

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Stanovení derivátů estrogeneru metodou sekvenční injekční chromatografie

Rigorózní práce

Hradec Králové 2015

Mgr. Lucie Kosařová

Prohlašuji, že tato rigorózní 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.

.....

Poděkování

Za veškerou pomoc, cenné rady a trpělivost děkuji PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. a všem pracovníkům Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kteří mi byli v průběhu mé práce nápomocni.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lucie Kosařová

Konzultant: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název rigorózní práce: Stanovení derivátů estrogenu metodou sekvenční injekční chromatografie

Tato práce představuje první využití sekvenční injekční chromatografie s použitím monolitické kolony Merck® Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm s předkolonou Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm o celkové délce 105 mm pro testování čtyř derivátů estrogenu blízkých svou strukturou a vnitřního standardu (etylparaben). K analýze byl použit komerčně dostupný systém SICrom™ (FIALab® Instruments Inc., USA), mobilní fáze acetonitril:voda 40:60 (v/v) a CCD UV-VIS detektor se spektrofotometrickou detekcí při 225 nm. Pro jednu analýzu, která trvala 7,5 min, bylo použito 10 µl vzorku a 3 ml mobilní fáze. Bylo využito izokratické eluce a průtoková rychlost byla nastavena na 8 µl.s⁻¹. Chromatografické píky všech látek vykazovaly dobrou symetrii a rozdělení. Za výše uvedených podmínek bylo dosaženo vysoké účinnosti separace, což ukazuje další možné využití sekvenční injekční chromatografie v analytické chemii.

Klíčová slova: sekvenční injekční chromatografie, monolitické kolony, estrogeny

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Mgr. Lucie Kosařová

Consultant: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of Thesis: Determination of estrogen derivatives by sequential injection chromatography

This work presents the first utilization of sequential injection chromatography for determination of four estrogen derivatives with similar structure and an internal standard (ethylparaben) with the use of monolithic column Merck® Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm and pre-column Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm of total length 105 mm. A commercially available SIC system – SICrom™ (FIALab® Instruments Inc., USA), mobile phase composed of acetonitrile:water 40:60 (v/v) and CCD UV-VIS detector were used. Spectrophotometric detection was set up at wavelength of 225 nm. The injected volume of sample solutions was 10 µl and 3 ml of mobile phase was pumped isocratic at flow rate 8 µl.s⁻¹. High separation efficiency, good peak symmetry and resolution were obtained at these conditions, showing another possibility of use sequential injection chromatography in analytical chemistry.

Keywords: sequeention injection chromatography, monolithic columns, estrogens

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek.....	9
Seznam zkratk.....	10
1. Úvod a cíl práce.....	11
2. Teoretická část	12
2.1 Estrogeny	12
2.2 Sekvenční injekční chromatografie	14
2.2.1 Princip metody a její historická východiska.....	14
2.2.2 Složení systému SIC	15
2.2.3 Výhody a nevýhody SIC	16
2.2.4 Využití SIC.....	17
2.3 Chromatografické kolony	19
2.3.1 Monolitické kolony.....	19
2.4 Validace analytické metody	21
2.4.1 Vybrané validační parametry	21
2.4.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater (N)	21
2.4.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků (A_s)	22
2.4.1.3 Rozlišení chromatografických píků (R_s)	22
2.4.1.4 Opakovatelnost	23
2.4.1.5 Linearita odezvy	23
2.4.1.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti	23
3. Experimentální část	25
3.1 Použité materiály a metody.....	25
3.1.1 Chemikálie	25
3.1.2 Standardy	25
3.1.3 Přístroje	25
3.1.4 Zásobní roztoky	27
3.1.5 Příprava vzorku	28
3.1.6 Popis práce	28
4. Výsledky a diskuze.....	29
4.1 Vývoj a optimalizace metody SIC pro látky estrogenního charakteru	29

4.1.1	Výběr mobilní fáze	29
4.1.1.1	Úprava pH mobilní fáze	29
4.1.1.2	Úprava složení mobilní fáze	29
4.1.2	Vytvoření a optimalizace programu analýzy	30
4.1.3	Výběr průtokové rychlosti, množství vzorku a mobilní fáze	32
4.1.4	Výběr chromatografické kolony	33
4.1.5	Výběr způsobu detekce	35
4.1.6	Výběr detekční cely	36
4.1.7	Výběr vlnové délky detekce	36
4.1.8	Výběr vnitřního standardu	36
4.1.9	Testování izokratické eluce	38
4.1.10	Testování gradientové eluce	39
4.1.11	Testování vlivu zvýšené teploty	39
4.1.12	Souhrn optimálních podmínek SIC pro estrogení látky	40
4.2	Validace analytické metody	41
4.2.1	Stanovení linearit odezvy	41
4.2.1.1	Etylparaben	42
4.2.1.2	β -estradiol	43
4.2.1.3	α -estradiol	44
4.2.1.4	Ethynylestradiol	45
4.2.1.5	Estron	46
4.2.2	Stanovení limitu detekce a limitu kvantifikace	47
4.2.3	Stanovení zdánlivého počtu teoretických pater	47
4.2.4	Stanovení faktoru symetrie chromatografických pík	48
4.2.5	Stanovení rozlišení chromatografických pík	49
4.2.6	Opakovatelnost	49
4.3	Diskuze	51
5.	Závěr	52
6.	Literatura	53

Seznam obrázků

Obrázek 1. α -estradiol	12
Obrázek 2. β -estradiol	12
Obrázek 3. Ethynylestradiol	12
Obrázek 4. Estron	12
Obrázek 5. Estriol	13
Obrázek 6. Schéma systému pro SIC.....	16
Obrázek 7. Chromatografická kolona.....	19
Obrázek 8. Snímek příčného řezu monolitu, pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem.....	20
Obrázek 9. Schéma chromatografického systému pro SIC. 1-pumpa, 2-ventil s osmi výstupy, 3-chromatografická kolona, 4-průtoková detekční Z cela, 5-UV lampa, 6-CCD UV-VIS detektor, 7-počítač vybavený programem FIALab, 8-pojistný ventil, 9-vzorek, 10-mobilní fáze, 11-odpad, 12-manometr s pojistným ventilem.....	26
Obrázek 10. Chromatogram pěti estrogenů oddělených pomocí kolony sestavené z Chromolith® Performance RP-18e 100 mm \times 3 mm, Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm \times 4,6 mm, Chromolith® RP-18e 5 \times 4,6 mm.....	34
Obrázek 11. Chromatogram čtyř estrogenů s vnitřním standardem (EP) oddělených pomocí kolony Chromolith® Performance RP-18e 100 mm \times 3 mm s předkolonou Merck® Chromolith® RP-18e 5 \times 3 mm.....	35
Obrázek 12. Chromatogram pěti estrogenů a vnitřního standardu MP.....	37
Obrázek 13. Chromatogram čtyř estrogenů a vnitřního standardu EP.	38
Obrázek 14. Graf lineární regrese EP.	42
Obrázek 15. Graf lineární regrese BE.	43
Obrázek 16. Graf lineární regrese AE.....	44
Obrázek 17. Graf lineární regrese EE.	45
Obrázek 18. Graf lineární regrese E-on.	46

Seznam tabulek

Tabulka 1. Možnosti využití SIC a parametry, za kterých bylo stanovení provedeno ..	18
Tabulka 2. Program analýzy pěti estrogenů a vnitřního standardu MP	31
Tabulka 3. Program analýzy čtyř estrogenů a vnitřního standardu EP	32
Tabulka 4. Retenční časy látek při izokratické eluci.	39
Tabulka 5. Retenční časy látek při testování teplotního gradientu.	40
Tabulka 6. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci EP.	42
Tabulka 7. Statistické parametry pro regresi EP.	42
Tabulka 8. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci BE.	43
Tabulka 9. Statistické parametry pro regresi BE.	43
Tabulka 10. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci AE.	44
Tabulka 11. Statistické parametry pro regresi AE.	44
Tabulka 12. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci EE.	45
Tabulka 13. Statistické parametry pro regresi EE.	45
Tabulka 14. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci E-on.	46
Tabulka 15. Statistické parametry pro regresi E-on.....	46
Tabulka 16. Hodnoty LOD a LOQ.	47
Tabulka 17. Zdánlivý počet teoretických pater.	48
Tabulka 18. Faktor symetrie chromatografických píků.	48
Tabulka 19. Rozlišení chromatografických píků.	49

Seznam zkratek

AE	α -estradiol
ACN	acetonitril
BE	β -estradiol
CCD UV-VIS	detektor s CCD čipem pro měření v ultrafialové a viditelné části spektra
E	estradiol
EE	ethynylestradiol
EP	etylparaben
E-ol	estriol
E-on	estron
FIA	průtoková injekční analýza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRT	hormonální substituční léčba
PEEK	polymer polyetherketon
IS	vnitřní standard
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
MP	metylparaben
SIA	sekvenční injekční analýza
SIC	sekvenční injekční chromatografie
SMA	standardizovaný konektor optického vlákna
UV lampa	zdroj světla v ultrafialové oblasti
ULTEM	polymer polyetherimid

1. Úvod a cíl práce

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony steroidní struktury. V lidském těle působí aktivaci estrogenních receptorů, čímž u žen v pubertě způsobují vývoj sekundárních pohlavních znaků a mají vliv na růst endometria v průběhu menstruačního cyklu. Tyto hormony se tedy fyziologicky podílí na řízení menstruačního cyklu, čehož se využívá i terapeuticky při podávání hormonálních kontraceptiv nebo hormonální substituční terapie.

Sekvenční injekční chromatografie je relativně mladá analytická metoda, která spojuje průtokové a chromatografické metody. Tato metoda využívá programovatelný diskontinuální tok nosiče a vzorku, dále dělení jednotlivých analytů na chromatografické koloně a volitelné spektrofotometrické nebo fluorimetrické detekce. Výhody této metody, jako je nízká spotřeba organických rozpouštědel i vzorku, snadné sestavení přístroje a jeho přenositelnost v terénu, vedou ke stále širšímu použití a zdokonalování sekvenční injekční chromatografie.

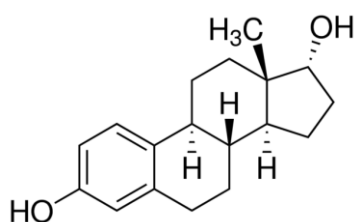
Cílem této rigorózní práce je vyvinout metodu sekvenční injekční chromatografie pro pět derivátů estrogenu a poté validovat podmínky vyvinuté metody. V průběhu práce bude nutné otestovat více chromatografických kolon, vybrat vhodnou mobilní fázi, vnitřní standard, vytvořit vhodný program pro analýzu testovaných látek a stanovit optimální způsob detekce. Hlavním kritériem při vývoji této metody by mělo být kompletní rozdělení všech látek v přijatelném čase, který bude nezbytný pro jednotlivou analýzu.

2. Teoretická část

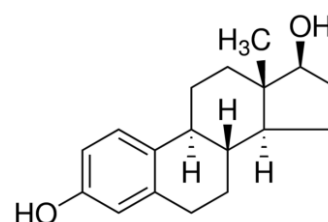
2.1 Estrogeny

Estrogeny jsou steroidní pohlavní hormony, které jsou tvořeny jak přirozeně v ženském těle, tak mohou být připraveny synteticky. Mezi přirozené estrogeny patří estradiol (E), estron (E-on) a estriol (E-ol), ze syntetických estrogenů se nejvíce využívá ethynylestradiol (EE). Nejsilnější účinek ze tří jmenovaných přirozených estrogenů vykazuje estradiol. Naopak estriol je nejslabším estrogenem. Tyto látky působí na tkáň jak fyziologicky, tak při terapeutickém použití zejména aktivací estrogenních receptorů. Všem je společná základní osmnáctuhlíková steroidní struktura cyklopentanoperhydrofenantrenu s aromatickým kruhem A [1–6]. Biosyntéza vychází z cholesterolu, ze kterého vzniká přes celou kaskádu dějů androstendion a z něj testosteron. Působením aromatázy vzniká z androstendionu estron a z testosteronu estradiol. Estron může být hydroxylován na estriol nebo může být metabolizován na estradiol. Struktura výše jmenovaných estrogenů je zobrazena na **obrázcích č. 1–5**.

