

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**Validace HPLC metody stanovení piroxikamu
v plasmě s využitím SPME a deproteinace**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

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

V Hradci Králové 20. ledna 2015

Mgr. Kristýna Kuželová

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při vypracování rigorózní práce. Dále bych poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícné jednání a pomoc.

Tato práce byla vypracována za podpory SVV 260062.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíl.....	9
3. Teoretická část.....	11
3.1. Charakteristika piroxikamu	12
3.2. Úprava biologického vzorku	14
3.2.1. Deproteinace	14
3.2.2. Extrakce organickými rozpouštědly	16
3.2.3. Mikroextrakce kapalnou fází	17
3.2.4. Mikroextrakce využívající duté vlákno	18
3.2.5. Superkritická fluidní extrakce.....	19
3.2.6. Extrakce na pevné fázi.....	19
3.2.7. Mikroextrakce na pevné fázi.....	21
3.2.8. Technika přepínání kolon	25
3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	26
3.3.1. Princip HPLC.....	26
3.3.2. Instrumentace HPLC.....	28
3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní analýza	29
3.4. Validace analytických metod.....	31
3.4.1. Selektivita	32
3.4.2. Správnost.....	32
3.4.3. Přesnost	32
3.4.4. Extrakční účinnost	33
3.4.5. Linearita	33
3.4.6. Stabilita	33
3.4.7 Robustnost.....	34

4. Experimentální část	35
4.1. Chemikálie a pomůcky	36
4.1.1. Chemikálie	36
4.1.2. Sestava pro HPLC	36
4.1.3. Přístroje	36
4.1.4. Pomůcky	37
4.2. Příprava roztoků	37
4.2.1. Příprava vzorku plasmy	37
4.2.2. Příprava standardů	37
4.2.3. Příprava mobilní fáze	38
4.2.4. Příprava vzorku pro SPME	38
4.2.5. Příprava vzorku pro precipitaci methanolem	39
4.2.6. Příprava vzorku pro precipitaci acetonitrilem	39
4.2.7. Příprava vzorku pro precipitaci kyselinou trichloroctovou	39
4.2.8. Příprava vzorku pro precipitaci kyselinou chloristou	39
4.3. Chromatografické podmínky	40
4.4. Provedení mikroextrakce vláknem	40
4.5. Provedení precipitace	40
5. Výsledky a diskuze	41
5.1. Změna parametrů SPME	42
5.1.1. Změna času sorpce a desorpce	42
5.2. Validace SPME	43
5.2.1. Selektivita	43
5.2.2. Limit detekce a kvantifikace	44
5.2.3. Extrakční účinnost	45
5.2.4. Správnost	46
5.2.5. Přesnost	47

5.2.6. Linearita	49
5.2.7. Stabilita	51
5.2.8. Souhrné zhodnocení validace SPME piroxikamu z plasmy	52
5.3. Optimalizace podmínek pro precipitaci.....	53
5.4. Validace precipitace	55
5.4.1. Selektivita	55
5.4.2. Limit detekce a kvantifikace	56
5.4.3. Extrakční účinnost	57
5.4.4. Správnost.....	58
5.4.5. Přesnost	59
5.4.6. Linearita	61
5.4.7. Souhrné zhodnocení validace precipitace plasmy	63
6. Závěr.....	64
7. Literatura	67

1. Úvod

Bioanalýza léčiv patří mezi rychle se rozvíjející odvětví farmacie. Spočívá v identifikaci a stanovení léčiv samotných i jejich metabolitů ve složitém biologickém vzorku, jako je např. krev, plasma, moč, pot nebo vlasy. Bioanalýza léčiv je využívána ve farmakokinetických studiích, metabolických studiích, bioekvivalenčních studiích nebo např. v toxikologii.

Při analýze léčiv je důležité nejdříve izolovat léčivo ze složité biologické matrice. Mezi nejčastěji používané metody extrakce léčiv a jejich metabolitů patří deproteinace, extrakce do organických rozpouštědel a extrakce na pevných fázích. Současným trendem je miniaturizace a automatizace těchto metod, protože jsou pak šetrnější k životnímu prostředí a mají nižší spotřebu organických rozpouštědel.

Extrahované léčivo se stanovuje pomocí instrumentálně-analytických metod. Mezi nejčastěji používané metody se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Je to díky tomu, že umožňuje současně kvalitativní i kvantitativní analýzu léčiva. Je to vysoce citlivá a selektivní metoda. Její výhodou je rychlost analýzy a možnost automatizace.

Validací se ověřuje správnost vyvinuté metody. Mezi validační parametry patří např. selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, linearita, detekční a kvantitativní limit, stabilita analytu ve vzorku a robustnost.

2. Cíl

Cílem rigorózní práce je validace SPME piroxikamu z krevní plasmy s následnou analýzou pomocí HPLC. Metoda již byla vyvinuta v předešlé práci³⁰. Byly sledovány tyto validační parametry - selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, detekční a kvantitativní limit, linearita a stabilita.

Dále byly vyvinuty, optimalizovány a validovány podmínky deproteinace plasmy s následnou analýzou supernatantu s piroxikamem pomocí HPLC. Validacími parametry byla selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, detekční a kvantitativní limit a linearita.

Na závěr byly obě bioanalytické metody porovnány a zhodnoceny.

3. Teoretická část

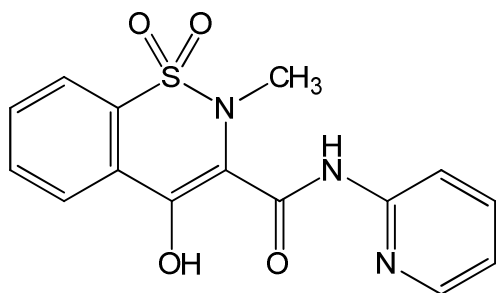
3.1. Charakteristika piroxikamu

Lékopisný název: Piroxicamum

Chemický název: 4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-*N*-(pyridin-2-yl)-1,2-dihydro-1λ⁶,2-benzothiazin-3-karbox-amid

Sumární vzorec: C₁₅H₁₃N₃O₄S

Strukturní vzorec:



Fyzikálně chemické vlastnosti:

Vzhled: Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek

Molekulová hmotnost: 331,35

pKa: 6,3

Rozpustnost: Nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v bezvodém ethanolu¹

Farmakologické vlastnosti

Farmakoterapeutická skupina: nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva

Indikace: symptomatická léčba osteoartrózy, revmatoidní artritidy, ankylozující spondylitidy

Maximální denní dávka: 40 mg

Doporučená denní dávka: 20 mg

Rovnovážná koncentrace v plasmě: 3 - 7 µg/ml po perorálním podání za 5 - 10 dnů

Vaznost na plazmatické bílkoviny: 98%

Metabolismus: biotransformace v játrech a vylučování převážně ledvinami a částečně i žlučí

Použití: tablety, šumivé tablety, tvrdé tobolky, granule^{1,2}

Mechanismus účinku: inhibice cyklooxygenázy I, která umožňuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostanoidy, tromboxan a prostaglandiny. Ty se účastní zánětlivých pochodů a procesů vyvolávající horečku a bolest, ale také např. zvyšují prokrvení ledvin a stimuluji produkci žaludečního hlenu.³

3.2. Úprava biologického vzorku

Úprava vzorku před vlastním stanovením látky pomocí HPLC je velmi důležitý krok celé analýzy biologického materiálu. Biologický materiál obsahuje mnoho endogenních látek, které jsou ve vysoké koncentraci a mohou významně narušit záznam stanovení, proto je nutno tyto látky ze vzorku odstranit. Cílem úpravy vzorku je izolovat čistý analyt od interferujících endogenních látek, rozpustit ho ve vhodném rozpouštědle a zakonzentrovat ho.

Izolace léčiva z biologického materiálu je celkem časově náročná a zabírá až 50-70% času z celkového času analýzy. Přesto je to krok nezbytný. Optimální izolační technika poskytuje kvantitativní výtěžnost a skládá se z co nejméně kroků úpravy vzorku.

Mezi běžně používané izolační techniky patří deproteinace, extrakce organickými rozpouštědly, extrakce na tuhé fázi a mikroextrakce na tuhé fázi.⁴

3.2.1. Deproteinace

Deproteinace je jednoduchá metoda extrakce analytu z biologického materiálu. Mechanismus deproteinace je založen na přeměně rozpustných bílkovin na nerozpustné, tzn. precipitaci. Tento precipitát se dále centrifuguje při vysoké rychlosti po určitou dobu. Precipitované složky plasmy klesnou na dno zkumavky a čistý tekutý supernatant lze jednoduše odebrat. Supernatant může být rovnou nastříknut na chromatografickou kolonu nebo se může nechat odpařit a následně rekonstituovat mobilní fází. Nevýhodou je přítomnost dalších endogenních látek v supernatantu, které mohou ovlivnit výsledek stanovení.⁴

Při deproteinaci biologického materiálu musí být splněny tyto podmínky:

- úplné odstranění bílkovin
- vzniklý precipitát na svůj povrch neadsorbuje sledovaný analyt
- deproteinační činidlo nepůsobí na sledovaný analyt, neinterferuje s analytem při detekci a neovlivňuje analytickou výtěžnost⁵

Deproteinaci lze rozdělit na precipitační, enzymovou a ultrafiltraci.

Precipitační deproteinace

Při precipitaci dochází ke vzniku nových interakcí mezi molekulami bílkovin. Vznikají nové vazby na povrchu bílkovin. Uplatňují se zde především elektrostatické, hydrofóbní a van der Waalsovy síly. K precipitaci může dojít přidáním:

- organických rozpouštědel mísitelných s vodou - ethanol, methanol, aceton, acetonitril
- silných anorganických kyselin - kyselina trichloroctová, chloristá, koncentrovaná chlorovodíková, trifluoroctová
- solí těžkých kovů - síran zinečnatý, wolfram sodný
- síranu amonného - musí vzniknout saturovaný roztok
- kombinací precipitačních roztoků

K precipitaci dochází i působením tepla, ale tato metoda není kvantitativní a může docházet i k narušení struktury analytu.⁴

Enzymová deproteinace

Při enzymové deproteinaci dochází ke vzniku sraženiny pomocí proteolytických enzymů. Používá se trypsin a subtilisin.⁵

Ultrafiltrace

Ultrafiltrace je založena na oddělování molekul bílkovin od rozpuštěných látek v plasmě na ultrafiltrační membráně. Tato membrána má velikost pórů od 1 do 50 nm. Těmito póry neprojdou molekuly bílkovin a další makromolekuly o velikosti od 1 do 1 000 kDa. Membránou projde pouze kapalina a látky v ní rozpuštěné, včetně analyzované exogenní látky.⁶

Separaci na membráně lze urychlit sáním pod membránou (vakuová ultrafiltrace) nebo působením tlaku na filtrovanou soustavu (tlaková ultrafiltrace).⁷

Mezi výhody ultrafiltrace patří nepřítomnost dalších rozpouštědel a tím nedochází ke zředění analytu.⁵

3.2.2. Extrakce organickými rozpouštědly

Extrakce analytu do kapaliny (liquid - liquid extraction, LLE) je založena na distribuci sledované látky mezi dvěma nemísitelnými kapalinami - fázemi. Většinou jedna z fází je vodná a druhá je ve vodě nemísitelné organické rozpouštědlo.

Při extrakci organickými rozpouštědly se nejdříve k biologickému vzorku přidá dané organické rozpouštědlo. Následuje třepání, centrifugace a odebrání supernatantu, ve kterém je rozpuštěna sledovaná látka. Nadbytečné rozpouštědlo se odpaří proudem dusíku. Zbytek po odpaření je rekonstituován malým množstvím určitého rozpouštědla, např. mobilní fází. Extrakce může být pak ještě několikrát opakována k dosažení úplné separace.

