

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

**Využití hydrofobních materiálů na bázi oxidu zirkoničitého
pro úpravu vzorku**

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce: PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Mgr. Markéta Nezvedová

Zde bych ráda poděkovala za vedení mé rigorózní práce a odborné připomínky PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. a Mgr. Michalu Klivickému za cenné rady a pomoc při zpracování výsledků. Experimentální část byla podpořena Univerzitou Karlovou v Praze v rámci projektu GAUK 631612.

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem, jež jsem samostatně vypracovala. Literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou v práci řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 19. 2. 2015

.....

Podpis

Obsah

| | |
|---|--------|
| 1. Úvod..... | - 8 - |
| 2. Teoretická část | - 9 - |
| 2.1 Příprava vzorku před vlastní analýzou | - 9 - |
| 2.2 Extrakce na pevné fázi – Solid-Phase Extraction (SPE)..... | - 10 - |
| 2.2.1 Vybavení pro SPE..... | - 10 - |
| 2.2.2 Obecný postup SPE..... | - 11 - |
| 2.2.3 Separační módy, příklady sorbentů..... | - 13 - |
| 2.3 Vybrané sorbenty na bázi ZrO ₂ | - 23 - |
| 2.3.1 ZrO ₂ -CARB | - 24 - |
| 2.3.2 ZrO ₂ -PBD | - 24 - |
| 2.4 Methotrexát | - 25 - |
| 2.4.1 Vlastnosti methotrexátu | - 26 - |
| 2.4.2 Analýza methotrexátu | - 27 - |
| 3. Cíle..... | - 29 - |
| 4. Experimentální část..... | - 30 - |
| 4.1 Zařízení pro SPE a HPLC | - 30 - |
| 4.2 Ostatní laboratorní vybavení | - 31 - |
| 4.3 Chemikálie | - 31 - |
| 4.4 Zásobní roztoky..... | - 32 - |
| 4.5 Postup úpravy vzorku..... | - 33 - |
| 4.6 Analýza vzorků, podmínky | - 34 - |
| 5. Výsledky a diskuze | - 35 - |
| 5.1 Retence vybraných kyselin a zásad na ZrO ₂ -CARB..... | - 36 - |
| 5.2 Retence methotrexátu na ZrO ₂ -CARB, ZrO ₂ -PBD a SiO ₂ -C18 | - 40 - |
| 5.3 Testování linearitu – ZrO ₂ -CARB..... | - 45 - |
| 5.4 Regenerace ZrO ₂ -CARB | - 46 - |
| 6. Závěr | - 47 - |
| 7. Zdroje..... | - 49 - |

Abstrakt

Využití hydrofobních materiálů na bázi oxidu zirkoničitého pro úpravu vzorku

Rigorózní práce

Mgr. Markéta Nezvedová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické kontroly a kontroly léčiv

Heyrovského 1203, Hradec Králové.

V případě analýzy biologického vzorku je třeba provést před vlastní HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) analýzou jeho úpravu. Cílem je odstranění balastních látek, které by mohly buď koeluovat se stanovovanou látkou a ovlivnit tak kvantifikaci, nebo kontaminovat a znehodnotit chromatografickou kolonu. Možností, jak provést úpravu vzorku před analýzou, je několik. Mezi nejčastěji používané patří extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction, SPE), kterou je možno i automatizovat. Existuje poměrně velký výběr pevných fází pro SPE, ale neustále jsou hledány nové s vhodnými vlastnostmi. Tato práce je zaměřena na potenciální materiály vhodné pro SPE. Testovány byly především vlastnosti sorbentů ZrO₂-CARB (uhlíkem pokrytý oxid zirkoničitý) a ZrO₂-PBD (oxid zirkoničitý pokrytý polybutadienem) v porovnání s SiO₂-C18 (vázaný silikagel s oktadecylovými řetězci). Nejprve byla zkoumána extrakční schopnost pro kyselé a bazické analyty pouze u ZrO₂-CARB. Pomocí 5% NH₃ v acetonitrilu došlo k úspěšné eluci z povrchu tohoto sorbentu všech kyselin a zásad. V prostředí plazmy a moči nebyla extrakční výtěžnost vybraných modelových látek již tak vysoká. Methotrexát byl poměrně dobře eluován 5% NH₃ v tetrahydrofuranu ze sorbentů ZrO₂-CARB a ZrO₂-PBD a to jak v prostředí bez plazmy, tak i v přítomnosti plazmy a také moči. Konečné podmínky postupu SPE s využitím 3 ml 0,2% NH₃ v methanolu jako elučního činidla byly aplikovatelné pouze pro ZrO₂-CARB.

Klíčová slova: SPE, oxid zirkoničitý, methotrexát

Abstract

Application of hydrophobic materials based on zirconium dioxide for sample pre-treatment

Rigorous thesis

Mgr. Markéta Nezvedová

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

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Heyrovského 1203, Hradec Králové.

