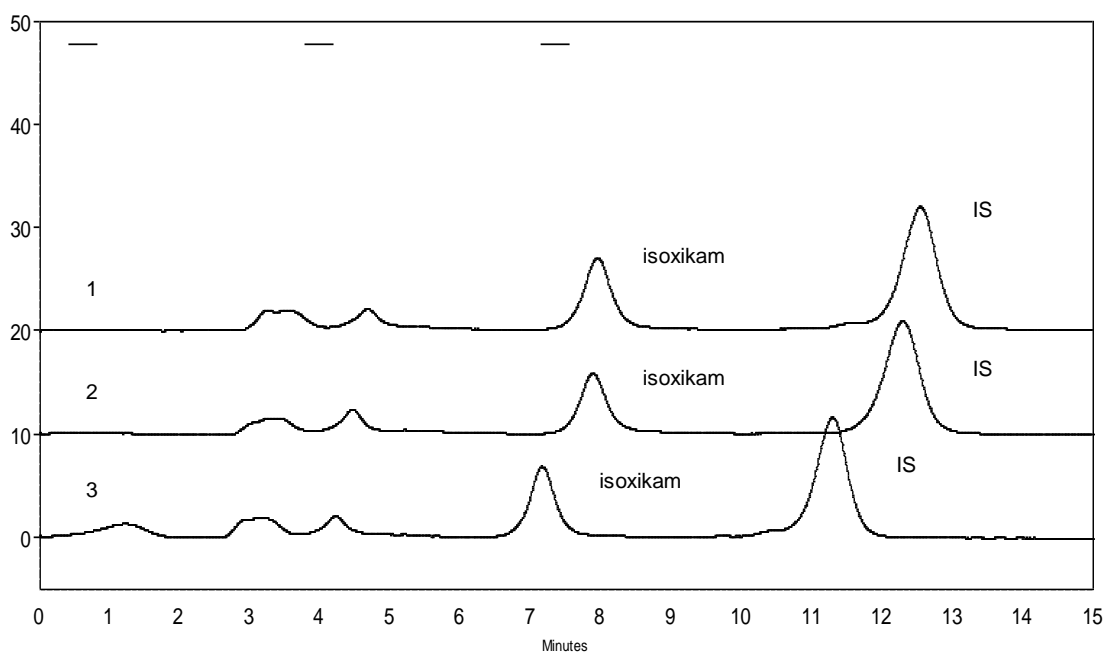
5. 6. 6. Robustnost

Robustnost je schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Udává její spolehlivost při běžném používání.

V rámci robustnosti metody byl sledován vliv změny pH mobilní fáze, změna poměru složek mobilní fáze a změna průtoku mobilní fáze na výsledek analýzy isoxikamu v plné krvi.

Jako mobilní fáze pro analýzu byla zvolena kys. fosforečná 0,1% – methanol (30 : 70) o pH 3,0. Průtok mobilní fáze chromatografem byl nastaven na 0,7 ml/min.

Úprava pH mobilní fáze



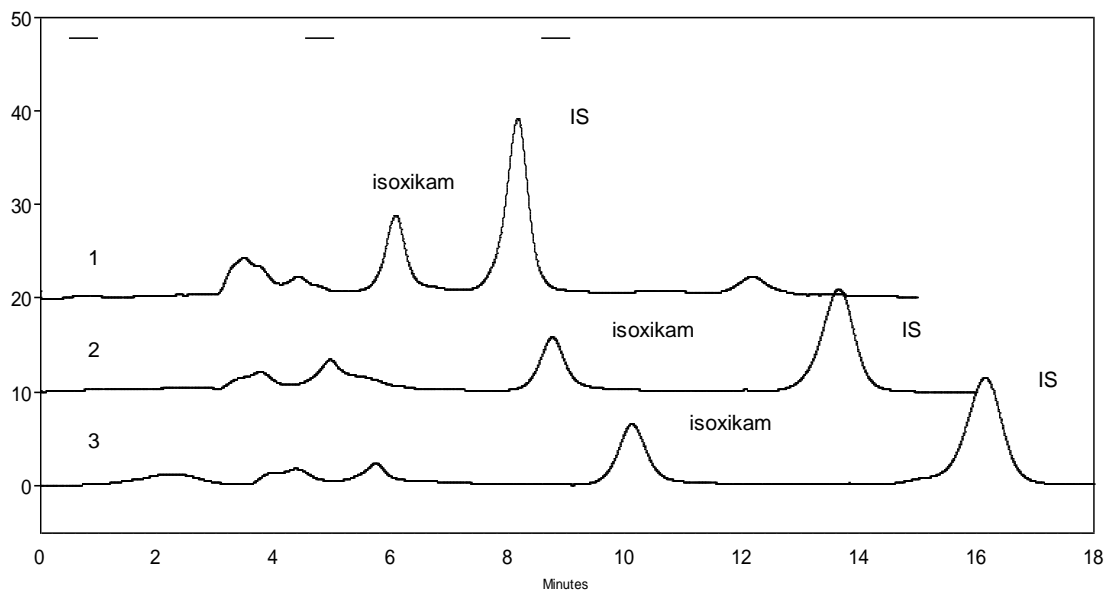
Obr. č. 15: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 20 µg isoxikamu a 5 µg difenhydraminu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