Extrakce analytu z vodné do organické fáze záleží především na těchto faktorech:

- rozpustnost analytu v organickém rozpouštědle
- polarita organického rozpouštědla
- pH vodné fáze

Distribuce mezi dvěma kapalinami je charakterizována Nerstovou distribuční konstantou K_D :

$$K_D = \frac{\text{koncentrace analytu v organické fázi}}{\text{koncentrace analytu ve vodné fázi}}$$

Možnosti zvýšení výtěžnosti extrakce a tím i hodnoty K_D :

- použití organického rozpouštědla, ve kterém je nejvíce rozpustný analyt
- pokud je analyt v iontové formě, potlačit tuto ionizaci, aby byl více rozpustný v organické fázi nebo může být extrahován použitím iontového páru
- kovové ionty umožní vznik komplexu s hydrofóbními látkami
- vysolování sníží koncentraci analytu ve vodné fázi

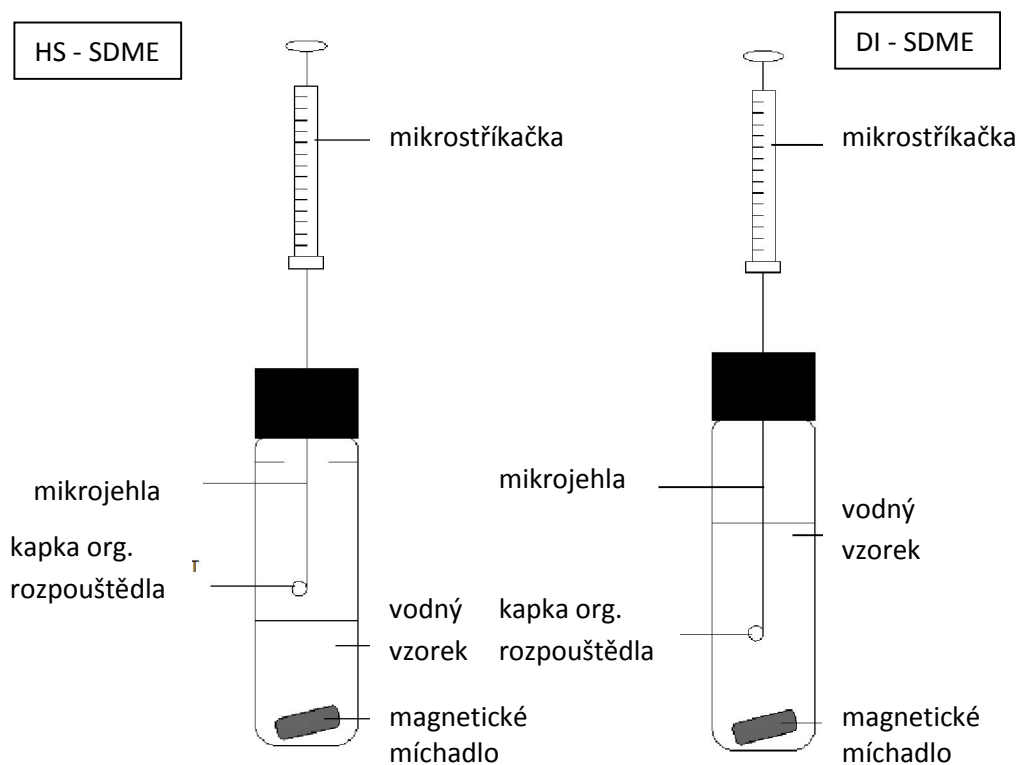
LLE je jednoduchá a relativně levná technika extrakce. Mezi její nevýhody patří velká spotřeba rozpouštědel, časová náročnost a možný vznik emulzí.⁴

3.2.3. Mikroextrakce kapalnou fází

Mikroextrakce kapalnou fází (single drop microextraction, SDME) je vlastně miniaturizací extrakce mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Analyt je extrahován do malé kapky organického rozpouštědla o objemu několika mikrolitrů, která je zavěšena na špičce mikrojekly. Tato kapka visí nad hladinou vzorku (head-space, HS-SDME) nebo je přímo ponořena do roztoku vzorku (direct immersion, DI-SDME).^{8,10}

Výtěžnost SDME je ovlivněna mnoha faktory, např. časem extrakce, fyzikálními a chemickými vlastnostmi rozpouštědla, velikostí kapky, objemem vzorku, teplotou a iontovou silou roztoku.⁹

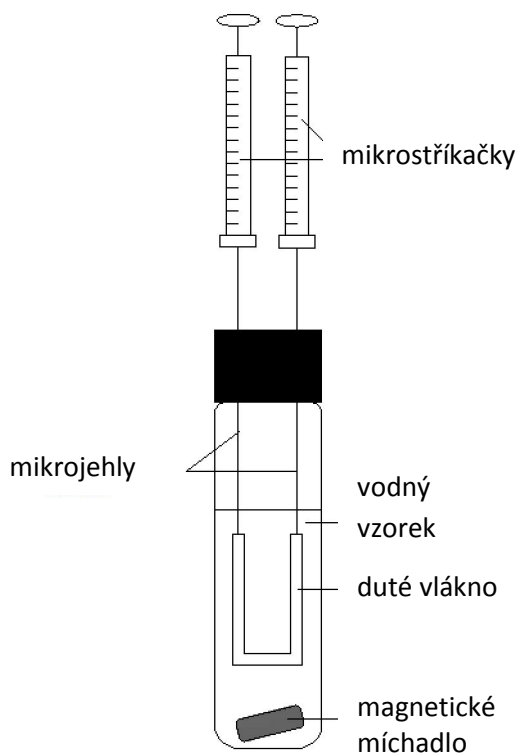
SDME je velmi snadná, levná a rychlá metoda, při které dochází rovnou ke zakoncentrování analytu. Není zde potřeba velká množství rozpouštědla a odpadá zde proces desorpce analytu z extrakční fáze. Naopak nevýhodou je snadná destrukce kapky rozpouštědla. Tato metoda se používá v kombinaci s plynovou nebo kapalinovou chromatografií.^{8,9,10}



Obr. č. 1: SDME - mikroextrakce kapalnou fází¹⁰

3.2.4. Mikroextrakce využívající duté vlákno

Vzhledem ke snadné destrukci mikrokapky při SDME byla tato mikroextrakce modifikována v mikroextrakci kapalnou fází využívající duté vlákno (hollow-fibre liquid-phase microextraction, HF-LPME). Tato metoda využívá porézní kapilární vlákno zavěšené na konci jedné nebo dvou jehel. Před samotnou extrakcí je vlákno ponořeno do organického rozpouštědla, aby se organická fáze nasorbovala do pórů kapilárního vlákna. Poté je vlákno ponořeno do vzorku. K urychlení extrakce je možno vzorek míchat. Po extrakci je analyt z kapilárního vlákna nasán do stříkačky.¹⁰



Obr. č. 2: HF-LPME - mikroextrakce kapalnou fází využívající duté vlákno¹⁰

3.2.5. Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (SFE) je extrakční metoda využívající superkritickou kapalinu k oddělení analytu od matrice vzorku. Jako superkritická kapalina se nejčastěji používá oxid uhličitý při 31°C a tlaku 7,4 MPa. Při těchto podmínkách má oxid uhličitý některé vlastnosti jako kapalina a některé jako plyn. Patří mezi ně schopnost rozpouštět látky (jako kapaliny) a schopnost difundovat do porézních materiálů (jako plyny).

Systém pro superkritickou fluidní extrakci obsahuje pumpy, které pohánějí kapalinu a udržují stálý tlak. Jímí je kapalina poháněna do zahřívací zóny, kde je zahřáta na superkritickou teplotu. Dále prochází extrakční celou, kde difunduje do pevné matrice a rozpouští analyzovanou látku. Rozpuštěná analyzovaná látka je odplavena do separátoru. Poté je oxid uhličitý ochlazen, sníží se tlak a může být znovu použit pro další extrakci.

Superkritická fluidní extrakce je metoda rychlá (extrakce trvá většinou od 10-60 minut), selektivní a šetrná k životnímu prostředí. Také lze SFE použít ve spojení on-line s chromatografickým systémem, např. s plynovým chromatografem s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru.^{11,12}

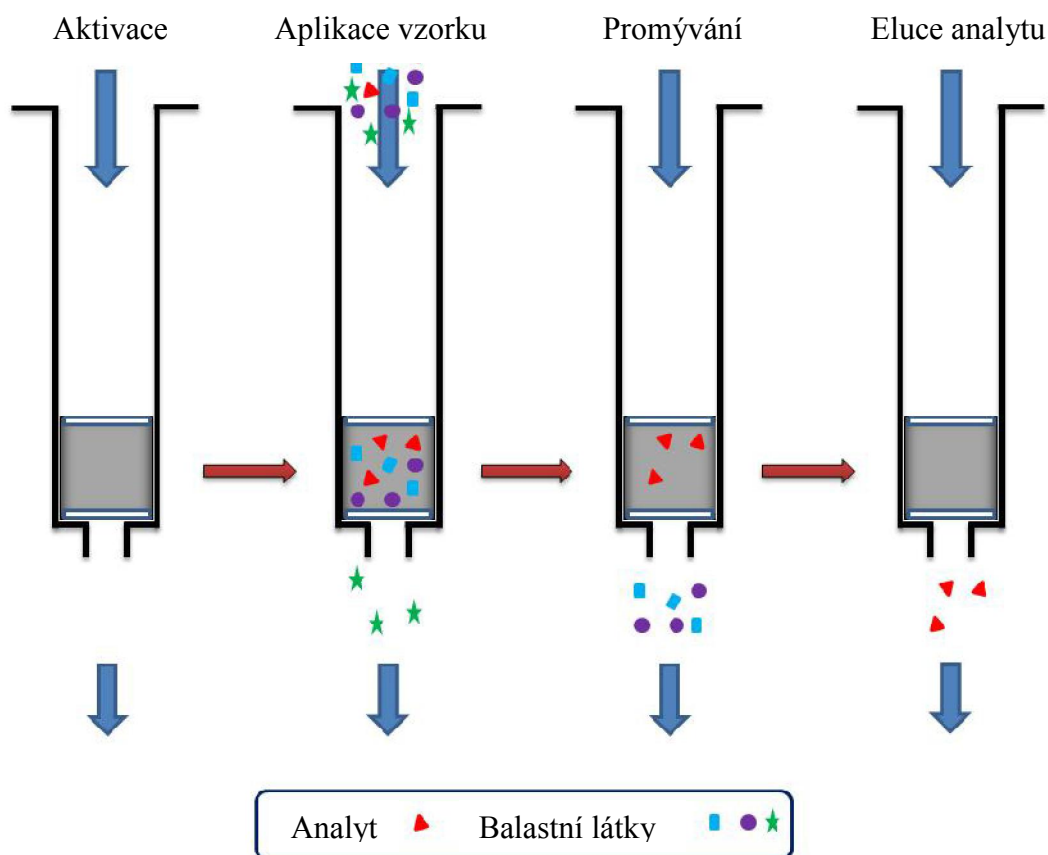
3.2.6. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) je často používaná metoda izolace látek z kapalných biologických vzorků. Její velkou výhodou je malá spotřeba organických rozpouštědel a zakoncentrování analytu už při extrakci.¹³

Mechanismem SPE je sorpce analytu na pevnou fázi z fáze kapalné, ve které je rozpuštěn. Vznikající intermolekulární interakce mezi pevnou fází a analytem musí být silnější než původní interakce s kapalnou fází. Tato sorpce analytu závisí na selektivitě pevné fáze a relativní interakční síle.⁴

Při extrakci na pevné fázi je nutné nejdříve připravit vzorek na extrakci, což zahrnuje možnou úpravu pH, zředění vzorku nebo filtraci, která zabrání ucpání extrakční kolonky. Dále je nutno extrakční kolonku aktivovat vhodným rozpouštědlem. Dochází tak k solvataci funkčních skupin, které pak reagují s analyzovanou látkou. Nyní je možno aplikovat vzorek. V extrakční kolonce je na vhodném sorbentu zachycen analyt, ale i některé balastní látky, které jsou následovně vymyty vhodným rozpouštědlem či vodným roztokem. Sledovaný analyt je pak

eluován vhodným rozpouštědlem nebo pufrem. Aplikaci vzorku a následné vymývání lze urychlit podtlakem pod extrakční kolonkou pomocí vakua.¹³



Obr. č. 3: Schématické znázornění SPE¹³

Pro dosažení selektivity extrakce na tuhé fázi je důležité vybrat vhodný sorbent. Tento výběr závisí na mechanismu interakce mezi sorbentem a analyzovanou látkou. Sorbenty používané v extrakčních kolonkách lze rozdělit na:

- sorbenty s navázanou reverzní fází - na polárním nosiči, např. silikagelu, jsou navázány nepolární funkční skupiny (C8, C18, fenylová nebo kyanopropylová)
- normální fáze - většinou nemodifikovaný silikagel, kde dochází k interakcím mezi polárními funkčními skupinami
- iontoměniče - jsou používány u analytů v iontovém stavu (anionty jsou sorbovány obvykle díky kvartérní amonné skupině a kationty sulfonovými skupinami, tyto funkční skupiny jsou nejčastěji navázány na silikagelovém povrchu)