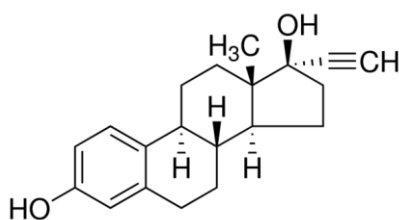
Obrázek 1. α -estradiol



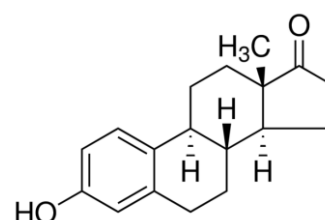
Obrázek 2. β -estradiol



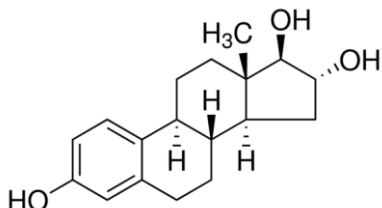
Obrázek 3. Ethynylestradiol



Obrázek 4. Estron



Obrázek 5. Estriol



Estrogeny jsou u premenopauzálních žen fyziologicky tvořené zejména v buňkách Graafova folikulu a žlutého tělíska ovarií, minoritně také v periferních tkáních, jako jsou játra, nadledviny, mozek, tuková tkáň a kosterní svaly. U postmenopauzálních žen pokrývají tyto periferní tkáně celkovou sekreci estrogenů.

Estrogeny mají vliv na vývoj sekundárních pohlavních znaků, růst ženských pohlavních orgánů v pubertě a růst endometria v průběhu menstruačního cyklu ženy. Při dlouhodobější aplikaci estrogenů podporují tyto látky uzavírání epifyzárních štěrbin a zastavují tím růst. Zlepšují také resorpci vápníku a jeho využití kostní tkání a snižují resorpci kostní hmoty. Pravděpodobně také podporují produkci dihydroxycholecalciferolu (aktivní forma vitamínu D₃). Mají také vliv na rozvoj mléčné žlázy. Působením na hypotalamo-hypofyzární osu brání estrogeny uvolňování gonadotropinů. Při kontinuálním podávání tak brání ovulaci. U mužů tlumí estrogeny spermatogenezi, snižují produkci androgenů, potlačují proliferaci tkáně prostaty a působí atrofii varlat (feminizace), čehož se využívá terapeuticky při léčbě karcinomu prostaty (EE). Estrogeny působí protektivně proti ateroskleróze a infarktu myokardu zásahem do metabolismu lipidů. Mírně snižují celkovou hladinu cholesterolu, zvyšují hladinu kardioprotektivního HDL-cholesterolu a snižují hladinu LDL-cholesterolu. Naproti tomu mají vliv na tvorbu cholesterolových žlučových kamenů zvýšeným vylučováním cholesterolu žlučí (může se projevit např. při dlouhodobém užívání estrogen-progestinových kontraceptiv). Estrogeny mají mírně anabolický účinek, způsobují retenci sodíku a vody s následnou možností tvorby edémů, zvyšují hladinu koagulačních faktorů II, VII, IX a X, snižují hladinu fibrinogenu a antitrombinu III v plazmě, což má za následek zvýšenou pohotovost ke krevní srážlivosti, a tím vyšší riziko tromboembolické příhody.

Estrogeny se používají zejména jako kontraceptiva, při poruchách menstruačního cyklu, jako hormonální substituční terapie u klimakterických žen ke zvládnutí

postmenopauzálních příznaků v kombinaci s progestiny, dále k léčbě infertility nebo v léčbě karcinomu prsu, endometria a již zmíněnému karcinomu prostaty [1–3].

Většina estrogenů, které jsou produkovány lidským tělem, je vyloučena močí a končí v odpadních vodách. V dnešní době se k fyziologicky produkovanému množství estrogenů přidávají ve stále větším množství syntetické estrogeny vyloučené ženami, užívajícími hormonální antikoncepci nebo HRT. Dalším zdrojem estrogenů, které se dostávají do odpadních vod, jsou také hospodářská zvířata. Tyto látky mohou narušovat normální funkce endokrinního systému i v limitních koncentracích ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$), jelikož mají velmi vysokou estrogení aktivitu. To představuje nebezpečí zejména pro vodní živočichy, protože ne všechny steroidní látky jsou odstraněny v čistírnách odpadních vod a dostávají se tak dál do vodních toků, kde působí na vodní živočichy. Estrogeny mohou u rybích samců způsobit produkci a uvolnění vitelogeninu (samičí specifický protein), díky čemuž dochází k inhibici růstu sekundárních pohlavních orgánů, dále mohou způsobit rozvoj obojetných pohlavních znaků až feminizaci. U rybí populace vystavené vyšší koncentraci estrogenů ve vodě bylo pozorováno méně časté tření a změny v chování v jeho průběhu. Zatímco nežádoucí účinky steroidních hormonů na vodní živočichy byly prokázány mnoha studii, efekt na člověka je stále sporný. Některé studie uvádějí jako důsledek zvýšeného výskytu estrogenů v životním prostředí nižší počet spermií a nižší reprodukční schopnost mužů a vyšší výskyt rakoviny prsu, zatímco jiné poukazují na možný geografický a kulturní vliv [4–6].

Kvůli výše naznačeným hrozícím rizikům je třeba vyvinout metodu, která dokáže estrogeny spolehlivě detekovat již v limitních koncentracích a dále metodu, která dokáže tyto látky kompletně odstranit z vod.

2.2 Sekvenční injekční chromatografie

2.2.1 Princip metody a její historická východiska

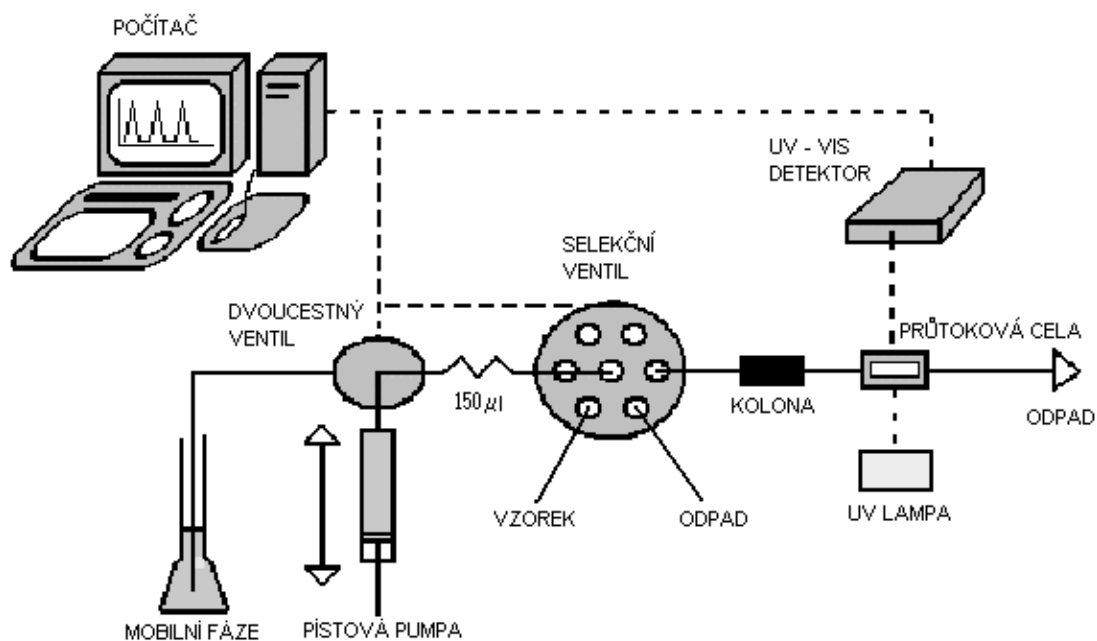
Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je spojením průtokových a chromatografických metod [7]. První generaci průtokových metod navrhli v roce 1974 Hansen a Růžička, když vymysleli a popsali metodu, která se později začala označovat jako průtoková injekční analýza (FIA). Jejich vynález byl revolucí v automatizaci chemických analýz [8]. FIA je založená na kontinuálním průtoku nosného proudu,

do kterého je aplikován vzorek. Vzorek je v proudu rozptýlen a interaguje s nosným proudem. Na základě této chemické reakce zaznamená detektor určitý parametr (např. absorbance, chemiluminiscence), jako výsledek tohoto děje, aniž by muselo dojít k ustavení jeho rovnováhy [8, 9]. S rozšířením počítačové techniky přišla v roce 1990 druhá generace průtokových metod. Tehdy Růžička a Marshall navrhli sekvenční injekční analýzu (SIA). Zatímco FIA využívá kontinuálního proudu nosiče, SIA je založená na programovatelném, diskontinuálním, dvojsměrném toku [8, 10, 11]. Vzorek a činidla jsou postupně dopravovány do reakční cívky a píst pumpy zajišťuje pohyby tam a zpět překrývání zón se vzorkem a činidly, až dojde k reakci, jejímž výsledkem je produkt, který je následně dopraven k detektoru [8, 10, 12]. SIA je oproti FIA více ekonomičtější ve spotřebě chemikálií díky diskontinuálnímu toku. Měla však stále jednu podstatnou nevýhodu, a to nemožnost analyzovat složitější vzorky, složené z více komponent. Tuto slabinu odstranil v roce 2003 Šatínský a kol. připojením krátké monolitické kolony k systému SIA. Takto vznikla sekvenční injekční chromatografie (SIC) [7, 11, 13–19].

2.2.2 Složení systému SIC

Jak již bylo výše řečeno, SIC představuje spojení průtokových metod (v tomto případě SIA) a metod chromatografických. Základní součásti systému SIA, tedy pumpa, selekční ventil, průtoková cela a detektor, jsou doplněny o monolitickou kolonu, která je do systému vložena mezi selekční ventil a průtokovou celu detektoru [7, 11–18, 20]. V nízkotlakém systému sekvenčních injekčních metod se používají hlavně vysoce porézní monolitické kolony, které si zachovávají vysokou rozdělovací schopnost, avšak mají nízký odpor vůči průtoku mobilní fáze [12]. Maximální tlak v tomto systému může být cca 2,5 – 5,0 MPa [11, 14, 16]. Schéma systému pro SIC je zobrazeno na **obrázku č. 6**.

Obrázek 6. Schéma systému pro SIC [13, 14].



2.2.3 Výhody a nevýhody SIC

SIC nese výhody průtokových metod, ze kterých vychází, jako je automatizace a miniaturizace přístrojového vybavení. Další předností této metody oproti metodě SIA je možnost analýzy (separace) jednoduchých směsí. Díky selekčnímu ventilu je možné kombinovat více mobilních fází a nastavením pumpy lze měnit průtokovou rychlost a směr proudu dle programu. SIC dále nabízí možnost analyzovat látky s odlišnými retenčními charakteristikami, připravit vzorek v místě potřeby (extrakce na tuhé fázi) a použít reagentie v místě a čase potřeby. K hlavním výhodám patří krátký čas analýzy, díky diskontinuálnímu toku nízká spotřeba organických rozpouštědel i vzorků, a tím i nízká produkce odpadů. To umožňuje snížení nákladů na analýzu (přibližně dvakrát oproti použití HPLC metody). Kromě nízké spotřeby vzorku je výhodou i jeho snadná příprava a manipulace s ním. Přístroj se snadno obsluhuje a je přenosný, což předurčuje tuto metodu k využití v terénu. SIC je jednoduchá separační metoda, která nevyžaduje tak drahé vybavení jako HPLC (levnější o cca 1/3 nákladů než u HPLC zařízení).

Na druhou stranu má SIC i řadu nevýhod, zejména při srovnání s HPLC. Nedostatkem SIC je, že má jen omezenou možnost separace. V nízkotlakém systému se dají použít převážně kratší monolitické kolony, při použití delších kolon je metoda

limitována omezeným výběrem průtokové rychlosti kvůli zpětnému tlaku. Další omezení klade pumpa, díky níž se dá použít pouze omezené množství mobilní fáze. Je také méně přesná, což má negativní vliv na robustnost systému. V neposlední řadě je nevýhodou i to, že komerčně dostupný program nabízí pro hodnocení kvantifikace pouze výšky píků, a to vnáší větší nepřesnost při hodnocení než při HPLC analýze [7, 11, 13–20].

2.2.4 Využití SIC

Zpočátku byla SIC využívána k analýze relativně jednoduchých vzorků, složených ze dvou až pěti komponent [15, 17]. První využití systému SIC bylo k analýze krému, který obsahoval triamcinolon acetonid, metylparaben a propylparaben [14]. Dále byly jako vzorky použity tablety, kapsle, kapky a sirupy [7, 17]. V **tabulce č. 1** jsou uvedeny látky zpracované v různých lékových formách, které již byly popsány a je možné je s výhodou stanovit pomocí SIC.