chromatogram č. 1: pH 2,9

chromatogram č. 2: pH 3,0

chromatogram č. 3: pH 3,2

Úprava složení mobilní fáze



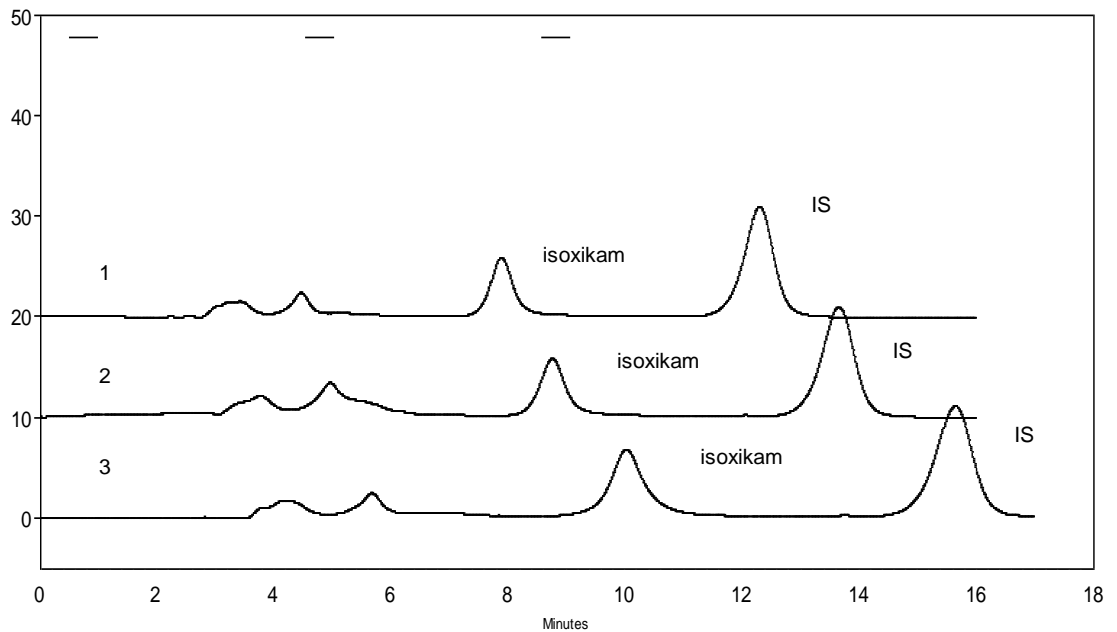
Obr. č. 16: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 20 μg isoxikamu a 5 μg diflunisalu(IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

chromatogram č. 1: methanol : kys. fosforečná 0,1% 75 : 25

chromatogram č. 2: metanol : kys. fosforečná 0,1% 70 : 30

chromatogram č. 3: metanol : kys. fosforečná 0,1% 65 : 35

Úprava průtoku mobilní fáze



Obr. č. 17: HPLC chromatogram vzorku isoxikamu z plné krve - 20 μg isoxikamu a 5 μg difenhydraminu (IS) - upraveného SPE extrakcí, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.3.

chromatogram č. 1: průtok 0,6 ml/min

chromatogram č. 2: průtok 0,7 ml/min

chromatogram č. 3: průtok 0,8 ml/min

Z experimentu vyplývá, že metoda je robustní a změny pH, složení a průtoku mobilní fáze nemají velký vliv na HPLC analýzu isoxikamu.