In case of an analysis of a biological sample it is necessary to pre-treat the sample before the HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis. The aim is to remove ballast components, which could either coelute with the analyte and could influence the quantification, or contaminate and potentially damage a chromatographic column. There are many options how to pre-treat the sample before its analysis. Solid phase extraction (SPE) belongs among the most often used techniques, which can be also automated. There are many types of sorbents for SPE, but it is being constantly looked for some new, with appropriate analytical properties. This work is focused on potentially more suitable materials for SPE. Especially properties of ZrO₂-CARB (carbon-coated zirconia) and ZrO₂-PBD (polybutadiene-coated zirconia) were tested in comparison with SiO₂-C18 (octadecyl-bonded silica gel). Firstly, the ability of extraction of acidic and basic analytes on ZrO₂-CARB was investigated. All acids and basics were eluted from the surface of ZrO₂-CARB by using 5% ammonia solution in acetonitrile. Recovery was not so high for these analytes in a sample containing plasma or urine. Methotrexate (sample without plasma, in plasma, in urine) was relatively well eluted with 5% NH₃ in tetrahydrofuran from the surfaces of ZrO₂-CARB and ZrO₂-PBD. Final conditions for SPE of methotrexate by using 3 ml 0,2% NH₃ in methanol as eluent were applicable only for ZrO₂-CARB.

Keywords: SPE, zirconia, methotrexate

Seznam zkratek

| | |
|-----------------------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| ATE | Atenolol |
| DIC | Diklofenak |
| GC | Plynová chromatografie (Gas chromatography) |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography) |
| IBU | Ibuprofen |
| IE | Iontová výměna (Ion exchange) |
| LID | Lidokain |
| LLE | Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction) |
| MeOH | Methanol |
| MF | Mobilní fáze |
| NP | Normální fáze (Normal phase) |
| PAB | Kyselina p-aminobenzoová |
| RP | Reverzní fáze (Reversed phase) |
| RSD | Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation) |
| SAX | Silný anex (Strong anion exchanger) |
| SCX | Silný katex (Strong cation exchanger) |
| SiO₂-C8 | Vázaný silikagel s oktylovými řetězci |
| SiO₂-C18 | Vázaný silikagel s oktadecylovými řetězci |
| SPE | Extrakce na tuhé fázi (Solid phase extraction) |
| THF | Tetrahydrofuran |
| WAX | Slabý anex (Weak anion exchanger) |
| WCX | Slabý katex (Weak cation exchanger) |
| ZrO₂-CARB | Uhlíkem pokrytý oxid zirkoničitý (Carbon-coated zirconia) |
| ZrO₂-PBD | Oxid zirkoničitý pokrytý polybutadienem (Polybutadiene-coated zirconia) |

1. Úvod

V mé rigorózní práci jsme se zaměřili na výzkum nesilikagelových pevných fází potenciálně využitelných pro úpravu vzorku technikou SPE (Solid-Phase Extraction, Extrakce na pevné fázi). Neustále jsou vyvíjeny a vylepšovány postupy pro přípravu vzorku před vlastní analýzou. V současnosti jsou významné především ty postupy, jež jsou založené na principu extrakce (1).

Existuje mnoho materiálů, jejichž povrch lze dále nejrůzněji modifikovat a upravovat dle potřeby s ohledem na povahu analytu. Dnes jsou pro tento účel nejčastěji využívány fáze silikagelové, jsou ale hledány a zkoumány další materiály, jež by svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi povrchů vyhovovaly lépe.

V návaznosti na výsledky mé diplomové práce (2) zaměřené na výzkum nesilikagelových materiálů v analýze léčiv se naše práce soustředila právě na studium nesilikagelových sorbentů na bázi ZrO_2 . Konkrétně byly zkoušeny vlastnosti modifikovaných pevných fází ZrO_2 -CARB a ZrO_2 -PBD s porovnáním průběhu extrakce na SiO_2 -C18.

2. Teoretická část

2.1 Příprava vzorku před vlastní analýzou

V dnešní době je v provozu nespočet sofistikovaných měřících zařízení využívajících nejrůznější metody pro analýzu mnoha různých typů vzorků. K dispozici jsou citlivé detektory, které jsou schopny daný analyt zaznamenat. Navzdory těmto skutečnostem je zapotřebí vzorek pro vlastní analýzu připravit. Důležitost tohoto kroku spočívá v dosažení lepší selektivity, vyšší citlivosti, a v neposlední řadě získání správných a přesných dat. (1, 3)

Technik určených k tomuto účelu existuje hned několik. Rozhodující pro výběr vhodné metody je samozřejmě povaha vzorku, který je nejčastěji v kapalném či pevném skupenství. Pro účely přípravy vzorku se zaměřením se na analýzu látek z biologického materiálu, v případě, kdy se jedná o tekutý vzorek, jsou využívány především postupy založené na extrakci kapalina-kapalina (LLE, liquid-liquid extraction), extrakci na pevné fázi (SPE, solid-phase extraction) a také na deproteinaci vzorku. (1, 4)

Společnou vlastností extrakčních postupů je využití nemísitelnosti fází, kdy se v průběhu procesu ustavuje rovnováha při přechodu analyzované složky z jedné fáze do druhé. Při separaci dochází k distribuci látky mezi obecně fází A a fází B. Tento jev popisuje rovnice (1.1), z které pak vychází rovnovážná distribuční konstanta K_D (1.2) dle Nernstova zákona.

$$X_A \leftrightarrow X_B \quad (1.1)$$

$$K_D = [X]_B / [X]_A \quad (1.2)$$

Hranaté závorky značí koncentraci složky X přítomné ve fázi A či B. Cílem je tedy optimalizace podmínek metody tak, aby byla výsledná distribuční konstanta co nejvyšší, tzn. aby přešlo do fáze B co největší množství analyzované látky.