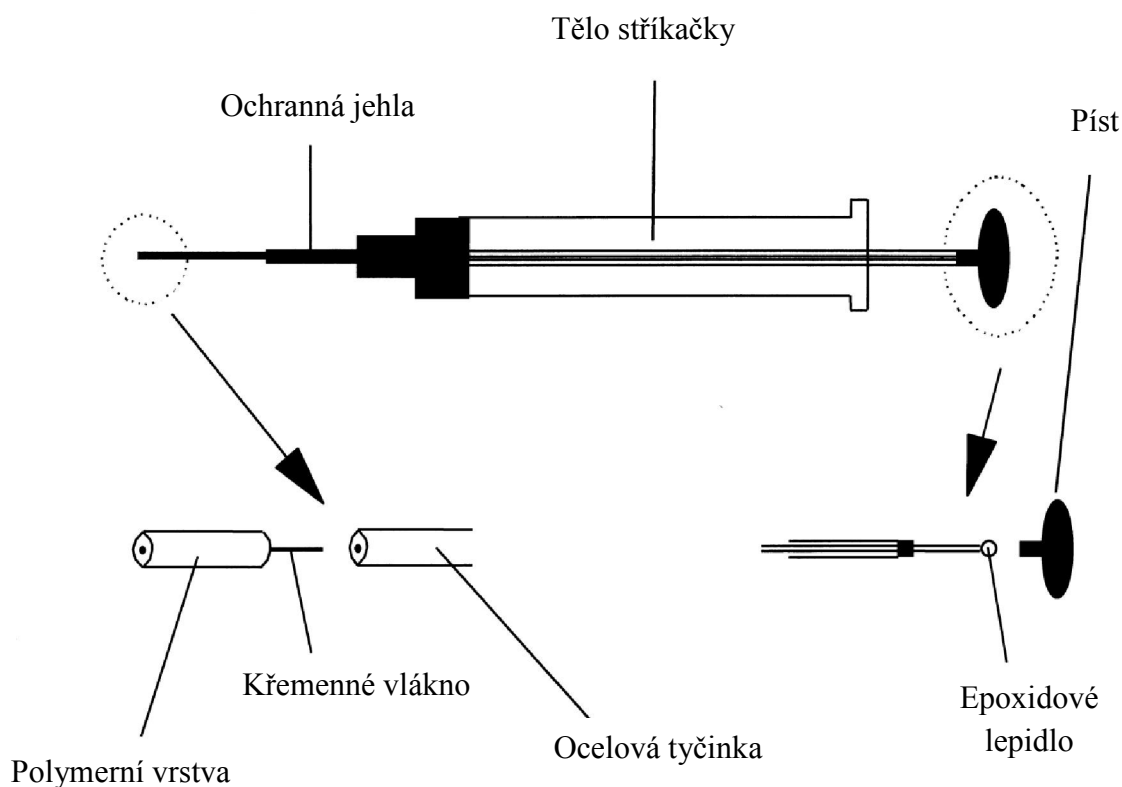
- imunosorbenty - vysoce selektivní sorbenty složené ze silikagelu, který má na povrchu navázané protilátky
- MIPs sorbenty - polymery s otiskem molekuly jsou vysoce selektivní a jsou vyráběny kopolymerací cílové molekuly s makromolekulární matricí
- RAM sorbenty - sorbenty mající vnější hydrofilní a vnitřní hydrofóbní povrchy, které obsahují póry zabraňující vstupu velkých molekul balastních látek do vnitřní fáze

Extrakce na pevné fázi je vysoce účinná separační metoda dosahující vysoké výtěžnosti i při použití malého množství sorbentu v kolonce, proto je hojně využívána v laboratořích a stále jsou vyvíjeny nové sorbenty. SPE lze plně automatizovat.^{4,13,14}

3.2.7. Mikroextrakce na pevné fázi

Mikroextrakce na pevné fázi (solid phase microextraction, SPME) je jednoduchá sorpčně-desorpční technika. Byla vyvinuta C. Arthurem a J. Pawliszem roku 1990. Nejdříve byla používána pro extrakci organického znečištění ze vzorků vody. Nyní se SPME využívá i při extrakci z biologických materiálů, např. plné krve, plasmy, moči nebo vlasů.^{15,16,17}

Celá mikroextrakce na pevné fázi se uskutečňuje na zhruba jednocentimetrovém křemenném vláknu, které je potaženo organickým polymerem. Vlákno je uschováno v jehle napojené na píst. Tím je vlákno chráněno před mechanickým poškozením, protože je velmi křehké. Jehla také slouží k propíchnutí septa zkumavky. Při extrakci je vlákno vytaženo z jehly pomocí pístu. Při head-space extrakci se nechá vlákno nad hladinou vzorku nebo ho lze přímo ponořit do kapalného vzorku (direct immersion). Analyt se sorbuje do polymerní vrstvy vlákna do dosažení rovnovážného stavu (na rozdíl od ostatních extrakčních metod), proto má SPME nízkou extrakční výtěžnost. SPME je vysoce selektivní metoda, proto je nutné vybrat vhodný polymer pro extrakci daného analytu. Při mikroextrakci též platí pravidlo „podobné se rozpouští v podobném“. Důležitým parametrem při extrakci je též čas sorpce a desorpce. Obvykle se sorpční čas pohybuje mezi 15 a 20 minutami. Většinou je doba sorpce při head-space SPME kratší než při přímém ponoření vlákna do kapalného vzorku a to díky rychlejší difúzi molekul analytu v plynné fázi.¹⁷



Obr. č. 4: Schéma zařízení pro SPME¹⁵

SPME je přesná a reprodukovatelná metoda pro kvantitativní stanovení analytů v různých vzorcích, protože je dokázán lineární vztah mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím analytu, který se nasorbuje na SPME vlákno. Tento vztah je vyjádřen následující rovnicí:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

kde n = množství analytu, které se nasorbuje na vlákno

C_o = počáteční koncentrace analytu ve vzorku

K_{fs} = rozdělovací koeficient analytu mezi polymerem a vzorkem

V_f = objem polymerního sorbentu na vlákne

V_s = celkový objem vzorku¹⁸

Postup při SPME

Nejprve ochranná jehla propíchně septum vialky se vzorkem, poté se z jehly vysune vlákno. Při extrakci látek vyskytujících se převážně v kapalném stavu je výhodnější ponořit vlákno přímo do kapalného vzorku (direct immersion SPME). Látky vyskytující se v prostoru nad hladinou vzorku je vhodné nechat analyt sorbovat na vlákno, které je též nad hladinou vzorku (head-space SPME). Nyní se analyt sorbuje na vlákno po určitý extrakční čas. Aby byla SPME přesná a reprodukovatelná metoda, musí být při extrakcích zachovány konstantní podmínky, např. doba sorpce, množství vzorku přidávaného do vialek o stejné velikosti, rychlost míchání vzorku a hloubka ponoru vlákna do vzorku. Po dosažení sorpční rovnováhy je vlákno zataženo zpět do jehly a vytaženo z vialky. Poté se nechá analyt tepelně desorbovat v injektoru plynového chromatografu a je nesen proudem mobilní fáze na GC kolonu. Při analýze pomocí HPLC je analyt desorbován z vlákna do vhodného rozpouštědla nebo do mobilní fáze. Vzniklý roztok se vstřikuje přímo do HPLC systému, kde je analyzován nebo je vzorek dále upravován před vlastní analýzou.¹⁷

Možnosti ovlivnění sorpce

V biologických vzorcích se většinou analyty vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, proto je snaha zvýšit výtěžnost extrakce. Změna některých faktorů při SPME vede k ovlivnění výtěžnosti. Nejčastěji jsou využívány tyto faktory:

- Výběr typu vlákna - polarita vlákna, jeho porozita a specifický povrch
- Provedení extrakce - head-space SPME u plyných analytů a direct immersion SPME u kapalných analytů
- Doba extrakce - výtěžnost je přímo úměrná času extrakce, ale obvykle se nechá analyt extrahovat jen 15 - 20 minut, protože po delším času už není nárůst výtěžnosti tak vysoký
- Míchání vzorku - díky urychlení pohybu molekul ve vzorku se zkracuje čas extrakce a dochází ke zvýšení výtěžnosti
- Zahřívání - zvýšená teplota též urychluje pohyb molekul a odpařování analytu ze vzorku (využití především u head-space SPME). Bohužel zvýšená teplota urychluje i desorpci analytu z vlákna, proto by bylo ideální při zahřívání vzorku zároveň ochlazovat vlákno.

- pH vzorku - analyt je na vlákno sorbován v neiontovém stavu, proto okyselením vzorku se více extrahují kyselé analyty a bazické naopak
- Vysolování - přidáním solí (např. síran amonný, chlorid sodný, uhličitan draselný a hydrogenuhličitan sodný) do vzorku se zvýší jeho iontová síla a dojde ke snížení rozpustnosti analytu, proto se zvýší výtěžnost extrakce^{16,17}

Využití SPME

Použití SPME neustále roste. Za posledních deset let vzrostl počet jejího využití z asi 10 na 300. SPME se využívá v mnoha vědeckých a technických disciplínách.

Mezi jedny z nejdůležitějších použití se řadí analýza exogenních a endogenních látek v biologickém vzorku. Pomocí SPME lze látky analyzovat ze séra, plasmy, plné krve, mléka, moči, slin a i z vlasů. Ve farmacii se extrahují léčiva z biologické matrice k získání co nejvíce informací o terapeutických a toxických dávkách těchto léčiv. Díky tomu můžeme používat stále bezpečnější a více účinná léčiva. Ve farmakokinetických studiích a terapeutickém monitorování léčiv se hojně využívá kvalitativní a kvantitativní analýza léčiv a jejich metabolitů. Dále se SPME využívá i při stanovení návykových a jedovatých látek v klinické a forenzní toxikologii.

V posledních letech byla vyvíjena metoda monitorování koncentrace léčiv přímo v živých organismech. Výhodou in vivo techniky je eliminace vzniku chyb a redukce času, protože není nutno daný vzorek přenášet a dále uchovávat. Proto je daná technika přesnější. Ale velkou nevýhodou in vivo metody je velmi nízká a stále měnící se koncentrace analytu v živém organismu. Nejdříve se SPME používala při extrakci látek z bakterií, hub nebo hmyzu. Nyní se už dá využít i u rostlin a obratlovců. V živém systému je vlákno se sorbentem umístěno v kanyle, která je napojena na krevní oběh živočicha. Krev pak protéká přes kanylu a analyt je sorbován na vlákno, aniž by hrozilo poškození vlákna v kanyle.^{19,20}

SPME se dá také využít při analýze potravin. Potraviny jsou složitá směs vody, proteinů, lipidů, sacharidů a dalších látek, proto díky své selektivitě je SPME využívána i v tomto odvětví. V potravinách se pomocí SPME stanovují např. pesticidy.

Další využití SPME je monitorování čistoty životního prostředí. Hojně se používá při sledování znečištění vody.

SPME se též používá při hledání nových bioaktivních látek v rostlinách. Lze takto extrahovat nové složky z pouhé rostlinné kapky. Takto byly pomocí HS-SPME získány např. tabákové alkaloidy a monoterpeny.²¹

3.2.8. Technika přepínání kolon

Technika přepínání kolon (column switching) je zajímavá technika úpravy vzorku. Skládá se z extrakční kolony, která selektivně zadržuje daný analyt, zatímco balastní látky prochází bez zadržení a jsou eliminovány. Poté dojde k automatickému přepojení na analytickou HPLC kolonu a analyty jsou do ní unášeny mobilní fází z extrakční kolony. Zde dochází k separaci látek.

Výhodou této techniky je její úplná automatizace a kvantitativní reprodukovatelnost. Bohužel tato metoda je velmi finančně náročná.⁴

3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) se řadí mezi nejvíce používané analytické metody. Umožňuje současné kvalitativní a kvantitativní hodnocení analytů, proto se široce využívá ve všech oblastech analýzy léčiv. Výhodou HPLC je také její rychlost a citlivost stanovení. Jednotlivá stanovení lze i plně automatizovat, kdy chromatograf sám dává vzorky pomocí autosampleru nebo mění složení mobilní fáze.²²

3.3.1. Princip HPLC

Principem chromatografie je dělení analyzovaných látek mezi stacionární a mobilní fázi. Dochází zde k opakovanému ustalování rovnováhy mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Analyt je zadržován stacionární fází díky interakcím s různými mechanismy vzniku. Podle tohoto mechanismu separace lze HPLC dělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní.²³

Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie je založena na rozdílné adsorpci molekul analytu na povrchu stacionární fáze. Jako stacionární fáze se obvykle používá polární nemodifikovaný silikagel. Analyty se adsorbují na volné hydroxylové skupiny silikagelu pomocí vodíkových vazeb. Platí zde, že polární molekuly se více adsorbují na polární stacionární fázi. Při této chromatografii se spíše používá nepolární mobilní fáze, protože polární mobilní fáze by se sama adsorbovala na povrch stacionární fáze.²³

Rozdělovací chromatografie

Rozdělovací chromatografie je založena na rozdílné rozpustnosti analytů ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách. Jedna kapalina je ukotvena na vhodném pevném nosiči jako stacionární fáze a druhá je mobilní fáze. Jako nosič se používá silikagel, na kterém jsou

navázány nepolární chemicky modifikované fáze. Mobilní fáze může být polární rozpouštědlo nebo vodný pufr.²³

Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je založena na rozdílné afinitě iontů analytu k iontoměničím (stacionární fázi). Ionty analytu jsou zadržovány silnými elektrostatickými silami. Iontoměniče se dělí na katexy obsahující na povrchu negativně nabitou skupinu a anexy mající pozitivně nabitou skupinu. Katexy zadržují kationty a anexy anionty. Nejčastěji se používají iontoměniče s těmito skupinami: sulfonová (silný měnič kationtů), tetraalkylamoniová (silný měnič aniontů), karboxylová (slabý měnič kationtů) a terciální aminoskupina (slabý měnič aniontů).^{23,24}