Roztoky je možno většinou analyzovat přímo, zatímco ostatní vzorky musí být nejprve upraveny, protože lze analyzovat pouze kapalně vzorky, a to z důvodu, aby matrice a pomocné látky neinterferovaly při chromatografickém měření. Kvůli těmto skutečnostem se polotuhé lékové formy i tablety upravují nejčastěji extrakcí do organického rozpouštědla.

Další možností, jak rozšířit využití SIC, je spojení této metody s Francovou celou. Tento plně automatický systém slouží k testování liberace z polotuhých lékových forem *in vitro* [17].

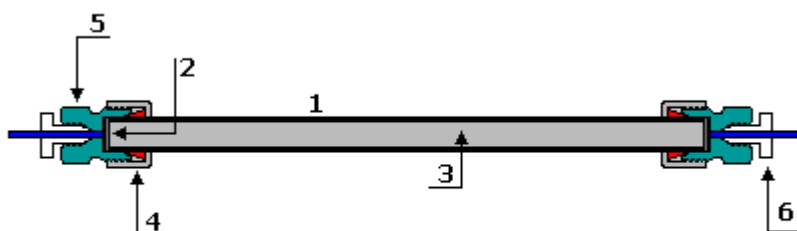
Tabulka 1. Možnosti využití SIC a parametry, za kterých bylo stanovení provedeno [17].

Léková forma	Stanovovaná látka	Délka kolony [mm]	Průtoková rychlost [ml.min ⁻¹]	Mobilní fáze	Vlnová délka detekce [nm]	Příprava vzorku	Čas [min]	Literatura
Sirupy a kapky	Ambroxol, metylparaben, kyselina benzoová	50 + 10	0,48	Acetonitril:tetrahydrofuran:voda (10:10:90, v/v/v), pH 3,75 upraveno triethylaminem a kyselinou octovou	245	Extrakce mobilní fázi	<11	[21]
Kapky	Nafazolin nitrát, metylparaben	25 + 5	0,9	Metanol:voda (40:65, v/v), pH 5,2 upravené triethylaminem a kyselinou octovou	220; 256	Rozpuštění kapek	<4	[11]
Kapky	Triamcinolon acetonid, kyselina salicylová	50 + 5	0,9	Acetonitril:voda (35:65, v/v), pH 3,2 upravené kyselinou octovou	240	Rozpuštění kapek	<7	[16]
Kapky	Betametazon, chloramfenikol	25 + 5	0,48	Acetonitril:voda (30:80, v/v)	241;271	Extrakce metanolem s 1% kys. fosforečné	<8	[22]
Krém	Triamcinolon acetonid, metylparaben, propylparaben	25 + 10	0,6	Acetonitril: metanol:voda (35:5:65, v/v/v), pH 2,5 upravené 0,05% nonylamidem a kys. fosforečnou	243	Extrakce metanolem	<6	[14]
Krém	Kyselina salicylová, metylsalicylát	50	0,6	Acetonitril:voda (35:60, v/v), pH 2,5 upravené 98% kys. fosforečnou	240	Extrakce metanolem	<7	[24]
Krém	Sodná sůl diklofenaku, metylparaben, propylparaben	25	0,48; 0,9; 1,2	Acetonitril:voda (40:70, v/v), pH 2,5 upravené 0,05% triethylaminem a kys. fosforečnou	275	Extrakce metanolem	<8	[13]
Kapsle	Ambroxol hydrochlorid, doxycyklin	25	0,48	Acetonitril:voda (20:90, v/v), pH 2,5 upravené 98% kys. fosforečnou	213	Extrakce metanolem s 1% kys. fosforečné	<9	[25]
Tablety	Paracetamol, kofein, kyselina acetylsalicylová	25	0,6	Acetonitril:voda (10:90, v/v), pH 4,05 upravené 98% kys. fosforečnou	210	Extrakce metanolem a mobilní fázi	<7	[15]
Krém	Lidokain, prilokain	25	0,6	Acetonitril:voda (40:80, v/v), pH 7,1 upravené 0,01% triethylaminem a kys. fosforečnou	212	Automatický systém k testování liberace z polotuhých lékových forem	<7	[20]

2.3 Chromatografické kolony

Chromatografická kolona je ocelová nebo skleněná trubička nebo kapilára nejčastěji 5 – 30 cm dlouhá o vnitřním průměru 2 – 8 mm rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází (sorbentem) [26, 27]. Na povrchu chromatografické kolony je kovový plášť (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2). Ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6) [28]. Schéma chromatografické kolony je zobrazeno na **obrázku č. 7**.

Obrázek 7. Chromatografická kolona [28].



Pro účinné rozdělení látek uvnitř kolony je důležitá kvalita sorbentu, přičemž záleží na velikosti a stejnoměrnosti částic, tvaru, porositě i struktuře [27].

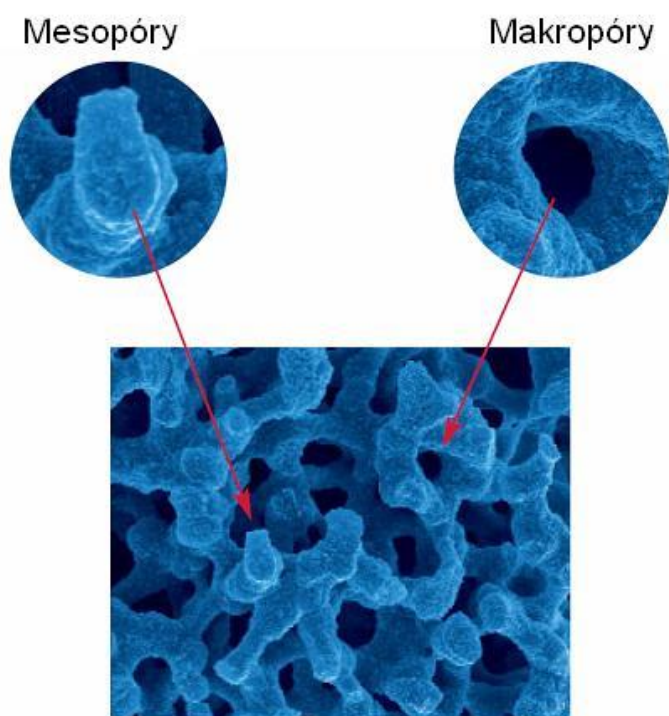
2.3.1 Monolitické kolony

Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek chromatografické kolony [29, 30]. Stacionární fáze monolitické kolony může být tvořena buď makroporézním organickým polymerem, vznikajícím odlitím, nebo tyčinkou silikagelu, která se vyrábí pomocí „sol-

gel“ technologie. Tyčinky silikagelu mají rovnoměrnější strukturu než prvně jmenovaný monolit.

Pórovitý materiál, který tvoří jádro monolitické kolony, obsahuje dva typy pórů, makropóry a mesopóry. Makropóry jsou mezi sebou propojeny kanálky a zajišťují tak rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit. Tyto v průměru 2 μm velké póry významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Mesopóry mají průměr přibližně 13 nm a nacházejí se na povrchu monolitu, který tvoří makropóry. Tyto póry poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační kapacitu. Takováto struktura monolitu s celkovou pórovitostí více než 80% umožňuje značně vysokou rychlost průtoku mobilní fáze kolonou bez přílišného zvýšení tlaku i bez ztráty separační účinnosti kolony [29 - 31]. Struktura monolitu je zachycena na **obrázku č. 8**.

Obrázek 8. Snímek příčného řezu monolitu, pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem [29].



Strukturou monolitu na bázi silikagelu se začali zabývat vědci kolem profesora Nakanishi a Tanaky v 90. letech 20. století. Monolit připravili kyselou katalyzovanou

hydrolyzou a gelací roztoku alkoxyasilanu (např. tetramethoxysilan) v přítomnosti porogenu (např. polystyrenulfonát sodný, polyakrylová kyselina, polyethylen oxid). Nyní lze připravit monolit s přesně definovanou strukturou s makropóry a mesopóry vhodných rozměrů [29, 30], přičemž záleží na složení rozpouštědla, koncentraci porogenu a na teplotě. Průměrná velikost mesopórů se zvětšuje s rostoucí koncentrací porogenu; velké póry nejsou propojené, pokud je porogen přítomný pouze v nízké koncentraci a naopak pokud je přítomen ve vysoké koncentraci, vznikají oddělené částice [30]. Na vytvořený silikagelový monolit je možné navázat alkylové řetězce nebo jiné chemické skupiny stejným způsobem jako v případě silikagelových částic. V současné době jsou komerčně dostupné monolitické kolony Chromolith od firmy Merck (Německo) nebo kolony Onyx od firmy Phenomenex (USA) v licenci firmy Merck.

Účinnost monolitických kolon je srovnatelná s účinností klasické kolony s částicemi o velikosti 5 μm [29, 30], ale ve srovnání s klasickými kolonami klesá účinnost monolitických kolon s rostoucí rychlostí mobilní fáze pomaleji, což umožňuje zrychlení analýzy nebo zařazení více kolon za sebou při relativně vysoké průtokové rychlosti [30].

2.4 Validace analytické metody

Validace analytické metody je proces, při kterém se posuzuje vhodnost použití daného systému k získání relevantních dat, a to stanovením požadavků na kritéria metody (validační parametry) a měřením reálných hodnot těchto kritérií [28, 32].

2.4.1 Vybrané validační parametry

2.4.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater (N)

Účinnost kolony (zdánlivá účinnost) se může vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater (N) za použití následujícího vzorce, kde hodnoty t_R a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

kde:

t_R je retenční čas píku odpovídajícího dané složce;

w_h je šířka píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, stejně jako s kolonou, teplotou kolony, mobilní fází a retenčním časem [33].

2.4.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků (A_s)

Faktor symetrie píku se vypočítá podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

kde:

$w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky;

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Pokud je hodnota A_s rovna 1,0 pík je dokonale symetrický. Je-li $A_s > 1,0$ mluvíme o chvostování píku, je-li $A_s < 1,0$ jedná se o čelní asymetrii píku neboli frontování píku (pozdvolný náběh) [28, 33].

2.4.1.3 Rozlišení chromatografických píků (R_s)

Rozlišení mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde:

t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy píků;

w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v poloviční výšce;

přičemž $t_{R2} > t_{R1}$ [33].

2.4.1.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu, provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu [34].

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky [*RSD (%)*] v procentech pro řadu následných měření pro nejméně tři nástřiky nebo pro měření porovnávacího roztoku a vypočítá se podle vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

kde:

y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;

\bar{y} je průměr jednotlivých hodnot;

n je počet jednotlivých hodnot [33].

2.4.1.5 Linearita odezvy

Linearita je přímková závislost mezi dvěma proměnnými. V separačních metodách jsou těmito proměnnými odezva a koncentrace analytu. Nejčastěji se k hodnocení linearity odezvy používá korelační koeficient, který se stanovuje metodou lineární regrese [35]. V ideálním případě je korelační koeficient roven jedné.

2.4.1.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Limit detekce (LOD) je hodnota, která odpovídá koncentraci, při které je zaznamenaný signál statisticky významně odlišný od šumu. V praxi se v separačních metodách limit detekce určuje jako trojnásobek šumu základní linie.

Mez stanovitelnosti, nebo-li limit kvantifikace (LOQ), můžeme definovat jako hodnotu, která odpovídá koncentraci, při níž je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

Vztah mezi oběma veličinami je následující:

$$LOQ=3 LOD$$

Čím větší bude rozdíl mezi výškou píku a šumem základní linie, tím nižší budou hodnoty LOD a LOQ [36].