5. 6. 7 Souhrné zhodnocení validace metody

Validační parametr	Výsledek
selektivita	prokázána
přesnost	relativní směrodatná odchylka = 2,03 %
správnost	97,02 % (94,36 - 99,30%)
linearita	$y = 0,0275x - 0,067$, $r = 0,995$ lineární v rozsahu 5 – 80 µg/ml
detekční limit	0,07 µg/ml
kvantitativní limit	0,23 µg/ml
robustnost	metoda je robustní

Tabulka 14: Výsledky validačních parametrů isoxikamu

6. ZÁVĚR

Byla vypracována metoda pro HPLC analýzu isoxikamu ve vzorku plné krve pomocí solid - phase extrakce.

Byly zvoleny optimální chromatografické podmínky, které umožnily hodnotit léčivo s vnitřním standardem s využitím fluorimetrické detekce. Mobilní fází byla kys. fosforečná 0,1% - methanol (30:70), pH 3. Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min a dávkované množství vzorku 10 µl. Separace probíhala na analytické koloně Separon SGX C₁₈ 150 x 3,0 mm I.D. (7µm). Detekce byla realizována fluorimetrickým detektorem při excitační vlnové délce 335 nm a emisní vlnové délce 470 nm.

Jako vnitřní standard byl vybrán diflunisal s retenčním časem 13 minut.

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

Extrakční účinnost isoxikamu byla 70,8% a u diflunisalu byla 75,8%.

Byla sestrojena kalibrační křivka o rovnici $y = 0,0275x - 0,067$, $r = 0,995$. Kalibrační křivka byla ověřena analýzou čtyř vzorků o známé koncentraci isoxikamu. Vzorky byly upraveny SPE a analyzovány stejným způsobem jako vzorky kalibrační křivky. Při ověření kalibrační křivky bylo zjištěno 92,2% - 98,8% přidaného množství isoxikamu. Dále byla provedena analýza dvou modelových vzorků, u kterých byla plná krev s přídavkem isoxikamu zmrazena. Při analýze modelových vzorků bylo zjištěno 97,9% a 94,3 % přidaného množství isoxikamu. Zmrazení vzorku krve s isoxikamem před vlastní analýzou nemělo vliv na hodnocení isoxikamu.

Vypracovaná metoda byla validována, hodnoceny byly parametry selektivita, přesnost, správnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, robustnost.

7. LITERATURA

- 1) Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum Praha 2001
- 2) Churáček, J., Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, SNTL Praha 1985
- 3) Klouda, P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda Ostrava 2003
- 4) Český lékopis 2009, Grada Publishing Praha 2009
- 5) Holík, M.: Validace analytických metod, příručka, Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno 1995
- 6) Klíma, J., Grafnetterová J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii, Pokroky ve farmacii 7, Avicenum Praha 1987
- 7) Voříšek, V.: Kapalinová chromatografie v analytické toxikologii, ÚKBD LF UK a FN Hradec Králové, 2009
- 8) Čůta, F. a kol.: Instrumentální analýza, SNTL Praha 1986
- 9) Švec, F.: Monolitické stacionární fáze [online], Chem. Listy, 98, 232, 2004 [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_01.pdf
- 10) Sýkora, D., Tesařová, E., Vosmanská, M., Zvolánková, M.: Moderní stacionární fáze pro HPLC–RP [online], Chem. Listy, 190–199, 2007 [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190_199.pdf
- 11) Jandera, P.: Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC-současný stav a perspektivy [online], Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc
- 12) Jandera, P.: Hilic chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích [online], Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf
- 13) Snyder, L., Kirkland, J., Glajch, J.: Practical HPLC method developement, John Wiley and Sons, New York 1997
- 14) Holčapek, M.: Hmotnostní spektrometrie a její spojení se separačními technikami, Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, 2009
- 15) Hernychová, L.: Základy hmotnostní spektrometrie [online], Ústav molekulární patologie, FVZ UO Hradec Králové [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: www.pmfhk.cz/Prednasky/Zaklady_MS.pdf
- 16) Nováková, L.: Modernizace přístrojové techniky na poli chromatografických separačních metod, Katedra analytické chemie, Faf UK Hradec Králové, 2009
- 17) <http://www.hplc.cz> [cit. 20.9.2012]
- 18) Nobilis, M.: Příprava vzorku biologického materiálu k instrumentální analýze, Ústav experimentální biofarmacie, spol. prac. AV ČR a PRO. MED. CS Praha a.s., Hradec Králové 2007-8
- 19) Babjuk, J., Perlík F., Šídlo, Z.: Bioanalytika léků, Avicenum Praha 1990
- 20) Thurman T., Mills M. S.: Solid-phase extraction. Principles and practice, John Wiley and Sons, New York 1998
- 21) <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf> [cit. 20.9.2012]