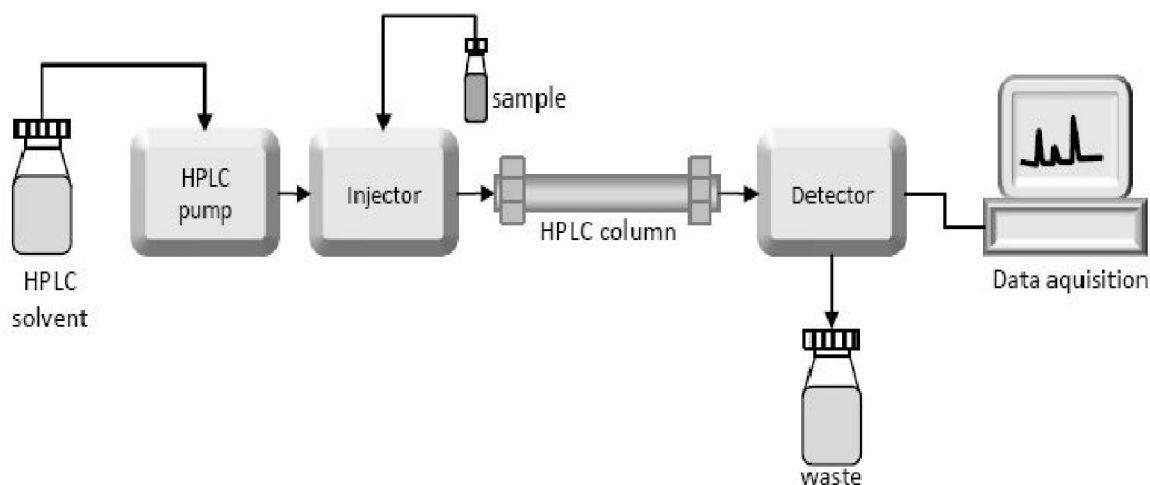
Gelová chromatografie

U gelové chromatografie je rozhodující velikost molekul analytu. Chromatografická kolona je naplněna porézním gelem sloužícím jako stacionární fáze. Při průchodu kolonou jsou malé molekuly vzorku zadržovány nejvíce, naopak molekuly větší než póry gelu prochází bez zadržení. Na retenci molekul má též velký vliv tvar molekuly analytu a tvar pórů gelu.²³

Afinitní chromatografie

Při afinitní chromatografii se používají specifické ligandy jako stacionární fáze. Tyto ligandy zadržují analyty pomocí různých biologických interakcí. Jako ligand se dá použít protein, enzym, protilátka, specifický antigen nebo určitá sekvence DNA. Ligandy jsou navázány na vhodném nosiči z celulózy nebo agaru. Afinitní chromatografie je vysoce selektivní, a proto se využívá např. při izolaci specifických biologických látek ve složitém biologickém vzorku.²⁵

3.3.2. Instrumentace HPLC



Obr. č. 5: Schématické znázornění HPLC²⁶

Vysokoučinný kapalinový chromatograf se skládá z následujících komponent:

- *Zásobník mobilní fáze (HPLC solvent)* slouží k uchovávání mobilní fáze. Při isokratické eluci stačí pouze jeden, u gradientové eluce, při níž se mění složení mobilní fáze v průběhu analýzy, se používá více zásobníků mobilní fáze. Zásobník má v sobě zabudován degasér, který zbavuje mobilní fázi vzduchových bublin, a filtr odstraňující možné pevné nečistoty v mobilní fázi.
- *Vysokotlaké čerpadlo (HPLC pump)* slouží k udržení konstantního tlaku v koloně a umožňuje plynulý tok mobilní fáze kolonou.
- *Dávkovací zařízení (Injector)* dávkuje vzorek z vialky do proudu mobilní fáze, s kterou je unášen na kolonu. V současné době se nejvíce používají automatizované autosamplery.
- *Kolona (HPLC column)* je naplněna stacionární fází, na které dochází k separaci analytů ze vzorku. Je vyrobena z nerezové oceli nebo skla a většinou je dlouhá 10 - 25 cm.
- *Detektor (Detector)* umožňuje detekci analytů vycházejících z kolony, proto musí být vysoce selektivní a citlivý k sledované látce. Nejčastěji se používají tyto detektory:
 - *Spektrofotometrický detektor* měří absorbcí elektromagnetického záření eluátu, který protéká celou detektorem. Existují detektory měřící jen při jedné

- vlnové délce nebo detektory, na kterých lze nastavit měřenou vlnovou délku dle potřeby. Diode array detektor umí snímat celé absorpční spektrum.
- *Fluorimetrický detektor* detekuje analyt vykazující fluorescenci (schopnost vydávat emisní záření po absorpci excitačního záření). Látky, které nefluoreskují, lze vhodnou derivatizací převést na fluoreskující derivát.
 - *Elektrochemický detektor* využívá k detekci probíhající elektrochemickou reakci (oxidaci nebo redukci) na rozhraní elektroda - eluent.
 - *Refraktometrický detektor* měří změnu indexu lomu při průchodu analytu detekční celou. Tento detektor je prakticky univerzální.
 - *Hmotnostní spektrometr (MS)* je vysoce selektivní, citlivý a umožňuje i současnou detekci analytu. Po výstupu eluátu z kolony je nejprve nutno odstranit mobilní fázi a analyty převést do plynného skupenství. Poté jsou analyty ionizovány nárazy elektronů, elektroionizací nebo termoionizací. Vzniknou molekulární a fragmentární ionty, které jsou v magnetickém poli děleny podle své hmotnosti a náboje. Výsledkem je hmotnostní spektrum vyjadřující četnost iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů.
 - *Počítač (Data acquisition)* určuje a zároveň kontroluje všechny parametry HPLC systému. Slouží také ke zpracování dat vycházející z detektoru.^{22,23}

3.3.3. Kvalitativní a kvantitativní analýza

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je velmi často používaná separační metoda, protože poskytuje současně kvalitativní a kvantitativní analýzu sledovaného analytu ve vzorku. Ze záznamu analýzy lze zjistit detailní informace o identitě, čistotě a obsahu analyzované látky.

Kvalitativní analýza se používá k identifikaci a důkazu určitého analytu ve složitém vzorku. Analyt je charakterizován retenčním (elučním) časem t_R . Retenční čas je doba mezi nástřikem vzorku na kolonu a maximem chromatografického píku dané látky. Důkazem dané látky je shoda retenčního času látky s časem standardu.^{22,24}

Kvantitativní analýza slouží ke stanovení množství (koncentrace) analytu v daném vzorku. Charakteristikou této analýzy je plocha nebo výška chromatografického píku. K vyhodnocení se používají tyto metody:²²

Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu se skládá ze dvou dílčích kroků. Nejprve se na kolonu nastříkne vzorek, poté se nastříkne roztok vnějšího standardu (standard stanovované látky). Koncentrace látky se vypočítá z poměru plochy píku analytu a plochy píku vnějšího standardu.²²

Metoda vnitřního standardu

U metody vnitřního standardu se přidává definovaný objem vnitřního standardu ke známému objemu vzorku. Tento roztok se nastříkuje na kolonu. Tato metoda je přesnější, protože není zatížena možnou chybou při dvojitým nástřiku. Koncentrace analyzované látky se spočítá z poměru plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standardu. Je nutno vybrat vhodný vnitřní standard, který by se měl eluovat v blízkosti píku analytu, neměl by s analytem reagovat a měl by mít podobnou strukturu a koncentraci jako analyt.²²

Metoda normalizace

U metody normalizace se zjišťuje koncentrace analytu v procentech. Vypočítá se z plochy píku jako procento celkové plochy všech píků. Do celkové plochy všech píků na chromatogramu se nezapočítávají píky rozpouštědel a píky, které jsou pod limitem zanedbatelnosti.¹

Metoda kalibrace

U metody kalibrace se sestavuje kalibrační přímka, která charakterizuje vztah mezi naměřeným signálem a množstvím analytu ve vzorku. Z kalibrační přímky lze odečítat požadované hodnoty jako hmotnost nebo koncentrace.¹

3.4. Validace analytických metod

Validace je proces, kterým se zjišťují důležité charakteristiky analytické metody. Cílem validace je ukázat vhodnost dané metody pro zamýšlený účel. Validace se provádí při vývoji nové metody, pokud byla původní metoda změněna, je-li přenesena do jiné laboratoře nebo při prokazování rovnocennosti dvou metod.

Validace se provádí nejčastěji pro tyto procedury:

- identifikace
- kvantitativní testování nečistot
- limitní testování nečistot
- kvantitativní testy aktivních látek, např. léčivých látek^{22,27}

Podle účelu dané analytické metody se ověřují následující parametry (tab. č. 1).²²

	Identifikace	Testování nečistot		Obsah
		Kvantitativní	Limitní	
Správnost	-	+	-	+
Přesnost	-	+	-	+
Selektivita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-	+	-
Kvantitativní limit	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Rozsah	-	+	-	+
Robustnost	-	+	-	+

- parametr, který se obvykle neověřuje

+ parametr, který se běžně ověřuje

Tab. č. 1: Přehled ověřovaných validačních parametrů podle účelu metody

Metody pro stanovení analytů v biologické matrici by měly být též validovány. Základní parametry validace pro bioanalytické metody jsou selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, linearita a stabilita analytu v odebraném vzorku.²⁸

3.4.1. Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody odlišit a kvantifikovat analyt v přítomnosti ostatních látek (pomocné látky, nečistoty nebo rozkladné produkty) ve vzorku. V biologickém vzorku je též důležité, aby metoda odlišila analyt od metabolitů a ostatních endogenních složek biologického vzorku. Pro důkaz selektivity se musí doložit porovnání výsledků analýzy standardu a vzorku bez analytu, ale obsahujícím všechny ostatní složky (blank sample).^{22,28,29}

3.4.2. Správnost

Správnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi hodnotou naměřenou danou metodou a správnou hodnotou (koncentrace analytu ve vzorku). Správnost se skládá z opakování jednotlivých měření vzorků obsahujících známé množství analytu a je měřena minimálně z 5 analýz (měření) na 3 koncentračních úrovních. Správnost se vyjadřuje jako rozdíl mezi správnou a naměřenou hodnotou nebo jako výtěžnost dle následujícího vzorce:

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 * \text{naměřená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

Hodnota správnosti by se měla pohybovat do 15%, kromě LLOQ (spodní limit kvantifikace), kdy má povolenou odchylku 20%.^{22,28}

3.4.3. Přesnost

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky analytické metody získané opakovaně s jedním homogenním vzorkem. Na 3 koncentračních úrovních se připraví minimálně 5 stejných vzorků, které se analyzují kompletně shodným postupem včetně jejich přípravy. Přesnost se vyjadřuje relativní směrodatnou odchylkou těchto analýz. Hodnota relativní směrodatné odchylky by neměla překročit 15%, u LLOQ 20%.

Přesnost lze rozdělit na opakovatelnost (analýzy jsou opakovány jedním pracovníkem se stejnými činidly a na stejných přístrojích), mezilehlou přesnost (analýzy provádí různí pracovníci

s různými činidly a přístroji, v jiné dny, ale ve stejné laboratoři) a reprodukovatelnost (probíhá v různých laboratořích s různými pracovníky).^{22,28,29}

3.4.4. Extrakční účinnost

Extrakční účinnost nebo-li výtěžnost extrakce vyjadřuje poměr mezi množstvím extrahovaným ze vzorku a množstvím, které bylo do vzorku přidáno. Extrakční účinnost se určuje na třech koncentračních úrovních analytu ve vzorku v porovnání se standardem, který představuje 100% extrakční účinnost. Hodnota extrakční účinnosti analytu nemusí být 100%, ale měla by být konstantní, přesná a reprodukovatelná.^{28,29}

3.4.5. Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tuto úměru vyjadřuje kalibrační přímka, regresní rovnice a korelační koeficient. Kalibrační přímka by se měla skládat z prázdného vzorku - *blank sample* (vzorek bez vnitřního standardu), vzorku obsahujícím jen vnitřní standard - *zero sample* a z 6 - 8 vzorků obsahujících analyt v předpokládaných koncentracích - *non-zero sample*. Linearita se sleduje v rozsahu koncentrací daného analytu, které lze očekávat v biologickém vzorku. Kalibrační přímka by měla obsahovat i koncentraci analytu nazývanou spodní limit kvantifikace (Lower Limit of Quantification, LLOQ).^{22,28,29}

3.4.6. Stabilita

Stabilita analytu v biologickém vzorku závisí na skladovacích podmínkách, chemických vlastnostech analytu, vlastnostech biologického vzorku a na systému, ve kterém je vzorek skladován. Proto je stabilita analytu určována jen pro určitý vzorek v určitých skladovacích podmínkách a nelze její výsledky přenášet pro jiné vzorky. Stabilita analytu se sleduje při odebírání a skladování biologického vzorku, po dlouhodobém (zahrnující zmrazení a opětovné

rozmrazení vzorku) a krátkodobém skladování (při pokojové teplotě) a po několika cyklech opakovaných zmrazení a opětovných rozmrazení. Sleduje se též stabilita už extrahovaného analytu do vialky připraveného v autosampleru.^{28,29}

3.4.7 Robustnost

Robustnost metody by se měla sledovat už při vývoji samotné analytické metody. Vyjadřuje vliv proměnných podmínek na výsledky analýzy. Jejím cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. V bioanalýze se sleduje vliv např. doby extrakce nebo stability analytických roztoků. U metod využívajících vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii se sleduje vliv složení mobilní fáze, pH mobilní fáze, teploty na koloně, rychlosti průtoku nebo stability analyzovaných vzorků.^{22,27}

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

- piroxikam, Sigma Aldrich, Německo
- isoxikam, Sigma Aldrich, Německo
- methanol, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- acetonitril, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- kyselina mravenčí, ACS reagent, Sigma Aldrich, Německo
- hydroxid sodný, Dr. Kulich Pharma, ČR
- kyselina trichloroctová 15%, Dr. Kulich Pharma, ČR
- kyselina chloristá 30%, Dr. Kulich Pharma, ČR
- voda čištěná
- králičí plasma

4.1.2. Sestava pro HPLC

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A₃ VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- chromatografická kolona: Nova-Pak (4 μ m) 150 x 3,9 mm, Waters

4.1.3. Přístroje

- držák pro SPME vlákna, Supelco, Bellefonte, USA
- SPME vlákno, PDMS-DVB Supelco, Bellefonte, USA
- digitální váhy, Sartorius AG typ A200S, Německo
- pH-metr, SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetické míchadlo, IKA ColorSquid, Německo

- třepačka Vortex, VELP Scientifica, Itálie
- centrifuga IEC CL31R Multispeed, Thermo elektron corporation, USA

4.1.4. Pomůcky

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, zkumavky, stojan na zkumavky, laboratorní stojan, vialky a inserty, laboratorní lžičky, lodičky, stříčka, mikropipety, membránový filtr 0,45 µm

4.2. Příprava roztoků

4.2.1. Příprava vzorku plasmy

3 ml králičí plasmy byly ředěny 1 ml čištěné vody. Vzorek byl důkladně promíchán.