Důležitým předpokladem pro úspěšnou SPE jsou vhodně zvolené podmínky, jež jsou závislé na vlastnostech jak analytu, tak i zvoleného sorbentu. Zohlednit je potřeba pH, polaritu, acidobazicitu, náboj a rozpustnost. (1, 3, 4, 5)

2.2 Extrakce na pevné fázi – Solid-Phase Extraction (SPE)

Metoda SPE je založena na principech kapalinové chromatografie. Na pevné fázi dochází k extrakci analyzované látky, jež je rozpuštěná v matrici. SPE umožňuje efektivní čištění a izolaci vzorku a jeho zakoncentrování před vlastní analýzou. Jedná se o rychlou přípravu vzorku s možností automatizace.

Poprvé byla tato metoda představena v 70. letech minulého století. Od té doby její význam neustále roste. Extrakce na pevné fázi je rychlejším postupem než v případě extrakce kapalina-kapalina, LLE. Další výhodou je i snížení množství rozpouštědla spotřebovaného v průběhu celého procesu. Je zapotřebí odhadem pouze desetina objemu rozpouštědel použitých k extrakci stejného množství vzorku v porovnání s metodou LLE. Jedná se zároveň o metodu reprodukovatelnou s dobrou výtěžností a možností uchování vzorku ve stavu zakotvené látky na pevné fázi v extrakční kolonce. (4, 6, 7, 8, 9)

SPE metoda je často využívána pro získání čistého a zakoncentrovaného vzorku s minimální přítomností nečistot a reziduí matrice. Lze ji využít i pro online spojení s HPLC či GC, tedy se systémy pro následnou analýzu vzorku. Výhodou tohoto předčištění vzorku je také zkrácení času při hodnocení výsledné analýzy. (10, 11, 12)

2.2.1 Vybavení pro SPE

Extrakce probíhá nejčastěji za využití kolonek, jež jsou naplněny vybraným sorbentem, který se nachází mezi dvěma porézními fritami z polyethylenu, nerezové oceli či teflonu. Tyto tzv. extrakční kolonky mohou být zhotoveny z polypropylenu či ze skla. K dispozici jsou také extrakční disky, které jsou vyrobeny slisováním pevné fáze se skleněnými vlákny. Pro rychlejší průběh extrakce je tato aparatura spojena s vakuovým zařízením, jež umožňuje zpracovat více vzorků zároveň. Zdrojem vakua může být například vodní vývěva nebo ještě lépe vakuové čerpadlo. V nabídce výrobců jsou také 5, 10, 12, 16, 20, 24 a 96 pozicová plata. K dispozici jsou systémy s jehlami či s vyměnitelnými vložkami. (Obr. 1) Ve standardní výbavě každého manuálního systému pro SPE jsou tyto součásti: víko, ventily kontrolující průtok - šroubovací nebo on/off, ocelové jehly, skleněná nádoba, manometr na měření vakua a stojánek umožňující sběr extrakčních frakcí do zkumavek. (1, 4, 8, 13, 14)



Obr. 1. Typy systémů pro SPE – převzato a upraveno (14)

Před vlastním provedením SPE je potřeba pečlivě vybrat také správné velikosti kolonek, vhodný sorbent a jeho množství. (Tab. 1)

Tab. 1. Výběr velikosti kolonky a množství sorbentu dle objemu vzorku (6, 8, 15)

| Hmotnost sorbentu | Kapacita sorbentu* | Objem kolonky | Objem vzorku | Minimální eluční objem |
|-------------------|--------------------|---------------|--|------------------------|
| 50 - 100 mg | 2,5 - 10 mg | 1 ml | <1 ml | 100 - 200 μ l |
| 500 mg | 25 - 100 mg | 3 ml | 1 - 250 ml <i>pomalá extrakce</i> | 1 - 3 ml |
| 0,5 - 1 g | 25 - 100 mg | 6 ml | 1 - 250 ml <i>rychlá extrakce</i> | 2 - 6 ml |
| 2 g | 0,1 - 0,12 g | 12 ml | 10 - 250 ml; <i>velká kapacita sorbentu</i> | 10 - 20 ml |
| 5 g | 0,13 - 0,25 g | 20 ml | | 20 - 40 ml |
| 10 g | 0,5 - 1 g | 60 ml | <1 l; <i>pomalá extrakce</i> | 40 - 100 ml |

* Tato hodnota závisí na vlastnostech analytu a matrice vzorku. Obecně by neměl být na kolonku nanášen analyt v množství větším než 5 % hmotnosti sorbentu.