- 22) Spégel, P., Schweitz, L., Nilsson, S.: Molecularly imprinted polymers [online], *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 37-38, 2002 [cit. 20.9.2012]. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/jj7yxn0ealbqe4n7/>
- 23) ICH – Q2A. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. Rockville: U. S. Department of Health and Human Services, 1995
- 24) Guideline on bioanalytical method validation. London: European Medicines Agency, 2011
- 25) Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J., Plzák, Z.: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. Praha: ČSKB ČLS JEP, 2010
- 26) ICH – Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996
- 27) Klimeš, J. a kol.: *Kontrola léčiv II*, Karolinum Praha 2004
- 28) Hartl, J. a kol.: *Farmaceutická chemie II*, Karolinum Praha 1994
- 29) Rezai, B., Mallakapour, S., Majidi, N.: Solid-phase molecularly imprinted pre-concentration and spectrophotometric determination of isoxicam in pharmaceuticals and human serum, *Talanta* 78, 418-423, 2009
- 30) Punith, R., Katrahalli, U., Kalanur, S., S., Jaldappagari, S.: Mechanistic and conformational studies on the interaction of anti-inflammatory drugs, isoxicam and tenoxicam with bovine serum albumin, *J. Lumin.* 130, 2052-2058, 2010
- 31) Nakamura, A., Nakashima, MN., Wada, M., Nakashima, K.: Semi-micro column HPLC of three oxycam non-steroidal anti-inflammatory drugs in human blood, *Bunseki Kagaku* 54, 755-760, 2005
- 32) Tamasi, G., Casorale, M., Magnani, A., Sega, A., Chiasserini, L.: New platinum-oxicam complexes as anti-cancer drugs. Synthesis, characterization, release studies from smart hydrogels, evaluation of reactivity with selected proteins and cytotoxic activity in vitro, *J. Inorganic Biochemistry* 104, 799-814, 2010
- 33) Cini, R., Tamasi, G., Defazio, S., Hursthouse, M.: Unusual coordinating behavior by three non-steroidal anti-inflammatory drugs from the oxycam family towards copper(II). Synthesis, X-ray structure for copper(II)-isoxicam, -meloxicam and cinnoxycam-derivate complexes and cytotoxic activity for a copper(II)-piroxicam complex, *J. Inorganic Biochemistry* 101, 1140-1152, 2007
- 34) Bartsch, H., Eiper, A., Habiger, K., Kopelent-Frank, H.: Comparison of analytical methods for investigating the stability of isoxicam, *J. Chromatogr. A* 846, 207-211, 1999
- 35) Ibrahim, H., Boyer, A., Bouajila, J., Couderc, F., Nepveu, F.: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 857, 59-66, 2007
- 36) Ji, H. Y., Lee, H. W., Kim, Y. H., Jeong, D. W., Lee, H. S.: Simultaneous determination of piroxicam, meloxicam and tenoxicam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 826, 214-219, 2005