4.2.2. Příprava standardů

Standardní roztok piroxikamu

10,05 mg piroxikamu bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v methanolu. Pro zvýšení rozpustnosti látky bylo přidáno 0,1 ml NaOH (1 mol/l) a objem baňky byl doplněn methanolem po rysku. Vzniklý roztok byl dále ředěn vodou okyselenou kys. mravenčí na pH 2,5 na výslednou koncentraci 0,001 mg/ml. Tento roztok byl nastříkovan na HPLC kolonu jako standard.

Standardní roztok isoxikamu

10,15 mg isoxikamu bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v methanolu. Pro zvýšení rozpustnosti látky bylo přidáno 0,1 ml NaOH (1 mol/l) a objem baňky byl doplněn methanolem po rysku. Vzniklý roztok byl dále ředěn vodou okyselenou kys.

mravenčí na pH 2,5 na výslednou koncentraci 0,001 mg/ml. Tento roztok byl nastříkovan na HPLC kolonu jako standard.

Standardní roztok piroxikamu přidávaný do plasmy

10,05 mg piroxikamu bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v methanolu. Pro zvýšení rozpustnosti látky bylo přidáno 0,1 ml NaOH (1 mol/l) a objem baňky byl doplněn methanolem po rysku. Vzniklý roztok byl dále ředěn vodou na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Tento roztok byl přidáván do vzorku ředěné plasmy.

Standardní roztok isoxikamu přidávaný do plasmy

10,15 mg isoxikamu bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v methanolu. Pro zvýšení rozpustnosti látky bylo přidáno 0,1 ml NaOH (1 mol/l) a objem baňky byl doplněn methanolem po rysku. Vzniklý roztok byl dále ředěn vodou na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Tento roztok byl přidáván do vzorku ředěné plasmy.

4.2.3. Příprava mobilní fáze

Čištěná voda byla smíchána s acetonitrilem v poměru 60:40 (v/v). pH roztoku bylo kyselinou mravenčí upraveno na hodnotu 2,5. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μm .

4.2.4. Příprava vzorku pro SPME

K 1,5 ml ředěné plasmy bylo mikropipetou přidáno požadované množství standardního roztoku piroxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) a 80 μl standardního roztoku isoxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) jako vnitřní standard. Pro zvýšení výtěžnosti extrakce se ke vzorku přidávalo 5 μl kyseliny mravenčí (pH vzorku pak bylo 2,5).

4.2.5. Příprava vzorku pro precipitaci methanolem

K 0,3 ml ředěné plasmy bylo mikropipetou přidáno požadované množství standardního roztoku piroxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) a 15 µl standardního roztoku isoxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) jako vnitřní standard. Pro zvýšení výtěžnosti extrakce se ke vzorku přidávalo 1 µl kyseliny mravenčí (pH vzorku bylo 2,5). Nakonec bylo k vzorku přidáno 0,5 ml methanolu.

4.2.6. Příprava vzorku pro precipitaci acetonitrilem

K 0,3 ml ředěné plasmy bylo mikropipetou přidáno požadované množství standardního roztoku piroxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) a 15 µl standardního roztoku isoxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) jako vnitřní standard. Pro zvýšení výtěžnosti extrakce se ke vzorku přidávalo 1 µl kyseliny mravenčí (pH vzorku bylo 2,5). Nakonec bylo k vzorku přidáno 0,5 ml acetonitrilu.

4.2.7. Příprava vzorku pro precipitaci kyselinou trichloroctovou

K 0,3 ml ředěné plasmy bylo mikropipetou přidáno požadované množství standardního roztoku piroxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) a 15 µl standardního roztoku isoxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) jako vnitřní standard. Nakonec byly k vzorku přidány 2 kapky 15% kyseliny trichloroctové.

4.2.8. Příprava vzorku pro precipitaci kyselinou chloristou

K 0,3 ml ředěné plasmy bylo mikropipetou přidáno požadované množství standardního roztoku piroxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) a 15 µl standardního roztoku isoxikamu přidávaného do plasmy (0,1 mg/ml) jako vnitřní standard. Nakonec byly k vzorku přidány 2 kapky 30% kyseliny chloristé.

4.3. Chromatografické podmínky

Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml/min a teplota na koloně byla nastavena na 40°C. Hodnocení pomocí UV detekce probíhalo při 333 nm. Na kolonu se nastříkovalo 20 µl vzorku.

4.4. Provedení mikroextrakce vláknem

PDMS-DVB vlákno bylo 20 minut aktivováno ponořením do methanolu. Methanol ve vialce byl neustále míchán na magnetickém míchadle. Magnetické míchadlo bylo umístěno na laboratorním stojanu, na kterém byl i uchycen držák SPME vlákna. Před samotnou extrakcí byl vzorek plasmy se standardy míchán po dobu 5 minut. Potom bylo vlákno ponořeno do vzorku plasmy. Zde se nechal analyt (piroxikam a vnitřní standard) sorbovat po dobu 20 minut při laboratorní teplotě za neustálého míchání. Po ukončení sorpce bylo vlákno desorbováno při laboratorní teplotě do 200 µl methanolu v insertu vialky. Desorpce trvala 20 minut. Byla testována též 30 minutová sorpce a 30 minutová desorpce. Po desorpci bylo k 200 µl methanolu přidáno 50 µl čištěné vody, jejichž pH bylo pomocí kyseliny mravenčí upraveno na hodnotu 2,5. Insert ve vialce byl uzavřen septem, důkladně promíchán a následně bylo desorpční médium hodnoceno pomocí HPLC. Vlákno po desorpci bylo čištěno 20 minut v methanolu za stálého míchání. Poté již bylo vlákno připraveno pro další extrakci.

4.5. Provedení precipitace

Plasma s přidanými standardy a precipitačními médii byla 30 sekund třepána na třepáče. Následně byla centrifugována po dobu 5 minut při přetížení 5000 G. Odebraný supernatant (250 µl) byl analyzován pomocí HPLC.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Změna parametrů SPME

5.1.1. Změna času sorpce a desorpce

V mé předešlé diplomové práci³⁰ se mikroextrakce skládala z 20 minut sorpce a 20 minut desorpce. Bylo testováno zvýšení času sorpce na 30 minut. Zvýšení času sorpce nemělo významný vliv na výtěžnost extrakce, viz. tab. č. 2.

Zvýšení času desorpce na 30 minut také nemělo významný vliv na výtěžnost mikroextrakce. Proto všechny další mikroextrakce se skládaly z 20 minut sorpce a 20 minut desorpce.

Poměr ploch píků při 20 min. sorpci a 20 min. desorpci	Poměr ploch píků při 30 min. sorpci a 20 min. desorpci	Poměr ploch píků při 20 min. sorpci a 30 min. desorpci
1,6814	2,1197	1,9467
2,0275	2,0896	1,9629
2,1809	2,1411	2,0929
2,0046	1,8900	2,2194
2,0155	1,8283	1,9510
2,3114	1,8960	2,0307

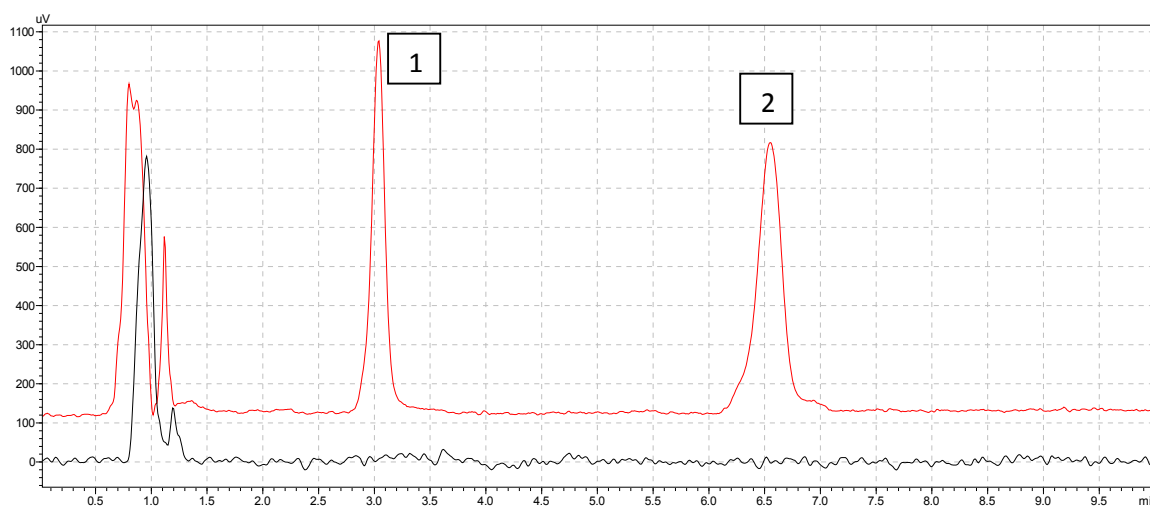
Tab. č. 2: Vliv časů sorpce a desorpce na poměr ploch piroxikamu a IS

5.2. Validace SPME

Mikroextrakce na tuhé fázi piroxikamu z plasmy byla validována dle doporučení FDA. Validačními parametry byly selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, určení LLOQ, kalibrační přímka a stabilita analytů po uložení v autosampleru až do analýzy.

5.2.1. Selektivita

Mikroextrakce byla provedena ze vzorku prázdné plasmy a pak ze vzorku obsahující piroxikam a isoxikam. Metoda je selektivní, protože látky jsou dostatečně rozdělené na chromatogramu a píky standardů neinterferují s píky balastů z plasmy. Na chromatogramu prázdné plasmy se neobjevují píky piroxikamu či isoxikamu (viz. obr. č. 6).



Obr. č. 6: Chromatogram prázdné plasmy (černý) a plasmy obsahující piroxikam (5 µg/ml) a IS (červený)

1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)

5.2.2. Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce

Pro mikroextrakci piroxikamu z plasmy byl stanoven limit detekce (LOD), což je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která se nestanovuje kvantitativně. Vyjadřuje se jako koncentrace analyzované látky, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 3.²²

Hodnota LOD je vyjádřena ke koncentraci piroxikamu v plasmě.

$$\text{LOD}_{(\text{piroxikam})} = 0,44 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Limit kvantifikace

Dále byl stanoven kvantitativní limit (LOQ), což je nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Vyjadřuje se jako koncentrace, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 10.²²

Hodnota LOQ je vyjádřena ke koncentraci piroxikamu v plasmě.

$$\text{LOQ}_{(\text{piroxikam})} = 1,46 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

5.2.3. Extrakční účinnost

Extrakční účinnost (výtěžnost, recovery) je definována jako stonásobek množství analytu extrahovaného pomocí SPME z plasmy a množství analytu, které bylo do plasmy přidáno. Extrakční účinnost byla sledována při třech koncentracích (1,60 µg/ml, 5,33 µg/ml a 10,66 µg/ml). Hodnoty extrakční účinnosti (uvedeny v tabulce č. 3) se celkem liší. Důvodem je časová prodleva mezi jednotlivými extrakcemi. Nejdříve byly testovány nižší koncentrace, kdy ještě nebyly na SPME vlákne nesorbovány molekuly bílkovin z plasmy. Proto je hodnota extrakční účinnosti při této koncentraci nejvyšší. Nejnižší výtěžnost byla naměřena při nejvyšší koncentraci, která byla sledována až na konec. Nicméně tento nedostatek je dále eliminován použitím vnitřního standardu při kvantitativních měřeních.