3. Experimentální část

3.1 Použité materiály a metody

3.1.1 Chemikálie

Ultračistá voda Millipore Milli-Q RG (MilliporeTM s.r.o., Czech Republic)

Acetonitril LC – MS Chromasolv® (Fluka), čistota $\geq 99,9\%$

Metanol Chromasolv® (Sigma–Aldrich®), čistota $\geq 99,9\%$

3.1.2 Standardy

E-ol Vetranal® (Fluka), čistota: analytický standard

MP (Aldrich®), čistota 99%

EP (Aldrich®), čistota 99%

BE (Sigma), čistota $\geq 98\%$

17- α -ethynylestradiol (Fluka), čistota $\geq 98\%$

E-on (Aldrich®), čistota $\geq 99\%$

17- α -estradiol hemihydrát Vetranal® (Fluka), čistota: analytický standard

Flurbiprofen (Fluka), čistota: referenční standard

Ketoprofen Vetranal® (Fluka), čistota: analytický standard

3.1.3 Přístroje

Analytické váhy A200S (Sartorius Analytic)

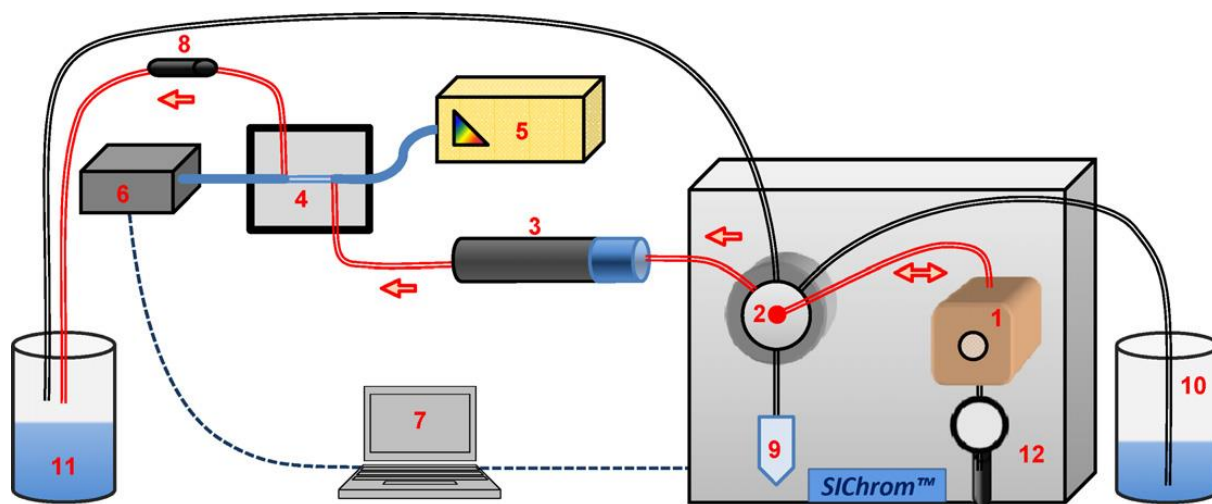
Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Bandelin)

Digitální pH – metr Hanna instruments pH 212

Chromatografický systém pro SIC tvořený přístrojem SICromTM (FIALab[®] Instruments Inc., Bellevue, WA, USA). Přístroj se sestával z pumpy S17 PDP

(Sapphire™ Engineering, MA, USA) s celkovým objemem 4 ml, vícecestného ventilu C5H (Valco Instrument Co., Houston, TX, USA) z nerezové oceli s osmi výstupy, umožňující výběr nastříkované kapaliny. Tyto kapaliny sem byly dopravovány 0.25 mm a 0.50 mm širokými hadičkami PEEK ze zásobníků. Vzorek byl pumpou nastříknut na chromatografickou kolonu, kde byly jednotlivé složky rozděleny na základě dělení na reverzní fázi a odkud pak vzorek pokračoval k průtokové detekční Z cele (FIALab® Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) CCD UV-VIS detektoru USB 4000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA). Detektor byl vybaven deuteriovou UV lampou DH-2000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA) a SMA optickými vlákny s vnitřním průměrem 600 μm (CeramOptec®, East Longmeadow, MA, USA). Po průchodu detekční celou směřovala tekutina do odpadní lahve. Na pumpu byl připojen manometr pro kontrolu tlaku uvnitř systému a pojistný ventil. Další pojistný ventil byl namontován za detekční celou, aby odsud kapalina samovolně neunikala, když se pumpa nepohybovala. Celý systém byl řízen počítačem programem FIALab® 5.9 software pro Windows (FIALab® Instruments Inc., Bellevue, WA, USA). Schéma celého systému je zobrazeno na **obrázku č. 9**.

Obrázek 9. Schéma chromatografického systému pro SIC. 1-pumpa, 2-ventil s osmi výstupy, 3-chromatografická kolona, 4-průtoková detekční Z cela, 5-UV lamp, 6-CCD UV-VIS detektor, 7-počítač vybavený programem FIALab, 8-pojistný ventil, 9-vzorek, 10-mobilní fáze, 11-odpad, 12-manometr s pojistným ventilem [19].



Použité chromatografické kolony:

Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm × 4,6 mm;

Merck® Chromolith® FastGradient RP-18e 50 mm × 2 mm;

Předkolona Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 4,6 mm;

Phenomenex Gemini® C18 30 mm × 2,00 mm, 3 micron;

Merck® Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm;

Předkolona Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm.

Průtoková detekční Z cela – optická délka 1 cm nebo 2 cm (mikroobjemová), SMA konektory, materiál ULTEM (FIALab® Instruments Inc., Bellevue, WA, USA).

3.1.4 Zásobní roztoky

Zásobní roztok E-ol o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg E-ol v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 10 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok AE o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg AE v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 10 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok BE o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg BE v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 10 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok EE o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg EE v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 10 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok E-on o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 5 mg E-on v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 10 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok MP o koncentraci 0,4 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 8 mg MP v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 20 ml v odměrné baňce.

Zásobní roztok EP o koncentraci 0,4 mg.ml⁻¹ byl připraven rozpuštěním navážky 8 mg EP v acetonitrilu a doplněním acetonitrilem na objem 20 ml v odměrné baňce.

3.1.5 Příprava vzorku

Vzorek byl připravován smísením zásobních roztoků jednotlivých látek a acetonitrilu. Počet a typ složek závisel na fázi vývoje metody. Estrogenní látky byly vždy zastoupeny ve vzorku ve stejném poměru, vnitřní standard byl přidáván v menším množství. Mobilní fázi se doplňoval objem smíchaných látek zpravidla do 1 ml.

3.1.6 Popis práce

Do zásobníku na mobilní fázi byla připravena mobilní fáze smísením určitého poměru acetonitrilu a vody a následným zbavením rozpuštěného vzduchu pomocí ultrazvukové lázně. Tento zásobník byl připojen hadičkou na výstup selekčního ventilu č. 2.

Vzorek byl připraven smísením určitého poměru testovaných látek ze zásobních roztoků v ependorfce a ručně protřepán. Ependorfka byla připojena pomocí hadiček na výstup selekčního ventilu č. 4.

V programu FIALab[®] 5.9 pro Windows byl zvolen program analýzy, který zabezpečil, aby pumpa nasála výstupem č. 2 určité množství mobilní fáze, poté výstupem č. 4 určité množství vzorku a tuto směs nastříkla výstupem č. 3 na chromatografickou kolonu. Dále detektor změřil absorbanci záření při třech různých vlnových délkách a chromatografický záznam byl zobrazen na monitoru počítače. Mobilní fáze poté odtékala z kolony hadičkou do odpadní lahve.

Chromatogram byl hodnocen dle retenčních časů chromatografických píků a jejich rozdělení. Podle těchto parametrů byly dále upravovány podmínky separace.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Vývoj a optimalizace metody SIC pro látky estrogenního charakteru

4.1.1 Výběr mobilní fáze

Dle předchozích zkušeností s touto směsí estrogenních látek, která byla testována pomocí HPLC, byla připravena mobilní fáze. Jako organická složka byly testovány metanol a acetonitril. Acetonitril vykazoval lepší výsledky, proto byl dále pro optimalizaci využíván. Při výběru mobilní fáze byly testovány různé poměry acetonitrilu a vodné složky s různě upravenou hodnotou pH.

4.1.1.1 Úprava pH mobilní fáze

Nejprve byla vyzkoušena mobilní fáze acetonitril/voda (40:60, v/v). Jako vzorek byla použita směs všech testovaných estrogenů. Za těchto podmínek nebylo dosaženo kompletní separace. Proto bylo upraveno pH mobilní fáze na 3,7 pomocí kyseliny octové. Ani za těchto podmínek nedošlo ke kompletní separaci.

Po úpravě dalších parametrů (typ chromatografické kolony a nastavení optimálních vlnových délek detektoru) bylo zjištěno, že pH není třeba upravovat. Optimální pH mobilní fáze je pH směsi acetonitril/voda (40:60, v/v).

4.1.1.2 Úprava složení mobilní fáze

Při výběru optimální mobilní fáze byla upravována kromě jejího pH také její síla. Místo původní mobilní fáze acetonitril/voda (40:60, v/v) byla postupně připravena mobilní fáze acetonitril/voda (30:70, v/v), acetonitril/voda (20:80, v/v) a acetonitril/voda (10:90, v/v). Jako vzorek byl použit E-ol (látko s nejmenší retencí). Pro testování byly použity všechny výše zmíněné kolony. Pík E-ol nebyl na chromatogramu oddělen od šumu mrtvého objemu. Dále byl měněn typ

chromatografické kolony, vlnové délky detektoru, množství nastříkovaného vzorku a rychlost, kterou byl vzorek nastříkován. Při složení mobilní fáze acetonitril/voda (30:70, v/v), chromatografické koloně Merck® Chromolith® FastGradient RP-18e 50 mm × 2 mm, Chromolith® RP-18e 5 × 4,6 mm, vzorku složeného ze všech estrogenů o koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹ (naředěno mobilní fází), který byl nastříkován v množství 10 µl a při vlnových délkách detekce 225 nm, 250 nm a 280 nm byl obdržén záznam, obsahující píky všech látek, avšak ne optimálně rozdělených.

Jako optimální mobilní fáze byl nakonec zvolen poměr acetonitril/voda (40:60, v/v). K měření směsi všech pěti testovaných estrogenů s vnitřním standardem byla používána chromatografická kolona Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm s předkolonou Merck® Chromolith® RP-18e 5 × 3 mm.

4.1.2 Vytvoření a optimalizace programu analýzy

Program analýzy byl vytvářen pomocí programu FIALab® 5.9 pro Windows. V průběhu práce byla měněna průtoková rychlost, množství mobilní fáze i vzorku pro jednu analýzu a vlnové délky UV detekce.

V první fázi vývoje metody byl pro analýzu pěti estrogenů a vnitřního standardu MP používán program s dvojím nástřikem mobilní fáze. Pumpa nasála 3100 µl mobilní fáze výstupem č. 2, poté 10 µl vzorku výstupem č. 4 a tuto směs nastříkla výstupem č. 3 na chromatografickou kolonu. Detektor měřil absorbanci záření při třech různých vlnových délkách (215 nm, 225 nm a 280 nm) a první část chromatografického záznamu (E-ol a MP) byla zobrazena na monitoru počítače. Poté pumpa nasála 3900 µl mobilní fáze výstupem č. 2 a nastříkla ji výstupem č. 3 na chromatografickou kolonu, což zajistilo eluci zbývajících čtyř estrogenů. Detektor opět měřil absorbanci při stejných vlnových délkách jako při prvním nástřiku a na monitoru počítače byla zobrazena druhá část chromatografického záznamu (BE, AE, EE, E-on). Celá analýza trvala 14,3 min. Pro lepší přehlednost je celý program zaznamenán v **tabulce č. 2**.

Tabulka 2. Program analýzy pěti estrogenů a vnitřního standardu MP.

Úkon	Jednotka	Parametry úkonu
Nasátí mobilní fáze	Ventil	Výstup č. 8 – zásobník MF
	Pumpa	Rychlost nasávání 70 $\mu\text{l.s}^{-1}$
Nasátí vzorku	Pumpa	Objem MF 3100 μl
	Ventil	Výstup č. 5 – zásobník vzorku
	Pumpa	Rychlost nasávání 10 $\mu\text{l.s}^{-1}$
Nástřik směsi vzorek+MF na kolonu	Pumpa	Objem vzorku 10 μl
	Ventil	Výstup č. 3 - kolona
	Pumpa	Rychlost nástřiku 10 $\mu\text{l.s}^{-1}$
Měření absorbance	Detektor (spektrofotometr)	Objem směsi 3110 μl Vlnové délky 215 nm, 225 nm, 280 nm
Nasátí mobilní fáze	Ventil	Výstup č. 8 – zásobník MF
	Pumpa	Rychlost nasávání 70 $\mu\text{l.s}^{-1}$
	Pumpa	Objem MF 3900 μl
Nástřik MF na kolonu	Ventil	Výstup č. 3 - kolona
	Pumpa	Rychlost nástřiku 10 $\mu\text{l.s}^{-1}$
	Pumpa	Objem směsi 3910 μl
Měření absorbance	Detektor (spektrofotometr)	Vlnové délky 215 nm, 225 nm, 280 nm

Po optimalizaci metody, kdy byla z testování vypuštěna látka s nejmenší retencí na koloně (E-ol) byl pro analýzu čtyř estrogenů a vnitřního standardu EP vytvořen program, který zajistil, aby pumpa nasála 3000 μl mobilní fáze výstupem č. 2 a 10 μl vzorku výstupem č. 4 a nastříkla tuto směs na chromatografickou kolonu výstupem č. 3.