O druhu pevné fáze rozhoduje povaha analytu. Existuje široká škála nejrůznějších sorbentů. Silikagelové fáze patří dnes k nejpoužívanějším, existuje však mnoho dalších typů pevných fází pro nejrůznější potřeby. Zkoumány jsou neustále nové materiály. Mezi tyto patří především sorbenty na bázi oxidů kovů, například ZrO_2 či TiO_2 , či různé polymery. Nicméně se jedná většinou obecně o fáze složením a strukturou podobné těm, jež jsou používány pro metodu HPLC. (4, 10)

2.2.2 Obecný postup SPE

Vlastní provedení SPE metody se skládá ze čtyř kroků – aktivace a kondicionace, nanesení vzorku, promytí sorbentu a eluce analytu. (Obr. 2)

- **Aktivace a kondicionace**

Tato fáze je nezbytná k zajištění správného průběhu celého procesu. Na povrchu sorbentu dojde k rozprostření řetězců s funkčními skupinami tak, aby mohly probíhat efektivní interakce mezi analytem a pevnou fází v následujících krocích. Pro aktivaci se obecně používá rozpouštědlo opačné polaroty než samotný sorbent. V reverzním módu je tímto činidlem často s vodou mísitelný methanol či acetonitril, v NP módu pak například hexan. Sorbent je následně promyt podobným či shodným rozpouštědlem, které bylo použito k rozpuštění vzorku (např. pufr) - pro pozdější maximální retenci analytu. Důležité je, aby v tomto kroku nedošlo k vysušení sorbentu. (1, 4, 10, 16)

- **Nanesení vzorku**

Při nanášení vzorku na vybraný sorbent je žádoucí, aby jeho průtok kolonkou byl co nejpomalejší. Cílem je, aby se dostatečně uplatnily interakce mezi sorbentem a analytem a slabě zadržované složky matrice vzorku volně protekly kolonkou. V tomto bodě míra retence složek vzorku závisí na mnoha faktorech jako je pH vzorku či jeho koncentraci a také na nanášeném objemu. (1, 4, 10, 16)

- **Promytí**

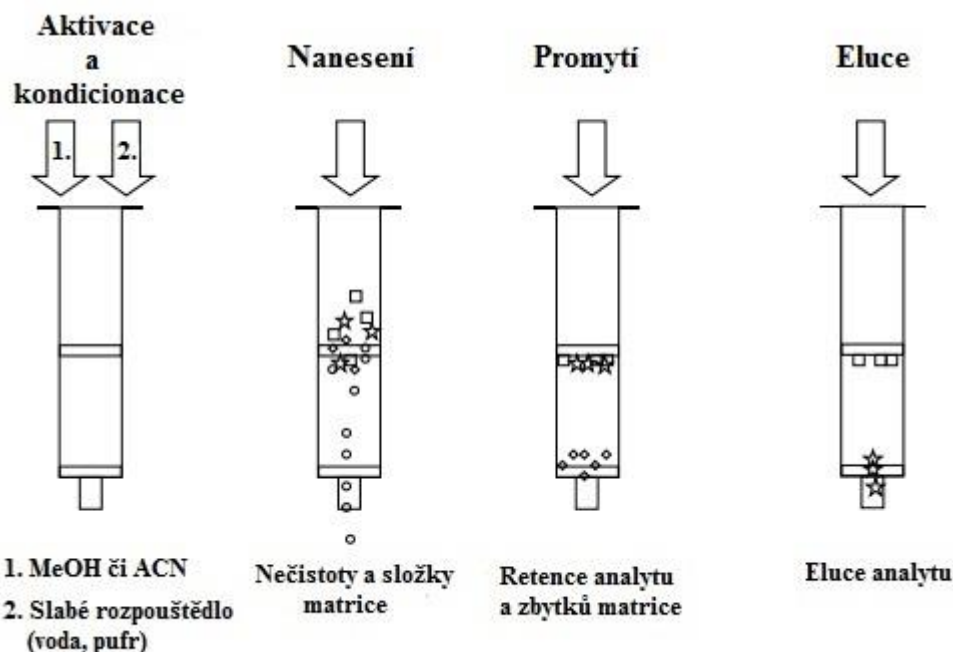
Promývací fáze slouží k odstranění zbytků nečistot či reziduí z matrice vzorku, jež byly při nanášení zachyceny. Zde je potřeba užít takové rozpouštědlo, které tyto nežádoucí komponenty z povrchu sorbentu vymyje, aniž by se přerušily interakce mezi pevnou fází a analytem. K optimalizaci tohoto kroku je možné měnit například pH, iontovou sílu či % organické složky promývacího činidla. Nakonec je vhodné sorbent vysušit spuštěným vakuem pro odstranění zbytku vodného činidla použitého v předchozích krocích. (1, 4, 10, 11, 16)

- **Eluce**

V poslední fázi se používá nejmenší objem vhodně zvoleného rozpouštědla, aby byla zajištěna eluce požadovaných složek. Nejmenší objem proto, aby nekoeluovaly s analytem nežádoucí složky, které nebyly v předchozích postupech odstraněny a zůstaly na povrchu sorbentu. Obecným pravidlem pro výběr elučního činidla je, že se použije rozpouštědlo takové povahy, jenž se nejvíce podobá charakteru analytu. Tedy že například polární složky na polárním sorbentu (např. nemodifikovaný silikagel)

jsou nejlépe eluovány činidly v tomto pořadí polarity: voda > methanol > acetonitril > ethylacetát > aceton > THF.