Koncentrace piroxikamu v plasmě	Extrakční účinnost
1,60 µg/ml	2,74%
5,33 µg/ml	1,24%
10,66 µg/ml	0,97%

Tabulka č. 3: Hodnoty extrakční účinnosti (recovery) pro piroxikam v plasmě

5.2.4. Správnost

Správnost vyjadřuje odchylku výsledku extrakce od správné hodnoty (přidávané množství standardu). Je povolena odchylka 15% od správné hodnoty. Pro LLOQ je povolena odchylka 20% od správné hodnoty. Správnost byla určována z 5 extrakcí na každém ze 3 různých koncentračních stupňů (1,60 µg/ml, 5,33 µg/ml, 10,66 µg/ml). Hodnoty měření jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Koncentrace piroxikamu	Plocha píku piroxikamu	Plocha píku IS	Poměr ploch	Vypočtená koncentrace	Odchylka (%)
1,60 µg/ml	4628	7614	0,6078	1,56	-2,38
	4645	7478	0,6211	1,61	0,67
	4855	7693	0,6310	1,65	2,96
	9715	14200	0,6841	1,84	15,15
	9763	14121	0,6913	1,87	16,81
5,33 µg/ml	6905	3739	1,8467	6,12	14,76
	6805	3681	1,8486	6,12	14,89
	6721	3972	1,6920	5,55	4,09
	3215	1912	1,6814	5,51	-0,37
	2873	1417	2,0275	6,78	22,62
10,66 µg/ml	13502	4482	3,0124	10,40	-2,41
	16690	5363	3,1120	10,77	1,01
	15580	5224	2,9823	10,29	-3,45
	17790	5065	3,5123	12,24	14,82
	15810	5721	2,7635	9,49	-11,00

Tabulka č. 4: Správnost SPME

5.2.5. Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými extrakcemi prováděnými opakovaně s homogenním vzorkem. Je vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou RSD z minimálně 5 extrakcí na každém ze 3 různých koncentračních stupňů. Variační koeficient by neměl přesáhnout 15%. Hodnoty RSD pro koncentrace piroxikamu 1,60 µg/ml, 5,33 µg/ml a 10,66 µg/ml jsou uvedeny v tabulce č. 5.

	Plocha piroxikam	Plocha IS	Poměr ploch	Průměr	Směrodatná odchylka	Přesnost
1,60 µg/ml	4628	7614	0,6078	0,7107	0,06	8,72
	4645	7478	0,6211			
	4855	7693	0,6310			
	8005	11069	0,7231			
	8022	10444	0,7680			
	8122	10389	0,7817			
	8111	10429	0,7777			
	8355	10451	0,7994			
	8291	10512	0,7887			
	9447	13663	0,6914			
	9470	13552	0,6987			
	9653	13882	0,6953			
	9715	14200	0,6841			
	9686	13824	0,7006			
	9763	14121	0,6913			
5,33 µg/ml	6905	3739	1,8467	2,1567	0,31	14,38
	6805	3681	1,8486			
	6721	3972	1,6920			
	7999	3846	2,0798			
	8078	3990	2,0245			
	8053	4043	1,9918			
	8626	4174	2,0666			
	8606	4255	2,0225			
	8684	4214	2,0607			
	10059	4538	2,2166			
	10890	4888	2,2279			
	11140	5022	2,2182			
	10838	4070	2,6628			
	10954	4136	2,6484			
	11053	4029	2,7433			
10,66 µg/ml	13596	4514	3,0119	3,1127	0,30	9,78
	13618	4482	3,0383			
	13502	4482	3,0124			
	16669	5225	3,1902			
	16690	5363	3,1120			
	16343	5324	3,0696			
	15580	5224	2,9823			
	16364	5232	3,1276			
	15781	5165	3,0553			
	17816	4836	3,6840			
	17790	5065	3,5123			
	17655	4789	3,6865			
	15823	5896	2,6836			
	15810	5721	2,7635			
	16007	5797	2,7612			

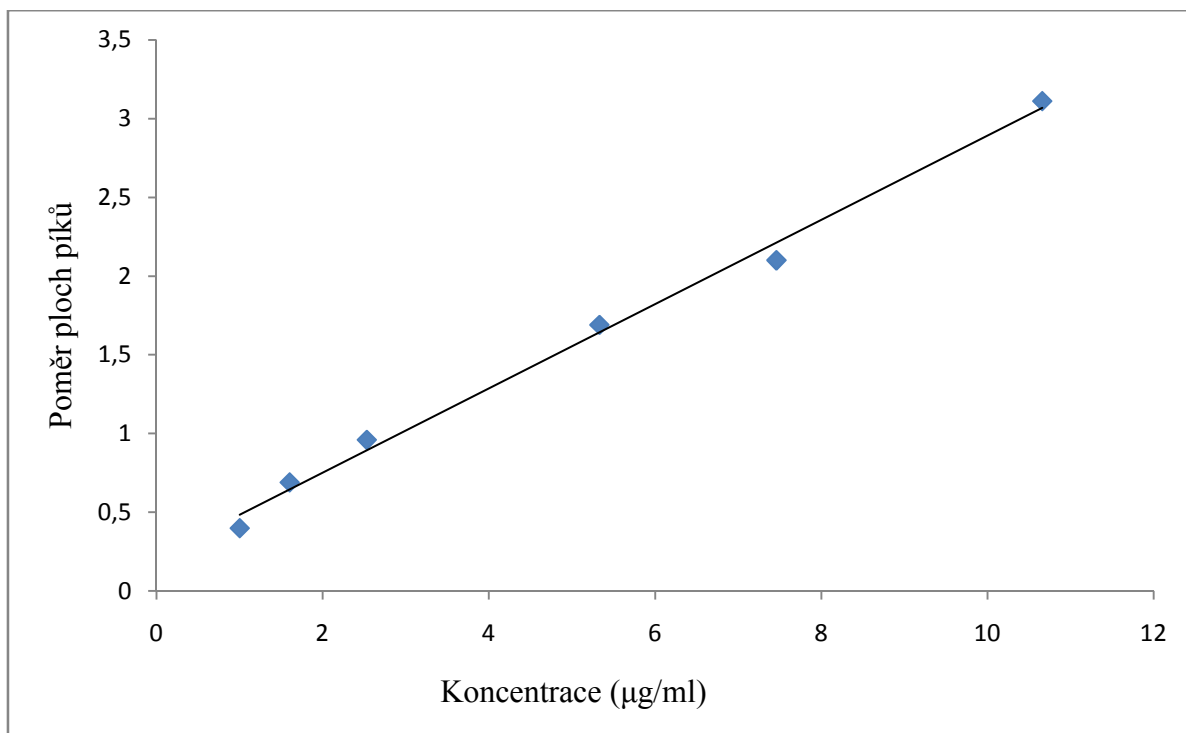
Tab. č. 5: Hodnoty relativní směrodatné odchylky.

5.2.6. Linearita

Linearita byla měřena při 6 koncentracích (1,00 µg/ml, 1,60 µg/ml, 2,53 µg/ml, 5,33 µg/ml, 7,46 µg/ml a 10,66 µg/ml). Každý koncentrační stupeň byl hodnocen z pěti vzorků. Hodnoty kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulce č. 6. Kalibrační přímka je znázorněna na obrázku č. 7.

Koncentrace analytu ve vzorku	Průměrný poměr ploch píku analytu a IS
1,00 µg/ml	0,4062
1,60 µg/ml	0,6953
2,53 µg/ml	0,9659
5,33 µg/ml	1,6920
7,46 µg/ml	2,1259
10,66 µg/ml	3,1176

Tab. č. 6: Hodnoty kalibrační přímky



Obr. č. 7: Závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu

Regresní rovnice $y = 0,2674x + 0,2178$

Korelační koeficient $r^2 = 0,9941$

LLOQ

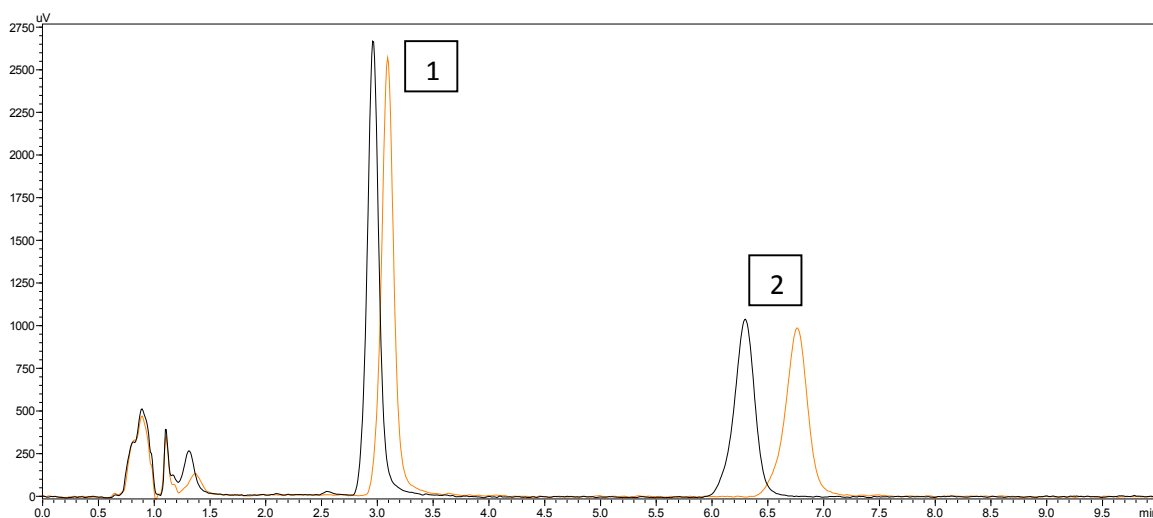
V rámci linearit byla vypočítána i hodnota spodního limitu kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ). LLOQ je koncentrace, při které směrodatná odchylka (přesnost) dosáhne hodnoty 20%.

$$\text{LLOQ} = 0,93 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

5.2.7. Stabilita

Byla též sledována stabilita analytů po uložení v autosampleru až do analýzy. Jednalo se o roztoky obsahující analyty desorbované z SPME vlákna.

Ukázalo se, že po 24 hodinách nedocházelo ke vzniku žádného rozkladného produktu ani úbytku obsahu analytů, viz. obr. č. 8. Posun píků je způsoben malou odchylkou v procentuálním složení mobilní fáze (každý den byla připravována nová mobilní fáze).



Obr. č 8: Chromatogram analýzy ihned po extrakci (červený) a analýzy po 24 hod od extrakce (černý)

1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)

5.2.8. Souhrnné zhodnocení validace SPME piroxikamu z plasmy

Validační parametr	Výsledek
Selektivita	prokázána
Detekční limit	0,44 µg/ml
Kvantitativní limit	1,46 µg/ml
Extrakční účinnost	1,65%
Správnost	105,85% (96,55 - 122,62%)
Přesnost	RSD = 10,96
Linearita	$y = 0,2674x + 0,2178$ $r^2 = 0,9941$
LLOQ	0,93 µg/ml

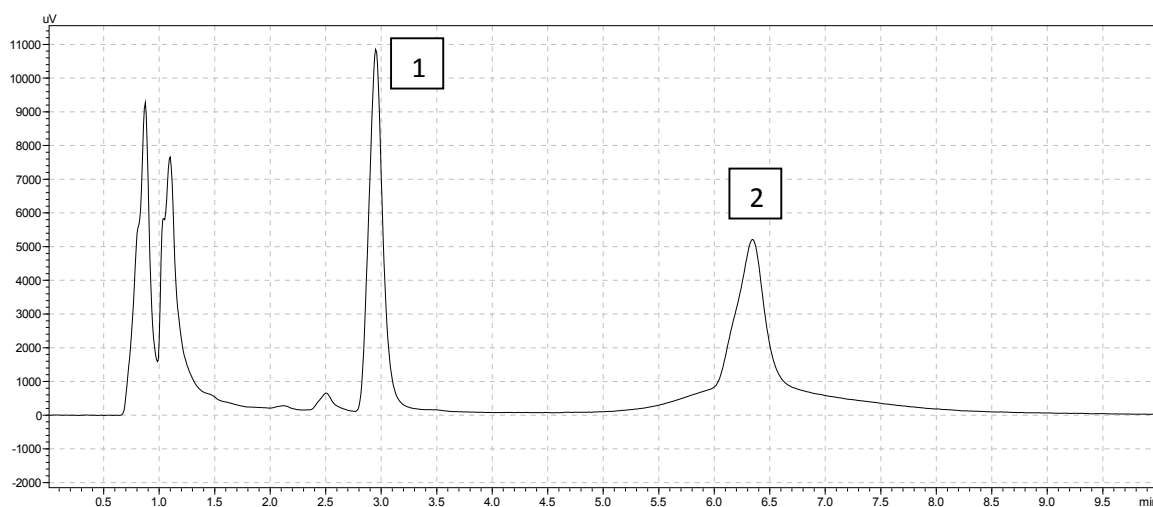
Tab. č. 7: Hodnoty validace SPME

5.3. Optimalizace podmínek pro precipitaci

Pro porovnání výsledků validace SPME byla vybrána metoda úpravy vzorku pomocí precipitace bílkovin. S cílem získat vhodné precipitační činidlo byly testovány silné organické kyseliny a organická rozpouštědla.

Jako silná organická kyselina byla zkoušena 30% kyselina chloristá a 15% kyselina trichloroctová. Nejdříve byly k 0,3 ml plasmy přidány 2 kapky 30% kyseliny chloristé. Dále byl vzorek vždy upraven stejně (popsáno v experimentální části). Ale použití kyseliny chloristé jako precipitačního činidla se jeví být nevhodné, protože poskytovala moc malý objem supernatantu.

Dále byla testována 15% kyselina trichloroctová. K 0,3 ml plasmy byly přidány 2 kapky této kyseliny. Chromatogram této precipitace ale nebyl ideální. Pík piroxikamu byl sice symetrický, ale pík vnitřního standardu isoxikamu byl nesymetrický (obr. č. 9).