- 37) Kim, Y. H., Ji, H. Y., Park, E. S., Chae, S. W., Lee, H. S.: Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of lornoxicam in human plasma, *Arch. Pharm. Res.* 30, 905-910, 2007
- 38) Sultan, M., Stecher, G., Stoggl, W. M., Bakry, R., Zaborski, P., Huck, C. W., El-Kousy, N. M., Bonn, G. K.: Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and biological samples by HPLC-UV-MS and micro-HPLC, *Curr. Med. Chem.* 12, 573-588, 2005
- 39) Joseph-Charles, J., Bertucat, M.: Simultaneous HPLC analysis of on-steroidal anti-inflammatory oxicams in pharmaceutical preparations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22, 2009-2021, 1999
- 40) Doliva, A., Santoyo, S., Campanero, M. A., Ygartua, P.: Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 26, 531-547, 2001
- 41) Rigato, H. M., Mendes, G. D., Borges, N. C., Moreno, R. A.: Meloxicam determination in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry in Brazilian bioequivalence studies, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 44, 489-498, 2006
- 42) Bartsch, H., Eiper, A., Kopelent-Frank, H.: Stability indicating assays for the determination of piroxicam – comparison methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 531-541, 1999
- 43) Escandar, G. M., Bystol A. J., Campiglia, A. D.: Spectrofluorimetric method for the determination of piroxicam and pyridoxine, *Anal. Chim. Acta* 466, 275-283, 2002
- 44) Mohamed, H. A., Wadood, H. M. A., Farghaly, O. A.: Potentiometric and spectrofluorimetric of tenoxicam with some methal ions, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 819-826, 2002
- 45) Damiani, P. C., Bearzoti, M., Cabezón, M., Olivieri, A. C.: Spectrofluorometric determination of piroxicam, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 17, 233-236, 1998
- 46) Marland, A., Sarkar, P., Leavitt, R.: The elimination profiles of tenoxicam and hydroxytenoxicam in equine urine and serum after a 200-mg oral dose, *J.Anal. Toxicol.* 23, 237-241, 1999
- 47) Yritia, M., Parra, P., Fernandez, J. M., Barbanoj, J. M.: Piroxicam quantitation in human plasma by high-performance liquid chromatography with on- and off-line solid phase extraction, *J. Chromatogr. A* 846, 199-205, 1999
- 48) Trávníčková, P.: HPLC analýza exogenních látek v krvi, bakalářská práce, FaF UK v Hradci Králové, 2008
- 49) Trávníčková, P.: Určení exogenních látek v krvi pomocí HPLC, diplomová práce, FaF UK v Hradci Králové, 2010
- 50) Ulrichová, M.: Analytické hodnocení antirevmatik kapalinovou chromatografií III, diplomová práce, FaF UK v Hradci Králové, 2000
- 51) Stará, J.: Analytické hodnocení antirevmatik kapalinovou chromatografií VI, diplomová práce, FaF UK v Hradci Králové, 2002

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát Mgr. Petra Pavelková

Konzultant Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Název rigorózní práce HPLC analýza isoxikamu v krvi s využitím fluorimetrické detekce

Tato rigorózní práce se zabývá problematikou HPLC analýzy isoxikamu ve vzorku plné krve. Vzorek isoxikamu byl upraven metodou solid – phase extrakce. Výsledné extrakty byly podrobeny HPLC analýze. Mobilní fází byla směs kys. fosforečná 0,1% - methanol (30 : 70), pH 3, analýza proběhla na koloně Separon SGX C₁₈ 150 x 3,0 mm I.D. (7µm). Detekce byla realizována fluorimetrickým detektorem při excitační vlnové délce 335 nm a emisní vlnové délce 470 nm. Jako vnitřní standard byl použit diflunisal. Byla sestrojena kalibrační křivka, ověření kalibračních křivek proběhlo pomocí čtyř vzorků o známé koncentraci. Dále byly analyzovány modelové vzorky. Byla provedena validace metody, hodnoceny byly parametry selektivita, přesnost, správnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, robustnost.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate Mgr. Petra Pavelková

Consultant Doc. RNDr. Jaroslav Sochor, CSc.

Title of Thesis HPLC analysis of isoxicam in blood with using fluorimetric detection

This thesis is engaged in HPLC analysis of isoxicam in whole blood. For sample pretreatment solid – phase extraction was used. The resulting extracts were subjected to HPLC analysis. The mobile phase used was a mixture of methanol - phosphoric acid 0.1% (70 : 30 v/v), pH 3. The separation was performed on column Separon SGX C₁₈ 150 x 3,0 mm I.D. (7µm). Fluorimetric detection was set at excitation wavelenght 335 nm and emission wavelenght 470 nm. Diflunisal was used as internal standard. Calibration curve was constructed and verified with four samples. Then model samples were analysed. The method has been validated in respect of specificity, precision, accuracy, linearity, limit of detection, limit of quantification, and robustness.