V neposlední řadě je možné opět modifikovat pH či iontovou sílu elučního roztoku. (1, 4, 10, 11, 16)



Obr. 2. Schéma postupu SPE – převzato a upraveno (16)

Pokud je vzorek následně analyzován pomocí HPLC, je často zapotřebí, aby organické eluční činidlo bylo odpařeno (např. proudem N_2) a vzorek byl následně rekonstituován v mobilní fázi určené pro HPLC analýzu. Pokud bude vzorek analyzován pomocí plynové chromatografie, měl by být rozpuštěn například v methanolu nebo jiném, s GC systémem kompatibilním, činidlu. (16)

2.2.3 Separační módy, příklady sorbentů

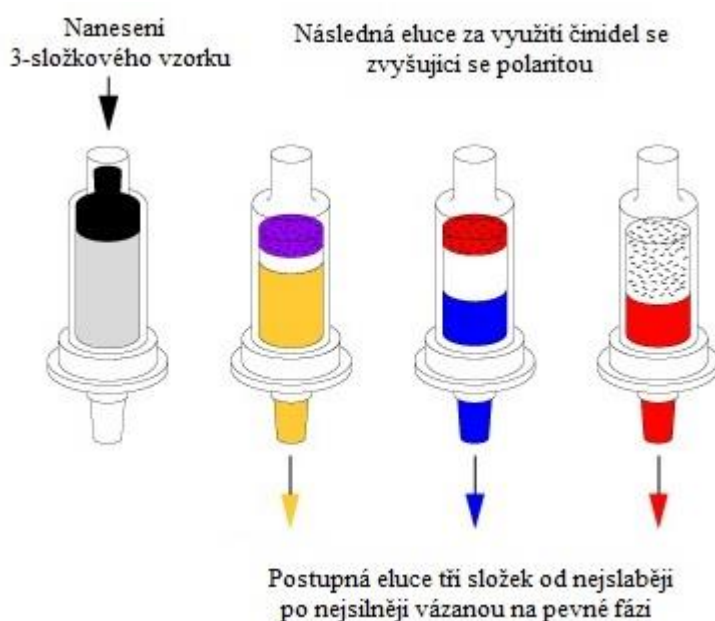
Pro každý separační mód existuje řada sorbentů. Většinou se jedná o silikagelové materiály. Charakteristiky jednotlivých fází se mohou lišit dle výrobce a jsou tedy různé v závislosti na zvoleném výrobním procesu. Vybrané zde uváděné příklady používaných silikagelových fází mají nepravidelně tvarované částice o velikosti $50 \mu m$, se specifickou plochou povrchu $480 m^2/g$, s póry o průměru 70 \AA a objemem pórů $0,9 cm^3/g$. Silikagelový nosič je kyselě praný, poté je jeho povrch dle potřeby modifikován. (8)

- **Normální fáze (NP, normal phase)**

Tento mód je určen pro separaci neutrálních až mírně polárních složek daného vzorku. Jedná se o případ, kdy je sorbent polární a mobilní fáze nepolární. V případě vícesložkového vzorku se při extrakci postupuje takto:

1. Kondicionace nepolárním rozpouštědlem, obvykle takovým, ve kterém je vzorek rozpuštěn.
2. Nanesení vzorku na kolonku.
3. Promytí nečistot nepolárním rozpouštědlem.
4. Eluce první složky polárnějším rozpouštědlem.
5. Eluce zbývajících složek činidlem o vyšší polaritě než v bodě 4.

Na následujícím obrázku (Obr. 3) je ilustrován příklad vzorku, jenž obsahuje směs tří neutrálních, relativně nepolárních organických složek (žlutá, červená a modrá), a který je tedy při nanášení barvy černé. (17)



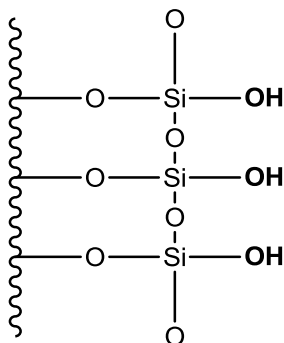
Obr. 3. Příklad eluce pro 3-složkový vzorek v NP módu - převzato a upraveno (17)

Používané polární sorbenty k provedení SPE v NP módu jsou například silikagel a jeho modifikované povrchy polárními skupinami jako jsou diol, CN či NH₂, dále florisil či oxid hlinitý. (8, 17)

Silikagel a jeho modifikace

○ **SiO₂**

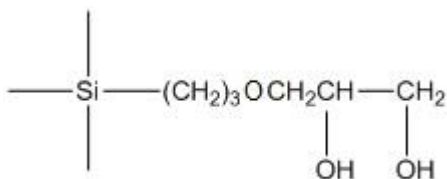
Jedná se o nemodifikovaný kyselý praný silikagelový sorbent, jenž je považován za nejpolárnější, používaný jako normální fáze. (Obr. 4) Používá se pro oddělení strukturně podobných molekul, jež jsou separovány postupnou elucí činidly s rostoucí polaritou. Často je využíván pro potřeby kombinatoriální chemie. (8)



Obr. 4. Struktura nevázaného silikagelu

○ **SiO₂-diol**

Na silikagel je polymerně navázaný 2,3-dihydroxypropoxypropyl. (Obr. 5) Běžně se používá pro polární extrakci z nepolární matrice. Hydroxylové skupiny umožňují tvorbu silných vodíkových můstků. I tento sorbent je vysoce selektivní při extrakci molekul se strukturní podobností. (8)