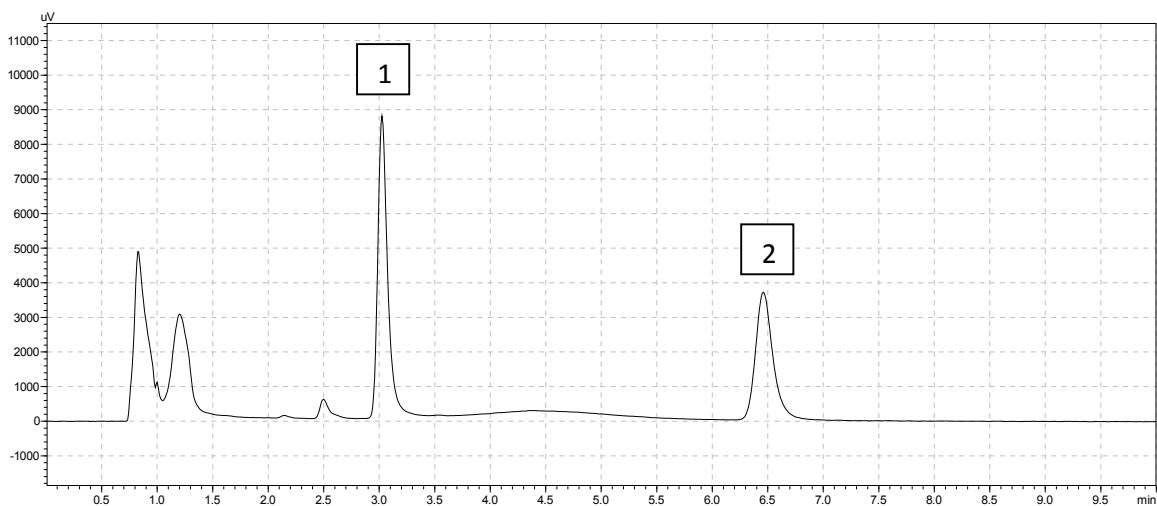


Obr. č. 9: Chromatogram precipitace plasmy pomocí 15% kyseliny trichloroctové.

1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)

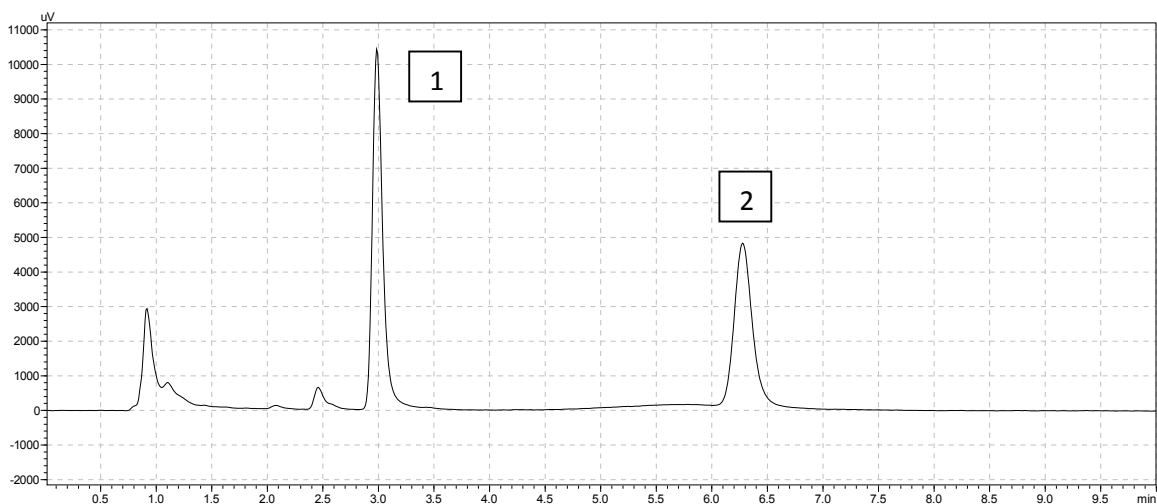
Dále byl jako precipitační médium testován methanol. K 0,3 ml plasmy bylo přidáno 0,5 ml methanolu. Pík piroxikamu byl symetrický, ale výtěžnost nebyla tak vysoká (obr.č. 10).

Též bylo zkoušeno použití acetonitrilu. K 0,3 ml plasmy bylo přidáno 0,5 ml acetonitrilu. Při použití acetonitrilu byl pík piroxikamu symetrický a výtěžnost byla nejvyšší (obr. č. 11). Proto byl pro úpravu vzorků jako precipitační činidlo zvolen acetonitril.



Obr. č. 10: Chromatogram precipitace plasmy pomocí methanolu

1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)



Obr. č. 11: Chromatogram precipitace plasmy pomocí acetonitrilu.

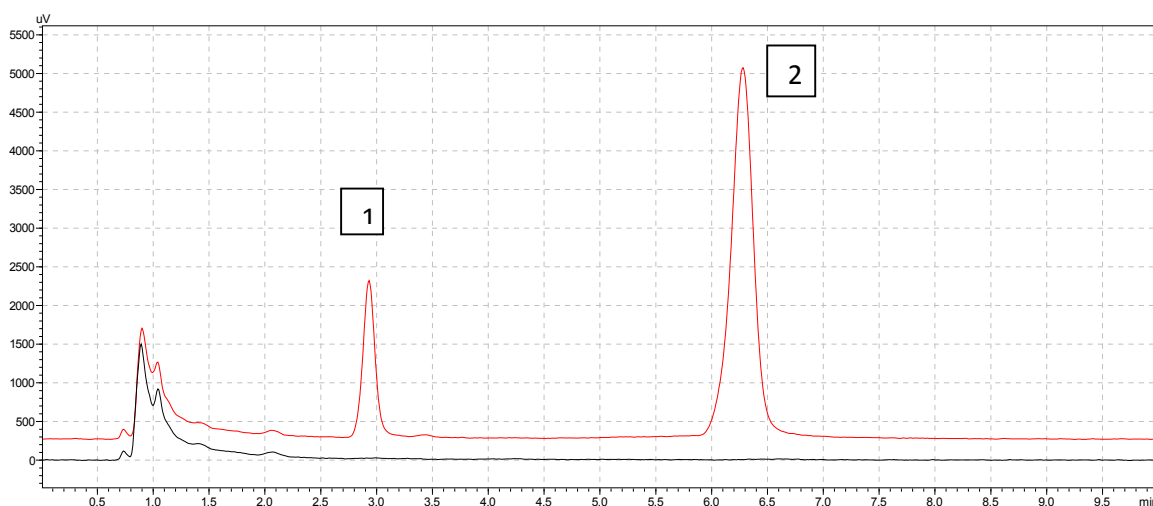
1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)

5.4. Validace precipitace

Úprava vzorku plasmy pomocí acetonitrilu jako precipitačního média byla validována dle doporučení FDA. Validačními parametry byly selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, kalibrační přímka a určení LLOQ.

5.4.1. Selektivita

Precipitace bílkovin plasmy pomocí acetonitrilu byla provedena ze vzorku prázdné plasmy a pak ze vzorku plasmy obsahující piroxikam a isoxikam. Metoda je selektivní, protože látky jsou dostatečně rozdělené na chromatogramu a píky standardů neinterferují s píky balastů z plasmy. Na chromatogramu prázdné plasmy se neobjevují píky piroxikamu či isoxikamu (viz. obr. č. 12).



Obr. č. 12: Chromatogram prázdné plasmy (černý) a plasmy obsahující piroxikam (1,5 µg/ml) a IS (červený)
1 - piroxikam, 2 - IS (isoxikam)

5.4.2. Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce

Pro použití acetonitrilu jako precipitačního média byl stanoven limit detekce (LOD), což je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která se nestanovuje kvantitativně. Vyjadřuje se jako koncentrace analyzované látky, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 3.²²

Hodnota LOD je vyjádřena ke koncentraci piroxikamu v plasmě.

$$\text{LOD}_{(\text{piroxikam})} = 0,07 \mu\text{g/ml}$$

Limit kvantifikace

Dále byl stanoven kvantitativní limit (LOQ), což je nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Vyjadřuje se jako koncentrace, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 10.²²

Hodnota LOQ je vyjádřena ke koncentraci piroxikamu v plasmě.

$$\text{LOQ}_{(\text{piroxikam})} = 0,24 \mu\text{g/ml}$$

5.4.3. Extrakční účinnost

Extrakční účinnost (výtěžnost, recovery) je definována jako stonásobek množství analytu extrahovaného pomocí precipitace bílkovin z plasmy a množství analytu, které bylo do plasmy přidáno. Extrakční účinnost byla sledována při třech koncentracích (1,50 µg/ml, 5,00 µg/ml a 10,00 µg/ml). Hodnoty extrakční účinnosti jsou uvedeny v tabulce č. 8. Hodnoty jsou nízké, protože piroxikam se vysoce váže na plazmatické bílkoviny, které jsou precipitovány.

Koncentrace piroxikamu v plasmě	Extrakční účinnost
1,50 µg/ml	6,15%
5,00 µg/ml	8,14%
10,00 µg/ml	8,46%

Tabulka č. 8: Hodnoty extrakční účinnosti (recovery) pro piroxikam v plasmě

5.4.4. Správnost

Správnost vyjadřuje odchylku výsledku extrakce pomocí precipitace bílkovin plasmu od správné hodnoty (přidávané množství standardu). Je povolena odchylka 15% od správné hodnoty. Pro LLOQ je povolena odchylka 20% od správné hodnoty. Správnost byla určována z 5 precipitací na každé koncentraci piroxikamu v plasmě (1,50 µg/ml, 5,00 µg/ml, 10,00 µg/ml). Hodnoty měření jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Koncentrace piroxikamu	Plocha píku piroxikamu	Plocha píku IS	Poměr ploch	Vypočtená koncentrace	Odchylka (%)
1,50 µg/ml	14551	64855	0,2243	1,44	-3,82
	16111	66167	0,2434	1,51	0,70
	15789	70692	0,2233	1,44	-4,06
	15852	67155	0,2360	1,48	-1,05
	15699	67257	0,2334	1,47	-1,68
5,00 µg/ml	81225	58745	1,3826	5,56	11,29
	75017	67614	1,1094	4,59	-8,15
	81466	68317	1,1924	4,89	-2,24
	77816	62952	1,2361	5,04	0,86
	78961	65716	1,2015	4,92	-1,59
10,00 µg/ml	168516	62857	2,6809	10,18	1,84
	160389	60055	2,6707	10,15	1,48
	160915	63079	2,5510	9,72	-2,77
	166011	60555	2,7414	10,40	4,00
	164993	63261	2,6081	9,92	-0,74

Tabulka č. 9: Správnost precipitace

5.4.5. Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými extrakcemi prováděnými opakovaně s homogenním vzorkem. Je vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou RSD z minimálně 5 precipitací na každém ze 3 různých koncentračních stupňů. Variační koeficient by neměl přesáhnout 15%. Hodnoty RSD pro koncentrace piroxikamu 1,50 µg/ml, 5,00 µg/ml a 10,00 µg/ml jsou uvedeny v tabulce č. 10.

	Plocha piroxikam	Plocha IS	Poměr ploch	Průměr	Směrodatná odchylka	Přesnost
1,50 µg/ml	14469	65148	0,2220	0,2312	0,01	3,64
	14551	64855	0,2243			
	14520	65155	0,2228			
	16111	66167	0,2434			
	16162	66556	0,2428			
	16012	66548	0,2406			
	15499	70227	0,2206			
	15789	70692	0,2233			
	15542	70497	0,2204			
	15852	67155	0,2360			
	16047	67605	0,2373			
	15989	67067	0,2384			
	15699	67257	0,2334			
	15730	67240	0,2339			
	15458	67633	0,2285			
5,00 µg/ml	81383	58622	1,3882	1,2243	0,09	7,63
	81225	58745	1,3826			
	81620	59079	1,3815			
	74825	67398	1,1101			
	75017	67614	1,1094			
	75023	67840	1,1058			
	81443	67636	1,2041			
	81589	67726	1,2046			
	81466	68317	1,1924			
	77235	62931	1,2272			
	77816	62952	1,2361			
	77585	62957	1,2323			
	78776	64883	1,2141			
	78961	65716	1,2015			
	78806	67142	1,1737			
10,00 µg/ml	168519	63637	2,6481	2,6549	0,07	2,67
	168516	62857	2,6809			
	168141	63271	2,6574			
	160430	59814	2,6821			
	160389	60055	2,6707			
	160037	59555	2,6872			
	160577	63278	2,5376			
	160915	63079	2,5510			
	160341	62625	2,5603			
	165321	59874	2,7611			
	165133	59703	2,7659			
	166011	60555	2,7414			
	164501	62612	2,6273			
	164993	63261	2,6081			
	164371	62168	2,6439			