Detektor změřil absorbanci při třech různých vlnových délkách (215 nm, 225 nm a 280 nm) a na monitoru počítače byl zobrazen celý chromatografický záznam s následujícím pořadím chromatografických pík látek: EP, BE, AE, EE, E-on. Analýza trvala 7,5 min. Pro přehlednost je uvedena **tabulka č. 3** s jednotlivými úkony.

Tabulka 3. Program analýzy čtyř estrogenů a vnitřního standardu EP.

Úkon	Jednotka	Parametry úkonu
Nasátí mobilní fáze	Ventil	Výstup č. 2 – zásobník MF
	Pumpa	Rychlost nasávání 70 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
	Pumpa	Objem MF 3000 μl
Nasátí vzorku	Ventil	Výstup č. 4 – zásobník vzorku
	Pumpa	Rychlost nasávání 10 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
	Pumpa	Objem vzorku 10 μl
Nástřik směsi vzorek+MF na kolonu	Ventil	Výstup č. 3 - kolona
	Pumpa	Rychlost nástřiku 8 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
	Pumpa	Objem směsi 3010 μl
Měření absorbance	Detektor (spektrofotometr)	Vlnové délky 215 nm, 225 nm, 280 nm

4.1.3 Výběr průtokové rychlosti, množství vzorku a mobilní fáze

Optimalizace množství vzorku, mobilní fáze a průtokové rychlosti byla provedena na vzorku, obsahujícím E-ol, AE, BE, EE a E-on, každý v koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Testování optimálního množství injikovaného vzorku probíhalo od 5 μl do 40 μl . Jako optimální množství vzorku bylo stanoveno 10 μl . Při větších množstvích již nebyly píky symetrické a pík E-ol nebyl dokonale oddělen od šumu mrtvého objemu.

Testování průtokové rychlosti bylo prováděno od rychlosti $5 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Jako nejvyšší průtoková rychlost byla zkoušena rychlost $15 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Optimální průtoková rychlost byla $10 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ a tato rychlost byla používána po většinu měření (menší rychlost byla používána při větších tlacích v systému).

Potřebné množství mobilní fáze se měnilo dle počtu testovaných analytů. Po optimalizaci metody stačilo pro analýzu čtyř estrogenních látek a EP pouze 3000 μl mobilní fáze v jednom nástřiku. Množství analyzovaného vzorku zůstalo stejné a průtoková rychlost mobilní fáze se snížila na $8 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.1.4 Výběr chromatografické kolony

V průběhu práce byly testovány všechny výše uvedené kolony, buď samotné, nebo v kombinaci. Vhodnost použití konkrétní chromatografické kolony byla hodnocena dle optimální retence látek na koloně, jejich ideální separace v co nejkratším retenčním čase a dle symetrie chromatografických píků.

Na začátku práce byla testována kolona Merck® Chromolith® FastGradient RP-18e 50 mm \times 2 mm s předkolonou Chromolith® RP-18e 5 \times 4,6 mm. Po vyzkoušení různého pH a síly mobilní fáze byla přidána k této soustavě kolon další kolona Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm \times 4,6 mm, vznikla tak kolona o délce 8 cm. S touto délkou kolony byla změřena směs analytů za použití mobilní fáze acetonitril:voda (25:75, v/v). Ani v jednom měření nebylo dosaženo optimální separace.

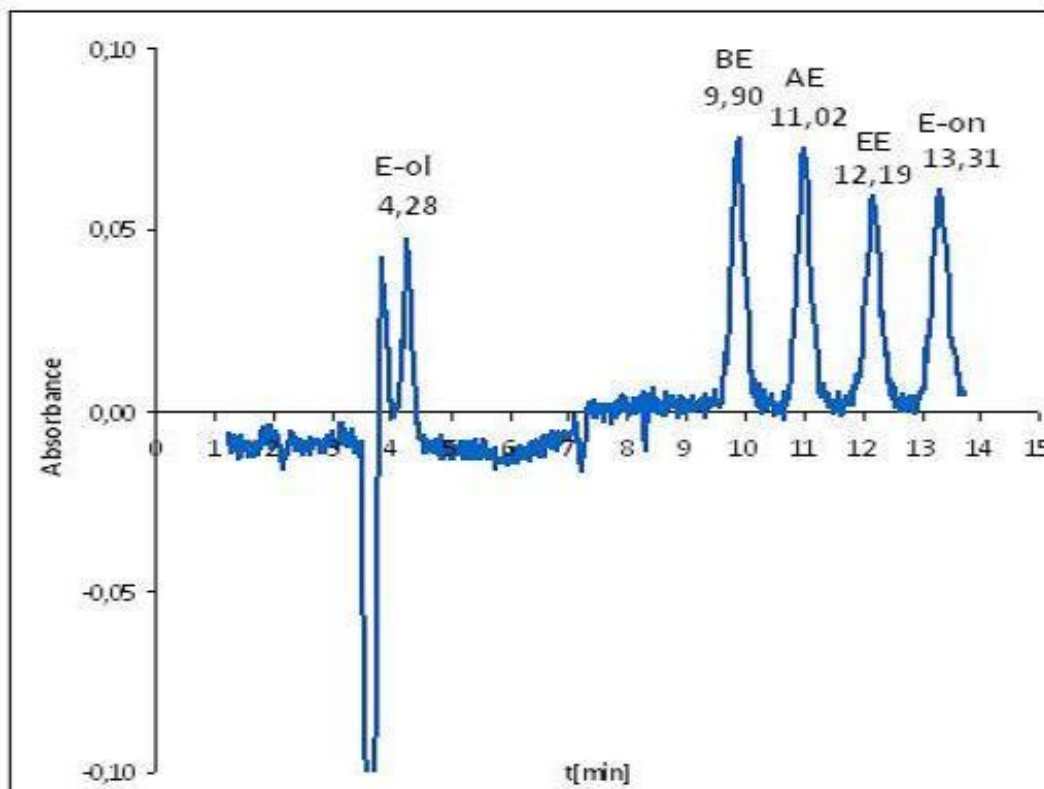
Z důvodu rychlé eluce vzorků byla vyzkoušena částicová kolona Phenomenex Gemini® C18 30 mm \times 2,00 mm, 3 micron, která lépe zadržuje látky než kolona monolitní. Při měření směsi pěti estrogenů se v průběhu analýzy nepodařilo všechny tyto látky kompletně eluovat.

Testovány byly také jednotlivě kolony Merck® Chromolith® FastGradient RP-18e 50 mm \times 2 mm a Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm \times 4,6 mm, ale ani jedna z nich nedokázala testované látky optimálně rozdělit v průběhu jedné analýzy.

Kvůli charakteru testovaných látek bylo vyzkoušeno zapojení třech monolitických kolon za sebou, a to Chromolith® Performance RP-18e 100 mm \times 3 mm, Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm \times 4,6 mm, Chromolith® RP-18e 5 mm \times 4,6 mm. S touto sérií kolon bylo provedeno měření směsi všech pěti testovaných estrogenů

za použití mobilní fáze acetonitril:voda (40:60, v/v). Na **obrázku č. 10** je zobrazen chromatografický záznam při vlnové délce 225 nm.

Obrázek 10. Chromatogram pěti estrogenů oddělených pomocí kolony sestavené z Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm, Merck® Chromolith® Flash RP-18e 25 mm × 4,6 mm, Chromolith® RP-18e 5 × 4,6 mm.



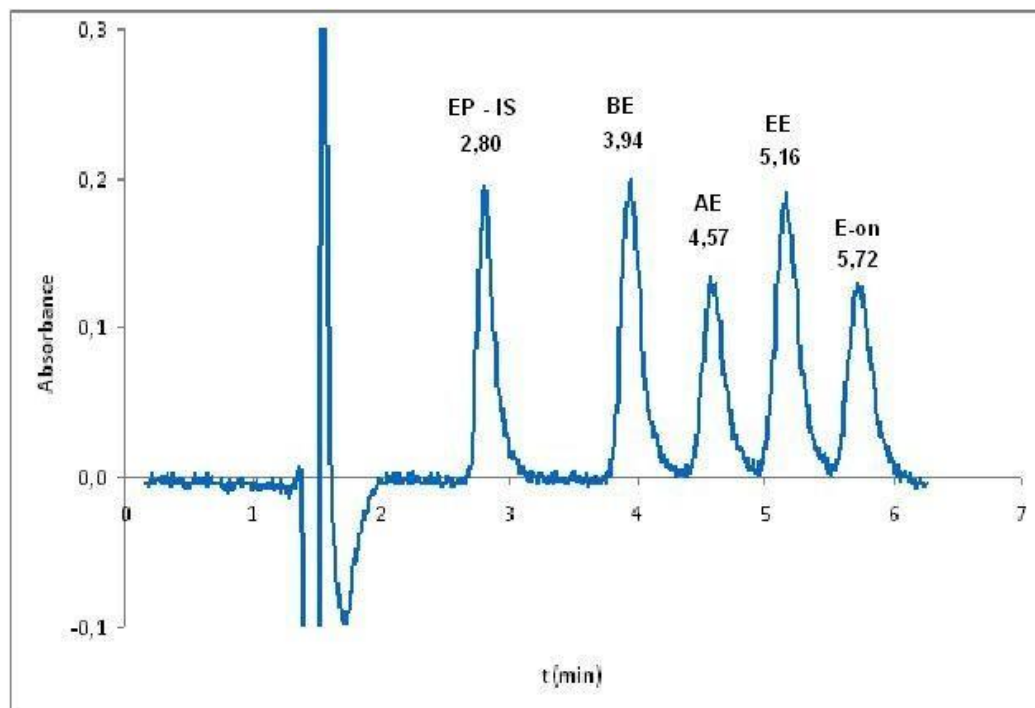
Z důvodu dobré separace směsi, obsahující pět estrogenních látek a vnitřní standard, byla tato série kolon použita i pro testování gradientové eluce (viz níže), vypracování kalibrační křivky a měření opakovatelnosti. V průběhu vývoje metody se však ukázalo, že chromatografická kolona složená ze série tří kolon vytvářela v systému příliš velký tlak, kvůli čemuž docházelo k přetlakování systému a úniku tekutiny pojistným ventilem.

Po optimalizaci metody, kdy byla z testování vypuštěna první látka, zobrazující se na chromatografickém záznamu (E-ol) a výměně vnitřního standardu (MP za EP), již nebylo třeba dvojitého nástřiku mobilní fáze v průběhu jedné analýzy a pro zbytek měření bylo možné používat chromatografickou kolonu Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm s předkolonou Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm.

Tato varianta umožnila zkrácení délky analýzy, lepší rozdělení píků na chromatografickém záznamu, a tím i lepší data pro validaci této metody.

Na **obrázku č. 11** je zobrazen chromatografický záznam vnitřního standardu (EP) a čtyř testovaných estrogenů při vlnové délce 225 nm.

Obrázek 11. Chromatogram čtyř estrogenů s vnitřním standardem (EP) oddělených pomocí kolony Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm s předkolonou Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm.



Monolitická kolona Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm byla v další práci srovnávána s částicovou kolonou Ascentis® Express C18 30 mm × 4,6 mm. Kolona Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm vykazovala lepší účinnost systému, avšak retenční časy byly delší [19].

4.1.5 Výběr způsobu detekce

Dle předchozích zkušeností byla práce zahájena se spektrofotometrickým způsobem detekce v UV oblasti. Pro větší citlivost fluorimetrické detekce byla vyzkoušena i tato možnost, avšak nepřinesla lepší odezvu, a to ani při užití CCD detektoru, ani po připojení fotonásobiče k přístroji. Po úpravě dalších parametrů (délka a typ chromatografické kolony, vlnové délky absorpce, nastříkované množství vzorku i mobilní fáze a průtoková rychlost) se spektrofotometrický způsob detekce ukázal jako optimální.

4.1.6 Výběr detekční cely

Dle předchozích zkušeností byla vybrána průtoková Z cely o délce 2 cm. Tato cely byla obalena černou páskou z důvodu snahy omezení šumu v záznamu. Ze stejného důvodu byla testována cely o délce 1 cm, nejprve bez obalení páskou a poté obalená černou páskou. Efekt délky optické dráhy nebyl dost výrazný, proto byla v průběhu celé práce používána průtoková Z cely o délce 2 cm bez černé pásky.