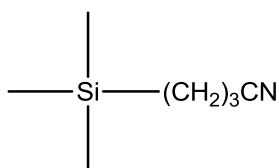


Obr. 5. Struktura silikagelu s diolovými skupinami

○ **SiO₂-CN**

V tomto případě jde o monomerně vázanou kyanopropylovou fázi. (Obr. 6) Výhodou je použití tohoto sorbentu v obou módech, tedy jako normální fáze nebo obrácenou. Jako reverzní fáze je vhodná pro velmi hydrofobní látky, které by se mohly na nepolárnějších sorbentech (např. SiO₂-C18) ireverzibilně zachycovat. Naopak jako normální fáze se SiO₂-CN s výhodou používá

pro retenci polárních látek, které by jinak byly sorbenty s vyšší polaritou (např. SiO₂ a SiO₂-diol) zadržovány příliš silně. (8)



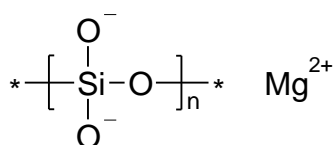
Obr. 6. Struktura silikagelu s monomerně vázaným kyanopropylem

o **SiO₂-NH₂**

Zde je na silikagel polymerně vázaný aminopropyl, jež je ve své podstatě velmi polární díky možnosti tvorby vodíkových můstků. Struktura je tedy podobná jako v případě SiO₂-CN. Lze jej využít pro mód normální fáze a také jako slabý anex s pKa 9,8. Při pH 7,8 a nižším jsou funkční skupiny kladně nabitě. S výhodou je tedy používán pro separaci velmi silných aniontů. Zajímavostí je i fakt, že díky propylovému spojovacímu můstku lze tento sorbent využít i jako reverzní fázi. (8)

Florisil (křemičitan hořečnatý)

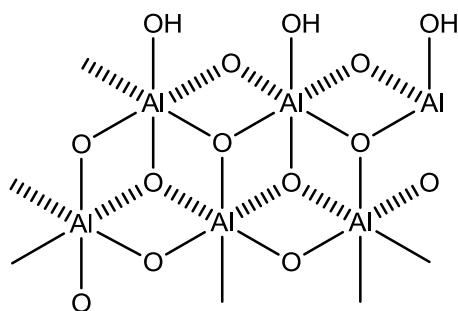
Florisil je forma oxidu křemičitého vyráběná synteticky z křemičitanu sodného. (Obr. 7) Označován bývá jako aktivní křemičitan hořečnatý, strukturálně se skládá ze tří složek: SiO₂ (84,0 ± 0,5 %), MgO (15,5 ± 0,5 %) a Na₂SO₄ (≤1,0 %). Je to pevný, granulovitý a pórovitý materiál s vysokou selektivitou. (18, 19)



Obr. 7. Struktura florisilu

Oxid hlinitý

Povrch tohoto sorbentu se svými vlastnostmi podobá více povrchu ZrO₂ než silikagelu. (Obr. 8) Dodává se ve třech provedeních, pro pH neutrální (~ 6,5), kyselá (~ 5) či bazické (~ 8,5). Mimo jiné se zde totiž uplatňují při interakci mezi analytem a povrchem také ligandové vazby. (20)



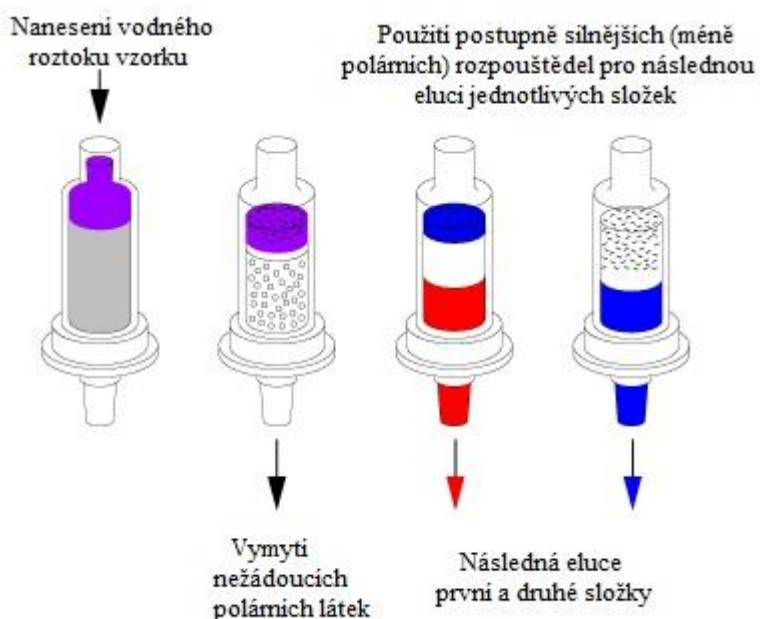
Obr. 8. Struktura oxidu hlinitého

- **Reverzní fáze (RP, reversed phases)**

Většina vzorků určených pro analýzu je vodné povahy, tudíž využití RP-SPE se stalo dominantní oproti ostatním provedením. Obecně se v RP chromatografii využívá principu eluce pomocí rozpouštědel v pořadí od těch více polárních po méně polární. Kroky jsou následující:

1. Aktivace povrchu nepolární fáze odpovídajícím množstvím methanolu nebo acetonitrilu. Sorbent se následně kondicionuje vodou či pufrům. V průběhu nesmí dojít k vysušení materiálu.
2. Nanese se vzorek rozpuštěný v polárním prostředí, obvykle ve vodě nebo pufru.
3. Eluce nežádoucích látek silně polárním činidlem.
4. Eluce zachyceného analytu méně polárním rozpouštědlem.
5. Eluce zbylých látek určených k analýze ještě hydrofobnějším činidlem než v bodě 4.