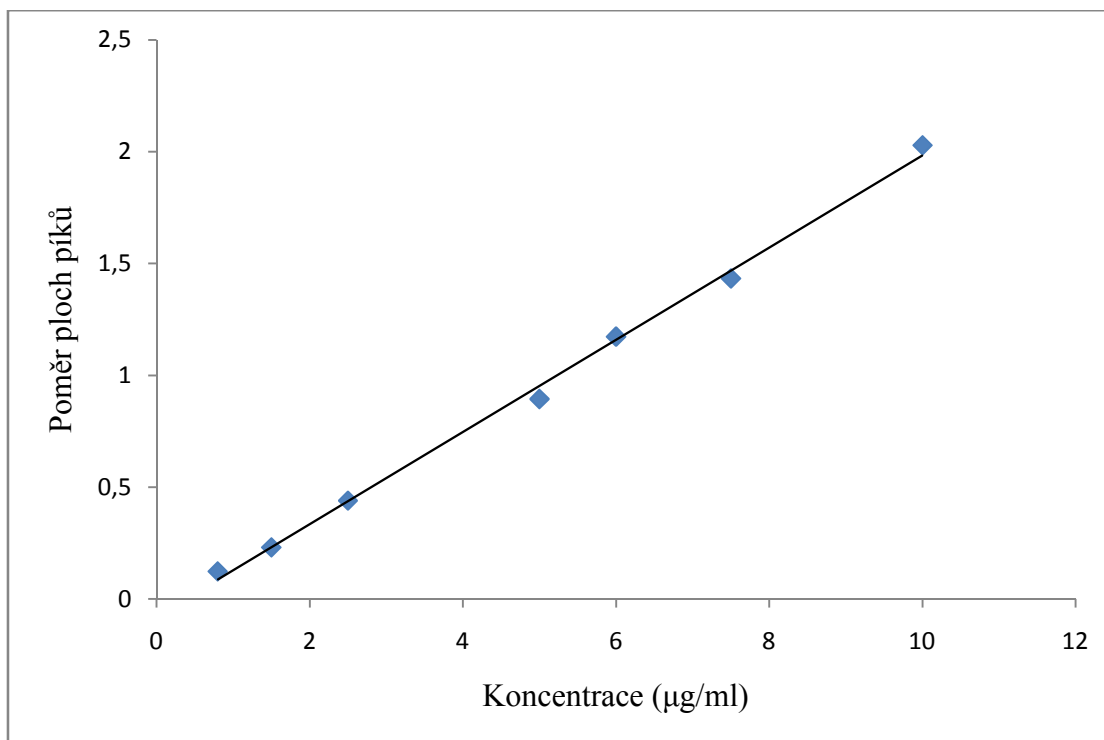
Tab. č. 10: Hodnoty relativní směrodatné odchylky

5.4.6. Linearita

Linearita vyjadřuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu ve vzorku. Zobrazením linearity je kalibrační přímka znázorňující tuto závislost. Linearita byla měřena při 7 koncentracích (0,80 µg/ml, 1,50 µg/ml, 2,33 µg/ml, 5,00 µg/ml, 6,00 µg/ml, 7,33 µg/ml a 10,00 µg/ml). Každý koncentrační stupeň byl hodnocen z pěti vzorků. Hodnoty kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulce č. 11. Kalibrační přímka je znázorněna na obrázku č. 13.

Koncentrace analytu ve vzorku	Průměrný poměr ploch píku analytu a IS
0,80 µg/ml	0,1239
1,50 µg/ml	0,2312
2,33 µg/ml	0,4399
5,00 µg/ml	0,8943
6,00 µg/ml	1,1729
7,33 µg/ml	1,4331
10,00 µg/ml	2,0279

Tab. č. 11: Hodnoty kalibrační přímky



Obr. č. 13: Závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu

Regresní rovnice $y = 0,2060x - 0,0765$

Korelační koeficient $r^2 = 0,9972$

LLOQ

V rámci linearit byla vypočítána i hodnota spodního limitu kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ). LLOQ je koncentrace, při které směrodatná odchylka (přesnost) dosáhne hodnoty 20%.

LLOQ = 0,13 µg/ml

5.4.7. Souhrnné zhodnocení validace precipitace plasmy

Validační parametr	Výsledek
Selektivita	prokázána
Detekční limit	0,07 µg/ml
Kvantitativní limit	0,24 µg/ml
Extrakční účinnost	7,58%
Správnost	99,60% (91,85 - 111,29%)
Přesnost	RSD = 3,43
Linearita	$y = 0,2060x - 0,0765$ $r^2 = 0,9972$
LLOQ	0,13 µg/ml

Tab. č.12: Hodnoty validace precipitace

6. Závěr

Tématem této rigorózní práce byla validace mikroextrakce na tuhé fázi piroxikamu z krevní plasmy. Dále byly optimalizovány podmínky pro deproteinaci plasmy k získání piroxikamu a tato metoda byla též validována.

Po úpravě krevní plasmy byl extrakt analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mobilní fáze se skládala z čištěné vody a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v), tento roztok byl upraven kyselinou mravenčí na pH 2,5. Separace probíhala na koloně s reverzní fází C18 a průtok kolonou byl 1 ml/min. Teplota byla 40°C. Detekce piroxikamu probíhala při 333 nm.

Mikroextrakce na tuhé fázi se skládala z 20 minut sorpce a 20 minut desorpce. Byly testovány i delší časy sorpce a desorpce, ale změna výtěžnosti piroxikamu byla minimální, proto vzhledem k časové náročnosti mikroextrakce byly zachovány původní časové podmínky. Dále byla sledována stabilita vzorku po extrakci, který byl 24 hod skladován v autosampleru a poté analyzován. Po 24 hod nedošlo ke změně ve složení vzorku a nevznikly žádné rozkladné produkty.

Mikroextrakce na tuhé fázi byla validována dle doporučení FDA. Byla sledována selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, linearita včetně určení LLOQ, kvantitativní a detekční limit. Výsledky validace jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Při hledání vhodných činidel pro deproteinaci plasmy byla testována organická rozpouštědla (methanol, acetonitril) a silné kyseliny (kyselina trichloroctová, chloristá). Jako nejvhodnější deproteinační činidlo byl vybrán acetonitril, protože poskytoval nejvyšší výtěžnost a vhodný analytický záznam. Deproteinace byla prováděna přidáním 0,5 ml acetonitrilu k 0,3 ml plasmy. Následovalo 30 sekund třepání a 5 minut centrifugace při 5 000 G. Nakonec bylo odebráno 250 µl supernatantu, který byl analyzován pomocí HPLC.

Deproteinace plasmy byla též validována dle doporučení FDA. U deproteinace byla sledována selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, linearita včetně určení LLOQ, kvantitativní a detekční limit. Hodnoty validace jsou uvedeny v tabulce č. 13 spolu s hodnotami validace SPME.

Validační parametr	SPME	Deproteinace
Selektivita	prokázána	prokázána
Detekční limit	0,44 µg/ml	0,07 µg/ml
Kvantitativní limit	1,46 µg/ml	0,24 µg/ml
Extrakční účinnost	1,65%	7,58%
Správnost	105,85% (96,55 - 122,62%)	99,60% (91,85 - 111,29%)
Přesnost	RSD = 10,96	RSD = 3,43
Linearita	$y = 0,2674x + 0,2178$ $r^2 = 0,9941$	$y = 0,2060x - 0,0765$ $r^2 = 0,9972$
LLOQ	0,93 µg/ml	0,13 µg/ml

Tab. č. 13: Hodnoty validace SPME a deproteinace

Po srovnání validačních parametrů je zřejmé, že izolace piroxikamu pomocí deproteinace je přesnější, citlivější, poskytující více správné výsledky a dávající vyšší výtěžnost. Také je méně časově náročná.

7. Literatura

1. *Český lékopis 2009*, Grada Publishing, a.s.: Praha, 2009
2. Výpis z databáze SPC přípravku Piroxikam AL 20, aktualizováno 31.3.2010
3. Lüllmann H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*, překlad 15., zcela přepracované vydání; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2005
4. Prabu, S. L.; Suriyaprakash, T. N. K. Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review: *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*[online]; InTech, 2012; <http://www.intechopen.com/books/applied-biological-engineering-principlesandpractice/extraction-of-the-drug-from-the-biological-matrix> (accessed Sep 22, 2013)
5. Babjuk, J.; Perlík, F.; Šídlo, Z. *Bioanalytika léků*; Avicenum: Praha, 1990
6. Kavonian, M.; Chernokalskaya, E. Ultrafiltration: Trends in Sample Prep. *G & P magazine*. **2006**, 6, 24-29
7. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/ultrafiltrace.html (accessed Aug 30, 2014)
8. Guan-Jie Wang, Li Tian, Yu-Ming Fan, Mei-Ling Qi. Headspace Single-Drop Microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry for the Analysis of Volatile Compounds from Herba Asari. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2013**, 2013, 380705
9. Wardencki, W., Curylo, J., Namieśnik, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods*. **2007**, 70, 275–288
10. Rutkowska, M., Dubalska, K., Konieczka, P., Namieśnik, J. Microextraction Techniques Used in the Procedures for Determining Organomercury and Organotin Compounds in Environmental Samples. *Molecules*. **2014**, 19, 7581-7609
11. Sapkale, G. N., Patil, S. M., Surwase, U. S., Bhatbhage, P. K. Supercritical Fluid Extraction. *Int. J. Chem. Sci.* **2010**, 8, 729-743
12. Cirimele, V., Kintz, P., Majdalani, R., Mangin, P. Supercritical fluid extraction of drugs in drug addict hair. *Journal of Chromatography B*. **1995**, 673, 173-181
13. Lucci, P.; Pacetti, D.; Núñez, O.; Frega, N. G. *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* [online]; InTech, 2012; <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis> (Nov 5, 2013)
14. Extrakce na tuhou fázi, firemní materiály Sigma Aldrich
15. Lord, H., Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of*

- Chromatography A.* **2000**, 885, 153–193
16. Juntinga, L., Peng, Ch., Suzukib, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Science International.* **1998**, 97, 93–100
 17. SPME-Mikroextrakce tuhou fází, firemní materiály Sigma Aldrich, 2002
 18. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A.* **2000**, 902, 167–194
 19. Musteata, F. M., Pawliszyn, J. Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry.* **2007**, 26, 36-45
 20. Bojko, B., Cudjoe, E., Gomez-Rios, G. A., Gorynski, K., Jiang, R., Reyes-Garces, N., Risticovic, S., Silva, E. A. S., Togunde, O., Vuckovic, D., Pawliszyn, J. SPME – Quo vadis?. *Analytica Chimica Acta.* **2012**, 750, 132– 151
 21. Theodoridis, G., Kosterb, E. H. M., de Jongb, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological sample. *Journal of Chromatography B.* **2000**, 745, 49–82
 22. Klimeš, J. a kol. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami; Nucleus: Hradec Králové, 2011
 23. Kazakevich, Y. LoBrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists.* John Wiley&Sons, Inc.: Hoboken, 2007
 24. <http://www.hplc.cz/> (accessed Sep 10, 2014)
 25. Hage, D. S., Anguizola, J. A. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **2012**, 69, 93– 105
 26. Czaplicki, S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds: Column Chromatography, [online]; InTech, 2013; <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds> (accessed Jan 4, 2014)
 27. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), [online]; http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (accessed Sep 14, 2014)
 28. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001. BP
 29. Chung Chow Chan, Lam, H., Lee, Y. C., Xue-Ming Zhang. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. John Wiley&Sons, Inc.: Hoboken, 2004

30. Kuželová, K. Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií VI..
Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, CZ, 2014

ABSTRAKT

Validace HPLC metody stanovení piroxikamu z plasmy s využitím SPME a deproteinace

Rigorózní práce

Mgr. Kristýna Kuželová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv,
Heyrovského 1203, Hradec Králové

Tématem této rigorózní práce bylo bioanalytické hodnocení piroxikamu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Piroxikam byl izolován z plasmy pomocí SPME a deproteinace. Plasma byla vždy upravena na hodnotu pH 2,5. SPME se skládala z 20 minut sorpce na PDMS/DVB vlákno a 20 minut desorpce do 200 μ l methanolu. U druhé metody byl vzorek plasmy deproteinován acetonitrilem, 30 vteřin třepán a následně 5 minut centrifugován při 5 000 G. Poté byl odebrán supernatant, který byl analyzován pomocí HPLC.

HPLC analýza probíhala na koloně s reverzní fází C18. Mobilní fáze se skládala z roztoku čištěné vody a acetonitrilu (60:40 v/v), který byl okyselený kyselinou mravenčí na pH 2,5. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml/min, teplota byla nastavena na 40°C. Detekce analytu probíhala při 333 nm.

SPME i deproteinace byly validovány dle FDA. Sledována byla selektivita, správnost, přesnost, extrakční účinnost, linearita, detekční a kvantitativní limit a stabilita.

ABSTRACT

Validation of HPLC evaluation of piroxicam in plasma using SPME and precipitation

Rigorous Thesis

Mgr. Kristýna Kuželová

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control,
Heyrovského 1203, Hradec Králové

The purpose of this thesis was bioanalytical evaluation of piroxicam using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Piroxicam was isolated from plasma using SPME and protein precipitation. Plasma was adjusted to pH 2,5. SPME was composed of 20 minutes sorption on PDMS/DVB fiber and 20 minutes desorption into 200 ul of methanol. In the second method the sample of plasma was precipitated with acetonitril, 30 seconds shaken and then 5 minutes centrifuged at 5 000 G. Then the supernatant was removed and analysed with HPLC.

HPLC analysis was on the column with reversed phase C18. The mobile phase consist of water and acetonitrile (60:40 v/v), pH of solution was adjusted to 2,5 using the formic acid. The flow rate was 1 ml/min, the temperature was set at 40°C. The detection was carried out at 333 nm.

SPME and protein precipitation were validated according to FDA. Specificity, accuracy, precision, recovery, linearity, limit of detection a quantification and stability were monitored.