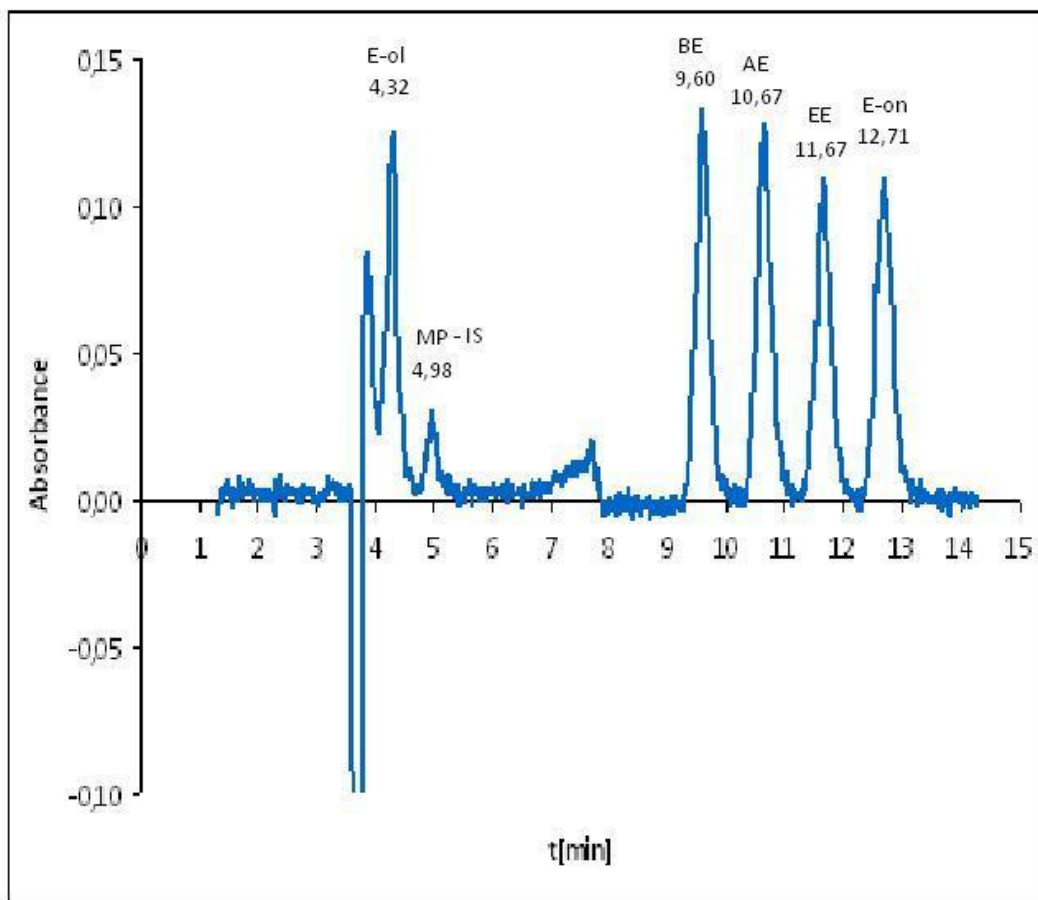
4.1.7 Výběr vlnové délky detekce

Na začátku práce probíhalo měření při vlnových délkách 210 nm, 225 nm a 240 nm. Kvůli nekvalitnímu záznamu byly vlnové délky upravovány. Dále byly testovány další dvě kombinace vlnových délek (210 nm, 225 nm, 230 nm a 225 nm, 250 nm, 280 nm). Obě tyto kombinace nepřinesly kvalitnější záznam. Jako optimální kombinace vlnových délek pro měření čtyř estrogeních látek s vnitřním standardem ze skupiny parabenů byly zvoleny vlnové délky 215 nm, 225 nm a 280 nm. Pro kvantifikaci byla použita vlnová délka 225 nm s lepšími výsledky díky dostatečné absorpci záření všemi testovanými látkami.

4.1.8 Výběr vnitřního standardu

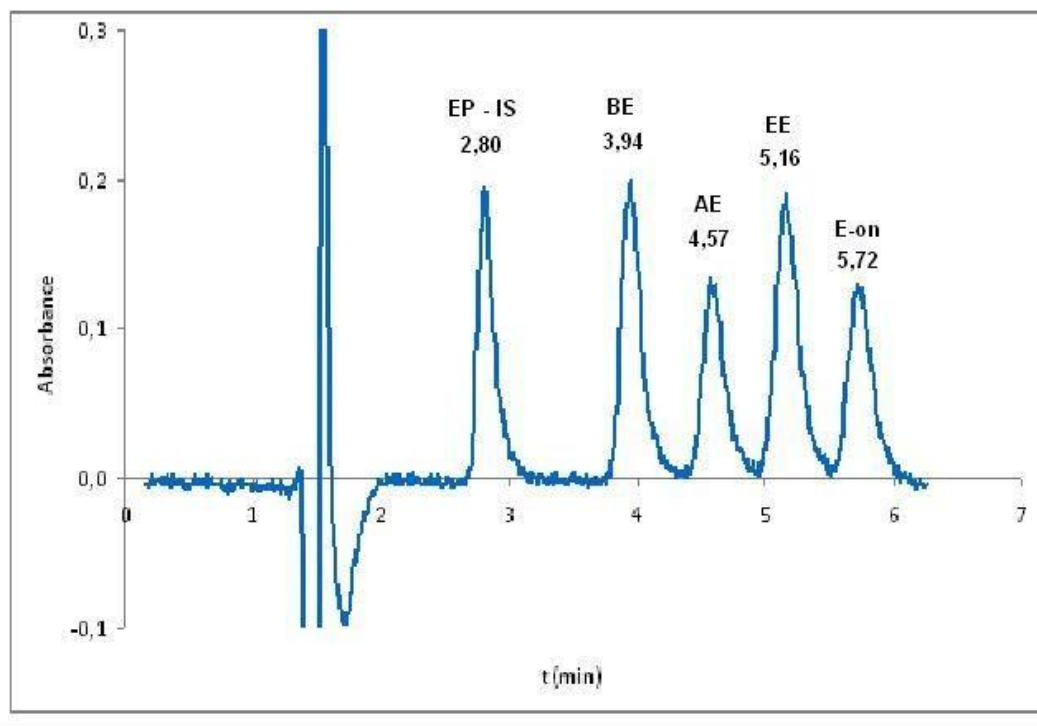
Vnitřní standard byl vybírán ze dvou skupin látek. První skupinu tvořila nesteroidní antiflogistika (profeny) zastoupená flurbiprofenem a ketoprofenem, druhou skupinu tvořily konzervační látky (parabeny) zastoupené metyl-, etyl-, propyl- a butylparabenem. Nejprve byl testován samotný E-ol s vnitřním standardem, jelikož se jeho pík na chromatografickém záznamu objevuje jako první a dle předpokladů se i vnitřní standard bude zobrazovat blízko mrtvého objemu. Pík flurbiprofenu i ketoprofenu nebyl jasně oddělený od E-ol, MP se ukázal jako vhodný vnitřní standard při testování všech pěti estrogenů. Jeho pík byl dostatečně separován od E-ol a zároveň vykazoval vhodný retenční čas. Chromatografický záznam pěti testovaných estrogenů za použití vnitřního standardu MP je zobrazen na **obrázku č. 12**.

Obrázek 12. Chromatogram pěti estrogenů a vnitřního standardu MP.



Po optimalizaci metody, kdy byl z testování vypuštěn E-ol, se jako vhodnější vnitřní standard ukázal EP. Jeho pík je svým retenčním časem bližší BE a s žádnou testovanou látkou neinterferuje. Ukazuje se na záznamu po píku mrtvého objemu jako první, hned za jeho píkem se objevuje pík BE, AE, EE a E-on. Chromatografický záznam čtyř estrogenů s EP je zobrazen na **obrázku č. 13**.

Obrázek 13. Chromatogram čtyř estrogenů a vnitřního standardu EP.



4.1.9 Testování izokratické eluce

Za účelem lepší separace E-ol od šumu mrtvého objemu byla provedena analýza izokratické eluce pouze s tímto estrogenem společně s vnitřním standardem MP. E-ol byl obsažen ve vzorku v koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MP v koncentraci $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na začátku testování byla použita ideální mobilní fáze, acetonitril:voda (40:60, v/v), a po každém měření byl přidán 1 ml vody do stávající mobilní fáze. Tento krok byl proveden osmkrát až do koncentrace ACN:voda (30:70, v/v). Záznam se s rostoucí polaritou mobilní fáze měnil ve smyslu rozšíření píků bez vlivu na separaci. **Tabulka č. 4** shrnuje retenční časy dvou testovaných látek v závislosti na polaritě mobilní fáze.

Tabulka 4. Retenční časy látek při izokratické eluci.

	Retenční čas látek [s]	E-ol	MP
Síla mobilní fáze ACN:voda (v/v)	40:60	217,16	246,45
	38,75:61,25	218,91	248,02
	37,5:62,5	220,34	249,44
	36,25:63,75	222,42	252,38
	35:65	225,01	256,95
	33,75:66,25	227,58	259,48
	32,5:67,5	231,87	265,27
	31,25:68,75	235,06	270,51
	30:70	239,98	275,28

4.1.10 Testování gradientové eluce

Pro směs všech pěti estrogenů společně s vnitřním standardem (MP) byl použit gradient dvou mobilních fází. Při prvním nástřiku bylo použito 3100 µl mobilní fáze acetonitril:voda (35:65, v/v) a při druhém nástřiku 3900 µl mobilní fáze acetonitril:voda (40:60, v/v). Rozdíl mezi polaritou mobilních fází nebyl dostatečně velký, proto byla pro druhý nástřik zvolena mobilní fáze acetonitril:voda (45:55, v/v) o stejném objemu. Při gradientové eluci nebylo dosaženo oddělení BE od šumu mrtvého objemu a analýza se prodloužila tak, že nedošlo ke kompletní eluci všech látek. Gradientová eluce není vhodná pro analýzu vybraných látek estrogenní povahy.

4.1.11 Testování vlivu zvýšené teploty

Testování vlivu teploty mobilní fáze na chromatografický záznam bylo započato při teplotě laboratoře, která ten den činila 23,5°C. Poté byla mobilní fáze zahřáta vždy o 10°C až k teplotě 55°C. Měření bylo prováděno se vzorkem, který obsahoval MP, E-ol, AE, BE, EE a E-on. Tento experiment nepřinesl oproti očekávání lepší výsledky než izokratická eluce a při vyšších teplotách se acetonitril začal z mobilní fáze odpařovat, což mělo za následek změnu složení mobilní fáze a vyšší retenci analytů než při laboratorní teplotě, proto byla tato analýza ukončena. V **tabulce č. 5** jsou shrnuty

retenční časy jednotlivých látek při různých testovaných teplotách. Zaznamenané teploty jsou v tabulce uvedeny chronologicky. Při vyšších teplotách a s rostoucím počtem analýz měly retenční časy píků nedostatečnou opakovatelnost, zejména v druhé části analýzy po druhém nástřiku mobilní fáze, kde již byla nižší koncentrace ACN než na začátku testování teplotního gradientu. Vyšší teplota není vhodná pro testování pěti estrogenů s vnitřním standardem MP.

Tabulka 5. Retenční časy látek při testování vlivu zvýšené teploty.

	teplota [°C]	23,5	24,5	36,5	35,0	47,0	46,0	55,0	55,0
Retenční čas látek [s]	MP	137,8	138,7	139,9	138,9	139,2	139,8	141,7	138,9
	E-ol	169,0	168,5	170,2	169,5	169,6	169,6	172,0	168,0
	AE	369,6	368,6	370,5	369,3	375,1	379,0	396,5	417,1
	BE	421,9	420,4	423,1	421,9	429,7	435,5	458,9	464,9
	EE	475,7	474,2	476,9	474,9	483,2	489,8	523,4	509,2
	E-on	522,0	522,0	522,2	522,3	531,5	538,6	573,3	-

4.1.12 Souhrn optimálních podmínek SIC pro estrogení látky

Testované látky: AE, BE, EE, E-on

Vnitřní standard: EP

Mobilní fáze: ACN:voda 40:60 (v/v)

Analyzátor: SICromTM

Detektor: CCD UV-VIS detektor

Detekční cela: průtoková Z cela 2 cm

Chromatografická kolona: monolitická Merck® Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm + předkolona Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm

Detekce: spektrofotometrická UV 225 nm

Množství vzorku pro jednu analýzu: 10 µl

Množství mobilní fáze pro jednu analýzu: 3 ml

Průtoková rychlost: 8 µl.s⁻¹

Celkový čas analýzy: 7,5 min

4.2 Validace analytické metody

4.2.1 Stanovení linearitý odezvy

Linearita odezvy byla stanovena pro každou testovanou látku metodou lineární regrese. Bylo připraveno šest pracovních roztoků ze směsi základních roztoků estrogenů (AE, BE, EE a E-on) v koncentračním rozmezí 25,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až 1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a EP v koncentračním rozmezí 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v mobilní fázi. Každá směs byla proměřena třikrát a z těchto třech měření byla pro výpočet použita průměrná hodnota zaznamenané koncentrace dané látky. V následujících tabulkách a grafech jsou zaznamenány parametry lineární regrese pro jednotlivé látky.