Proces, kdy se na kolonku nanáší vzorek o dvou složkách (fialová barva), je znázorněn na obrázku (Obr. 9). Postupnou elucí je získán nejprve více polární analyt (červený) a poté méně polární (modrý). (17)

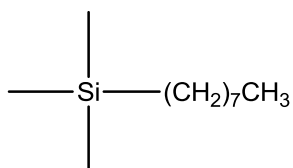


Obr. 9. Příklad eluce dvousložkového analytu v RP módu – převzato a upraveno (17)

K tomuto účelu jsou užívané především reverzní silikagelové fáze $\text{SiO}_2\text{-C8}$ a $\text{SiO}_2\text{-C18}$.

$\text{SiO}_2\text{-C8}$ (9 % C)

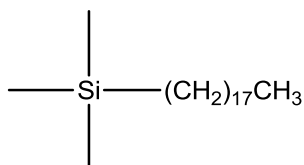
Na silikagelový materiál jsou monomerně navázány C8 uhlíkaté řetězce. (Obr. 10) Menší množství vázaného uhlíku umožňuje retenci i slabě polárních hydrofobních látek a zároveň snižuje záchyt velkých hydrofobních molekul, jež by se například na $\text{SiO}_2\text{-C18}$ zachycovaly příliš silně. (8)



Obr. 10. Struktura monomerně vázané fáze $\text{SiO}_2\text{-C8}$

$\text{SiO}_2\text{-C18}$

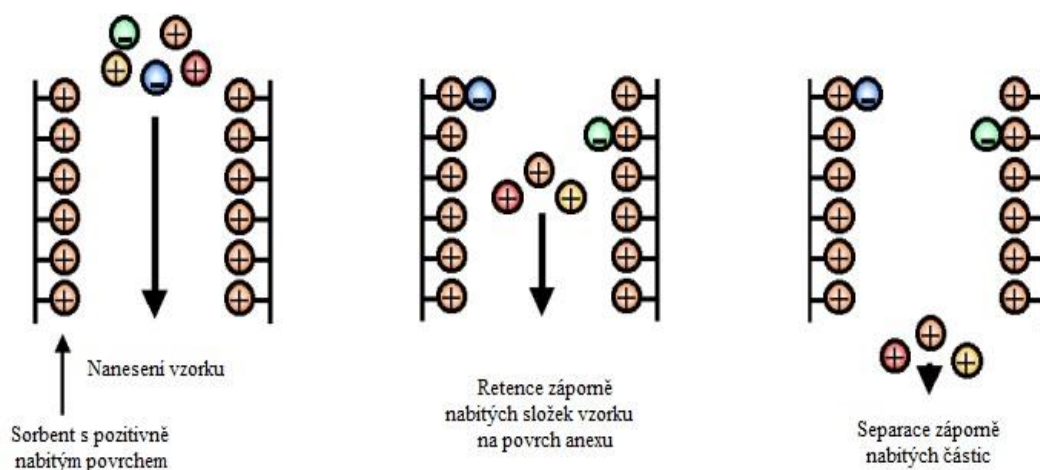
Jedná se o polymerně vázanou oktadecylovou fázi. (Obr. 11). V tomto případě vysoké procento vázaného uhlíku zvyšuje kapacitu sorbentu a zajišťuje tak vyšší výtěžnost extrakce. Tento sorbent je používán především pro separaci organických látek z vodných matric. (8)



Obr. 11. Struktura polymerně vázaného sorbentu SiO₂-C18

- **Iontová výměna (IE, ion exchange)**

Pokud jsou jednotlivé složky vzorku iontové povahy či se dají ionizovat, je vhodné pro jejich izolaci zvolit postup extrakce na principu iontové chromatografie. (Obr. 12) Existují dva hlavní druhy fází založených na tomto mechanismu – anex a katex, které obecně přitahují a zadržují opačně nabitě částice. (17)



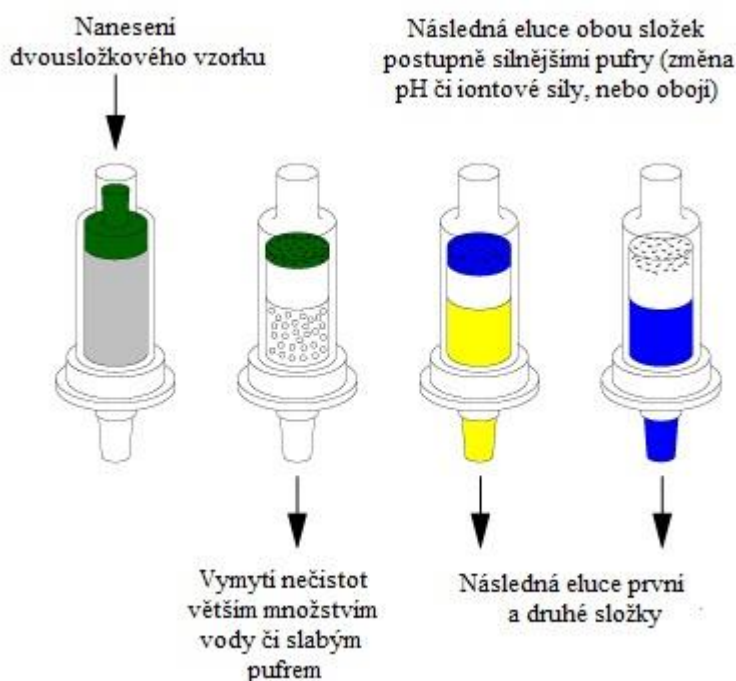
Obr. 12. Princip chromatografie na iontoměničích, př. anex – převzato a upraveno (21)