4.2.1.1 Etylparaben

Korelační koeficient EP je po zaokrouhlení 0,999. EP vyhovuje požadavku na linearitu $r > 0,999$.

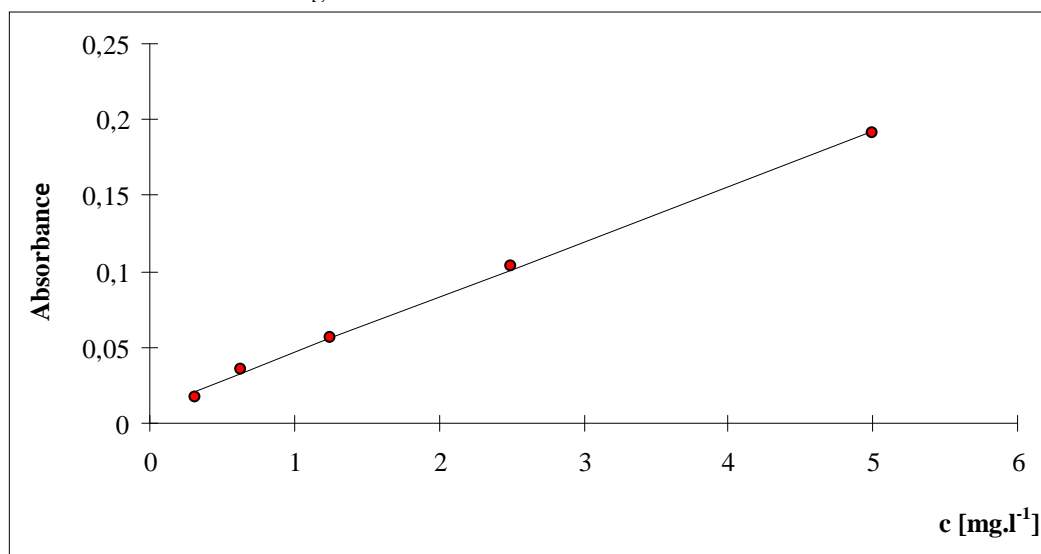
Tabulka 6. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci EP.

c [mg.l ⁻¹]	Absorbance
5,0000	0,1907
2,5000	0,1033
1,2500	0,0566
0,6250	0,0359
0,3125	0,0165

Tabulka 7. Statistické parametry pro regresi EP.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 5	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,036417	± 0,000976
Abs. Člen	q = 0,010042	± 0,002520
Korelační koef.	r = 0,998924	
Reziduální odch.	s = 0,003722	

Obrázek 14. Graf lineární regrese EP.



4.2.1.2 β -estradiol

Korelační koeficient BE je po zaokrouhlení 0,999. BE vyhovuje požadavku na linearitu $r > 0,999$.

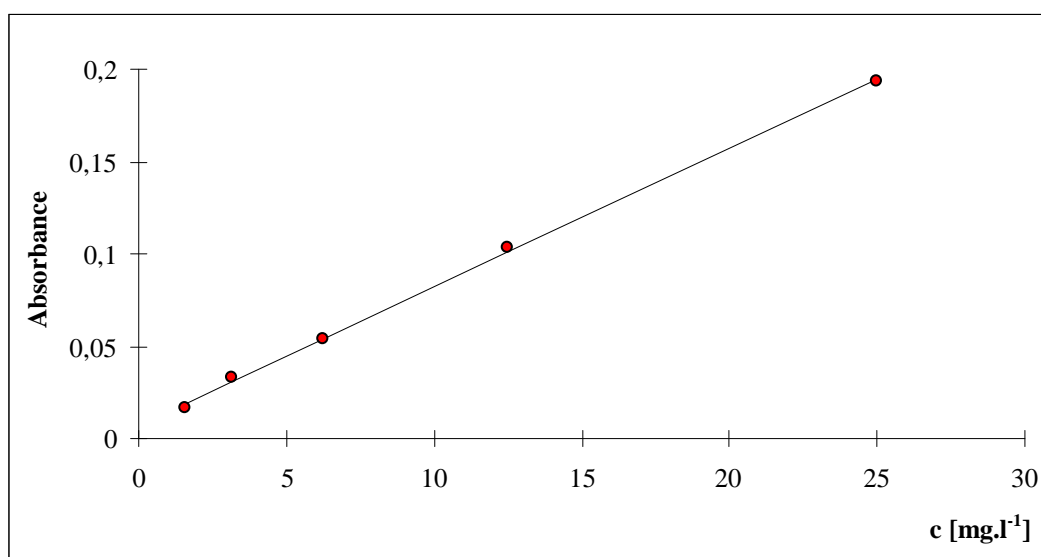
Tabulka 8. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci BE.

c [mg.l ⁻¹]	Absorbance
25,000	0,1934
12,500	0,1036
6,250	0,0533
3,125	0,0330
1,613	0,0161

Tabulka 9. Statistické parametry pro regresi BE.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 5	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,007499	± 0,000152
Abs. člen	q = 0,007155	± 0,001956
Korelační koef.	r = 0,999388	
Reziduální odch.	s = 0,002886	

Obrázek 15. Graf lineární regrese BE.



4.2.1.3 α -estradiol

Korelační koeficient AE je po zaokrouhlení 0,999. AE vyhovuje požadavku na linearitu $r > 0,999$.

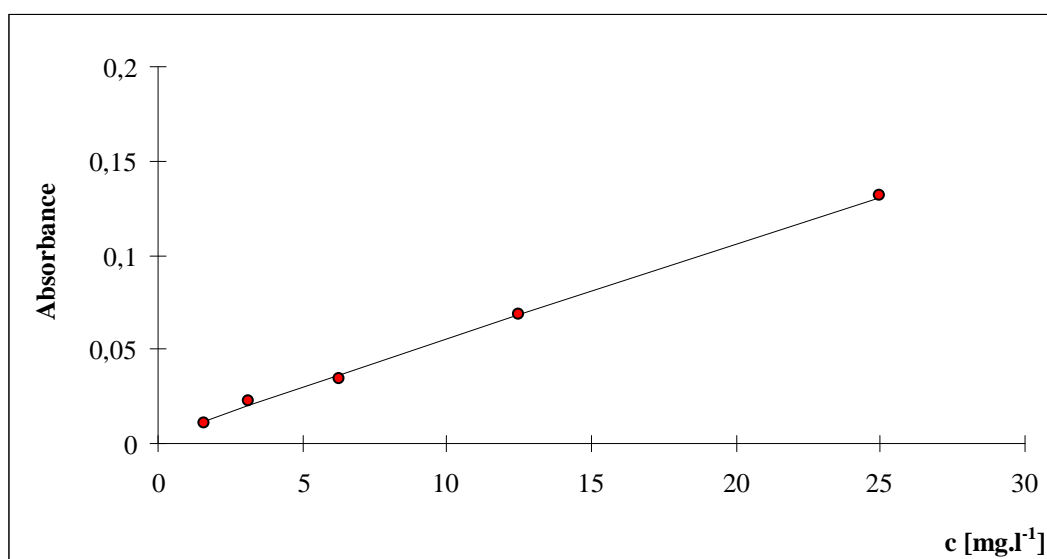
Tabulka 10. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci AE.

c [mg.l ⁻¹]	Absorbance
25,000	0,1313
12,500	0,0687
6,250	0,0344
3,125	0,0226
1,613	0,0111

Tabulka 11. Statistické parametry pro regresi AE.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 5	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,005088	± 0,000103
Abs. člen	q = 0,004281	± 0,001326
Korelační koef.	r = 0,999389	
Reziduální odch.	s = 0,001956	

Obrázek 16. Graf lineární regrese AE.



4.2.1.4 Ethynylestradiol

Korelační koeficient EE je po zaokrouhlení 0,999. EE vyhovuje požadavku na linearitu $r > 0,999$.

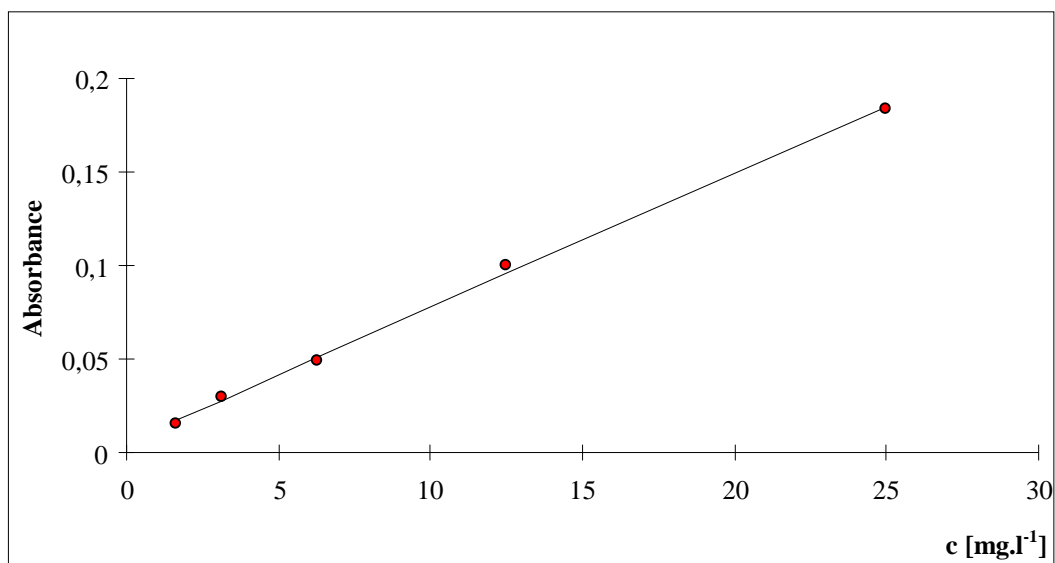
Tabulka 12. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci EE.

c [mg.l ⁻¹]	Absorbance
25,000	0,1835
12,500	0,1001
6,250	0,0487
3,125	0,0296
1,613	0,0153

Tabulka 13. Statistické parametry pro regresi EE.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 5	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,007179	± 0,000176
Abs. člen	q = 0,0058	± 0,002274
Korelační koef.	r = 0,999097	
Reziduální odch.	s = 0,003355	

Obrázek 17. Graf lineární regrese EE.



4.2.1.5 Estron

Korelační koeficient E-on je po zaokrouhlení 0,999. E-on vyhovuje požadavku na linearitu $r > 0,999$.

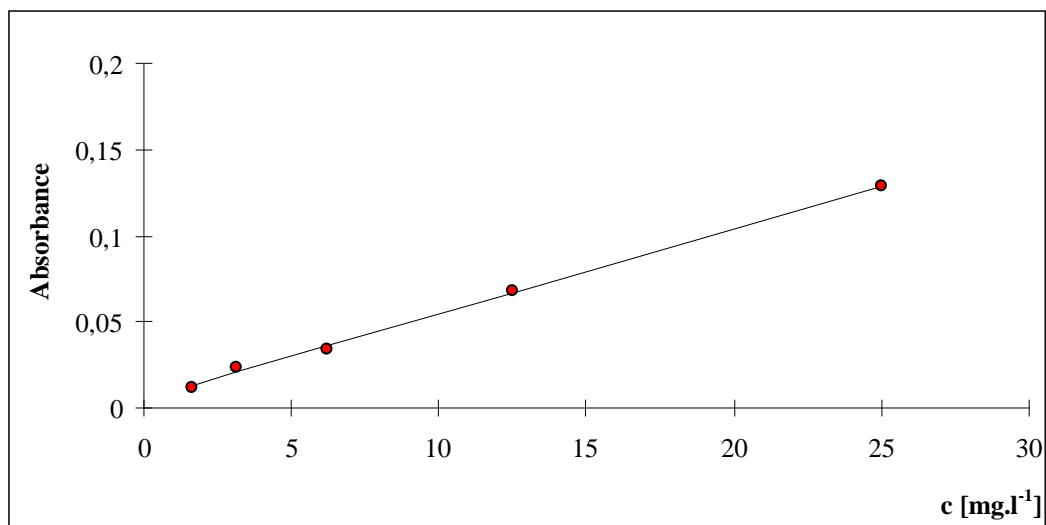
Tabulka 14. Závislost průměrné výšky píku na koncentraci E-on.

c [mg.l ⁻¹]	Absorbance
25,000	0,1292
12,500	0,0680
6,250	0,0342
3,125	0,0235
1,613	0,0120

Tabulka 15. Statistické parametry pro regresi E-on.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n = 5	Odhad chyby
Směrnice	k = 0,004963	± 0,000113
Abs. člen	q = 0,005228	± 0,001458
Korelační koef.	r = 0,999223	
Reziduální odch.	s = 0,002151	

Obrázek 18. Graf lineární regrese E-on.



4.2.2 Stanovení limitu detekce a limitu kvantifikace

Limit kvantifikace byl stanoven pro pět testovaných látek. LOD byl určen jako koncentrace, kdy odezva je rovna trojnásobku šumu. LOQ byl určen jako trojnásobek LOD. LOQ byla pro tyto účely považována nejnižší hodnota kalibrační přímky. Závislost těchto dvou parametrů vyjadřuje níže uvedený vztah:

$$LOQ = 3 \cdot LOD$$

Hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny pro jednotlivé látky v **tabulce č. 16**.

Tabulka 16. Hodnoty LOD a LOQ.

Analyzovaná látka	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
EP	0,1	0,3
BE	0,5	1,6
AE	0,5	1,6
EE	0,5	1,6
E-on	0,5	1,6

4.2.3 Stanovení zdánlivého počtu teoretických pater

Zdánlivý počet teoretických pater, který umožňuje hodnotit účinnost chromatografického systému, byl vypočten podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

kde:

t_R je retenční čas (min);

w_h je šířka píku v polovině výšky (min).

Hodnoty byly získány ze záznamu, obsahujícího čtyři různé estrogenní látky a EP (obr. č. 3). Zdánlivý počet teoretických pater byl stanoven pro každou testovanou látku.

Tabulka č. 17 shrnuje hodnoty zdánlivého počtu teoretických pater.

Tabulka 17. Zdánlivý počet teoretických pater.

Analyzovaná látka	<i>N</i>
EP	2106
BE	2632
AE	4595
EE	4919
E-on	3890

4.2.4 Stanovení faktoru symetrie chromatografických píků

Faktor symetrie chromatografických píků byl vypočten podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

kde:

$w_{0,05}$ je šířka píku ve vzdálenosti 5% výšky píku (min);

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5% jeho výšky (min).

Hodnoty byly získány ze záznamu, obsahujícího čtyři různé estrogení látky a EP (obr. č. 3). Faktor symetrie byl stanoven pro každou látku. **Tabulka č. 18** shrnuje hodnoty faktoru symetrie chromatografických píků.

Tabulka 18. Faktor symetrie chromatografických píků.

Analyzovaná látka	A_s
EP	1,50
BE	1,38
AE	1,50
EE	1,30
E-on	1,30

4.2.5 Stanovení rozlišení chromatografických píků

Rozlišení chromatografických píků bylo vypočteno ze záznamu, obsahujícího čtyři různé estrogenní látky a EP (**obr. č. 3**) podle vzorce:

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde:

t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy látek (min);

w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v polovině jejich výšky (min).

Tabulka č. 19 obsahuje stanovené hodnoty rozlišení chromatografických píků testovaných látek.

Tabulka 19. Rozlišení chromatografických píků.

Analyzovaná látka	R_s
EP	4,06
BE	2,14
AE	1,48
EE	1,63
E-on	-

4.2.6 Opakovatelnost

Směs vzorku, obsahující EP, AE, BE, EE a E-on byla šestkrát injikována na kolonu. Estrogeny byly nastříkovány v koncentraci 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a EP byl nastříkovan v koncentraci 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze série šesti měření byla vypracována opakovatelnost velikosti odezvy a opakovatelnost retenčních časů. Relativní směrodatné odchylky byly vypočteny dle vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

kde:

y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako výška píku

\bar{y} je průměr jednotlivých hodnot

n je počet jednotlivých hodnot.

RSD pro všechny testované látky byly vždy menší než 2%. Český lékopis požaduje hodnotu relativní směrodatné odchylky pro systémy HPLC max. 1,06. Tomuto požadavku metoda nevyhovuje.

4.3 Diskuze

Metoda SIC se ukázala jako vhodná metoda pro testování čtyř estrogenních látek a vnitřního standardu. Prvotního záměru vyvinout tuto metodu pro testování pěti estrogenních látek s vnitřním standardem dosaženo nebylo. Látka s nejnižší retencí (E-ol) má příliš odlišný retenční čas od ostatních testovaných estrogenů. Z tohoto důvodu bylo nutné pro testování všech pěti estrogenů s vnitřním standardem použít sérii třech monolitických kolon o celkové délce 15 cm. V průběhu jedné analýzy bylo třeba dvojího nástřiku mobilní fáze (kvůli nedostatečné kapacitě pumpy) pro kompletní eluci všech látek. Testování izokratické, gradientové eluce, ani zvýšené teploty mobilní fáze za těchto podmínek nepřineslo lepší výsledky. Při validaci metody pro pět estrogenních látek s IS byla potvrzena nepřesnost pumpy při dvojitým nástřiku a přetlakování systému z důvodu příliš dlouhé kolony.

Metoda SIC pro testování čtyř estrogenních látek s vnitřním standardem splnila podmínky optimální separace. Během 7,5 min. proběhla celá analýza, pro níž je třeba použít 3 ml mobilní fáze a 10 μl vzorku. Chromatografické píky vykazovaly dobrou symetrii (viz hodnoty A_s) a rozdělení; lékopisnou podmínku $R_s > 1,5$ nesplnil pouze AE, avšak hodnota R_s byla u této látky pouze o 0,02 nižší než tento limit. Účinnost separace byla vyjádřena hodnotami zdánlivého počtu teoretických pater. I přes nízkou průtokovou rychlost ($8 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$) bylo dosaženo vysoké účinnosti separace.

Linearita odezvy byla stanovena pro estrogény v koncentračním rozmezí $25,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro EP v koncentračním rozmezí $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro všechny látky vyšel korelační koeficient alespoň 0,999, což dokazuje schopnost systému podávat spolehlivé výsledky v uvedených koncentračních rozmezích. Dolní hodnota tohoto koncentračního rozmezí zároveň udává limit kvantifikace pro jednotlivé látky, jímž je vyjádřena citlivost metody. Relativní směrodatné odchylky vypočtené pro opakovatelnost byly vždy menší než 2%, což nesplnilo požadavky českého lékopisu. Tyto požadavky však lékopis udává pro systémy HPLC. Výsledky opakovatelnosti byly pravděpodobně ovlivněny nedokonalou přesností pumpy. Metodu SIC pro testování čtyř estrogenních látek a vnitřního standardu se nepodařilo plně validovat dle požadavků Českého lékopisu na systém HPLC.

5. Závěr

Byla vyvinuta metoda sekvenční injekční chromatografie pro čtyři estrogenní látky a vnitřní standard. K úplné separaci směsi čtyř estrogenních látek blízkých svou strukturou a vnitřního standardu bylo poprvé použito delší monolitické kolony Merck® Chromolith® Performance RP-18e 100 mm × 3 mm a předkolony Merck® Chromolith® RP-18e 5 mm × 3 mm. Pro jednu analýzu, trvající 7,5 min bylo třeba použít 10 µl vzorku a 3 ml mobilní fáze. Průtoková rychlost byla nastavena na 8 µl.s⁻¹. Evidentními výhodami této metody je její rychlost, nízká spotřeba organických rozpouštědel, a tím i nízká produkce odpadu. Oproti HPLC metodě je přístrojové vybavení této metody levnější a snáze přenosné. Na druhou stranu nemá tak propracovaný software a přesnost pumpy je nižší.

V navazující práci byla monolitická kolona srovnávána s částicovou kolonou Ascentis® Express C18 30 mm × 4,6 mm. Vyšší účinnosti separace bylo dosaženo s monolitickou kolonou, avšak při zohlednění délky kolony dosahovala lepších výsledků kolona částicová. Rozlišení chromatografických píků bylo u obou kolon téměř shodné. Větší citlivosti dosahovala kolona monolitická (nižší hodnoty LOD a LOQ) [19].

6. Literatura

- [1] Lincová D. et. al., Základní a aplikovaná farmakologie, 2. doplněné a přepracované vydání, Praha, Galen, 2007, 424 - 430, ISBN 978-80-7262-373-0
- [2] Slíva J., Votava M., Farmakologie, edice Lékařské repetitorium, 1. vydání, Praha, Triton, 2011, 330 - 331, ISBN 978-80-7387-500-8
- [3] Pourová J. a kol., Farmakologie pro farmaceuty IV, Praha, Karolinum, 2009, 46–52, ISBN: 978-80-246-1704-6
- [4] Hamid H., Eskicioglu C., Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Research*, Vol. 46, No. 18, 2012, 5813–5833
- [5] Silva C. P., Otero M., Esteves V., Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review, *Environmental Pollution*, Vol. 165, 2012, 38–58
- [6] Belfroid A.C. et. al., Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *The Science of the Total Environment*, Vol. 225, 1999, 101 - 108
- [7] Fernandez M. et. al., Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 3, 2009, 336–346
- [8] Pimenta A. M. et. al., Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 40, No. 1, 2006, 16–34
- [9] Růžička J., Flow Injection Analysis, elektronická verze CD, 4. Vydání, 2009, FI 4th FINAL COMPRIHENSIV, prezentace FI Comprihensiv FINAL vers [Cit. 3.12.2013]
- [10] Růžička J., Flow Injection Analysis, elektronická verze CD, 4. Vydání, 2009, SI 4th FINAL COMPRIHENSIV, prezentace SEQUENTIAL INJECTION FINAL vers1.ed [Cit. 3.12.2013]
- [11] Chocholouš P., Šatínský D., Solich P., Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography, *Talanta* Vol. 70, 2006, 408–413
- [12] Solich P. et. al., Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, No. 2, 2004, 116–126

- [13] Šatínský D. et. al., Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 499, No. 1–2, 2003, 205–214
- [14] Šatínský D. et. al., Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1015, No. 1–2, 2003, 239–244
- [15] Šatínský D. et. al., Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets, *J. Sep. Sci.*, Vol. 27, 2004, 529–536
- [16] Chocholouš P. et. al., A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography, *Talanta*, Vol. 72, No. 2, 2007, 854–858
- [17] Chocholouš P., Solich P., Šatínský D., An overview of sequential injection chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 600, No. 1–2, 2007, 129–135
- [18] Chocholouš P. et. al., Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column, *Talanta*, Vol. 77, No. 2, 2008, 566–570
- [19] Chocholouš P. et. al., Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column, *Talanta* Vol. 85, 2011, 1129–1134
- [20] Klimundová J. et al., Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, *Talanta*, Vol. 69, No. 3, 2006, 730–735
- [21] Šatínský D. et. al., Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 40, No. 2, 2006, 287–293
- [22] Šatínský D. et. al., Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system, *J Sep Sci.*, Vol. 29, No. 16, 2006, 2494–2499
- [24] Huclová J., Šatínský D., Karlíček R., Coupling of monolithic columns with sequential injection technique. A new separation approach in flow methods, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 494, 2003, 133–140

- [25] Šatínský D. et. al., Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations, *Talanta*, Vol. 68, No. 2, 2005, 214–218
- [26] Klimeš J. a kol., *Kontrola léčiv I.*, Praha, Karolinum, 2008, 33, ISBN: 978-80-246-1613-1
- [27] Karlíček R. a kol., *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, 2007, 276–279, ISBN: 978-80-246-1453-3
- [28] HPLC.CZ [online]. © 1999-2013 Michal Douša. Poslední změna 4.4.2013 [Cit. 12.5.2014]. Dostupné z: hplc.cz
- [29] Monolitické kolony [online]. Poslední změna 3.6.2010. [Cit. 12.5.2014]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm
- [30] Guiochon G., Monolithic columns in high-performance liquid chromatography (review), *Journal of Chromatography A*, Vol. 1168, 2007, 101–168
- [31] Zabka M., Minceva M., Rodrigues A. E., Experimental characterization and modelling of analytical monolithic column, *J. Biochem. Biophys. Methods*, Vol. 70, 2007, 95–105
- [32] EffiChem: Validace metod [online]. © 2013 EffiChem. [Cit. 15.6.2014]. Dostupné z: <http://www.efficem.cz/reseni/laboratorni-specialiste/validace-metod/>
- [33] *Český lékopis 2009 – Doplněk 2013*, Praha, Grada, 2013, 122 – 129, ISBN: 978-80-247-4679-1
- [34] Barek J., Jánoš P., Metrologická terminologie v chemii [online]. [Cit. 14.6.2014]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf
- [35] Hodnocení linearity [online]. [Cit. 18.6.2014]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html>
- [36] Ebel S., Kühnert H., Mück W., Limits of determination and calibration in HPLC, *Journal Chromatographia*, Vol. 23, 1987, 934-938