K úspěšné extrakci za využití iontoměničů se pro separaci využívá měnící se pH či iontová síla rozpouštědel. Konkrétní postup pro tento mód je následující:

1. Kondicionace sorbentu deionizovanou vodou nebo slabým pufrům.
2. Nanesení vzorku rozpuštěného v deionizované vodě či v pufru.
3. Vymytí nečistot, slabě vázaných složek pomocí slabého pufru.
4. Eluce první složky silnějším pufrům – změna pH nebo iontové síly.
5. Eluce zbylých analytů postupně silnějšími pufrům.

Tento postup je znázorněn na obrázku (Obr. 13), kdy je na kolonku nanesen vodná směs dvou nabitých složek s odlišnými pKa hodnotami (zelená barva).

Následnou elucí za využití vhodných činidel jsou získány postupně oba analyty – žlutý a modrý. (17)



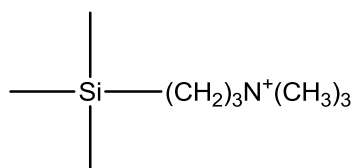
Obr. 13. Příklad eluce 2-složkového vzorku v módu IE – převzato a upraveno (17)

Kladné a záporné iontoměniče se obecně dělí na slabé a silné podle toho, jaký typ iontové skupiny se nachází na povrchu sorbentu. Silný katex má na svém povrchu vázané silné anionty sulfonové kyseliny, jež je v celém rozsahu pH vždy negativně nabitá. Slabý katex obsahuje vázané anionty karboxylové kyseliny, jež jsou zcela záporně nabitě pouze při pH vyšším o dvě jednotky než je jejich pKa. Při pH alespoň o dvě jednotky nižším, než je jejich pKa, je povrch takového sorbentu bez náboje. Obdobně je tomu u silných anexů. Kvarterní aminy nesou vždy kladný náboj, zatímco slabé měniče aniontů (s primárními, sekundárními nebo terciárními aminoskupinami) jsou pozitivně zcela nabitě jen při pH o dvě jednotky nižším než jejich pKa. Při pH nejméně o dvě jednotky vyšším, než je jejich hodnota pKa, nenese povrch takových sorbentů žádný náboj. (17)

SAX – silný anex

Tento sorbent je polymerně vázaný kvarterní amin, jenž zůstává nabitý v celém rozmezí pH hodnot. (Obr. 14) Obecně se používá pro extrakci slabých aniontů (např. aniontů karboxylových kyselin), které by nebyly dostatečně zadržovány

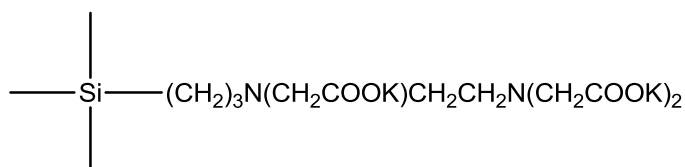
na slabších iontoměničích tohoto typu. Selektivita povrchu může být upravena použitím vhodného pufru při kondicionaci. (8)



Obr. 14. Struktura silného anexu

WCX – slabý katex

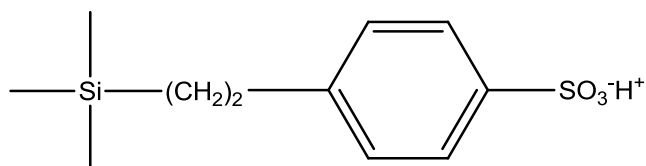
Na pevnou fázi je zde polymerně navázán karboxypropyl. (Obr. 15) Sorbent se chová jako slabý katex s pKa 4,8. Funkční skupina nese záporný náboj při pH 6,8 a vyšším. Tento sorbent je využíván především pro velmi silné kationty (s vysokým pKa), jejichž retence by byla na pevných fázích typu SAX příliš silná. (8)



Obr. 15. Struktura slabého katexu

SCX – silný katex

Jde o polymerně vázanou kyselinu benzensulfonovou na silikagelový nosič s pKa menším než 1,0. (Obr. 16) Díky přítomnosti benzenového jádra zde mohou probíhat mimo iontových interakcí též interakce hydrofobní, což by mělo být uvažováno především při extrakci organických kationtů z vodného prostředí. (8)



Obr. 16. Struktura silného katexu

Pro správné provedení SPE je tedy zohlednit řadu věcí. Od vlastností sorbentu, velikostí kolonek začínaje po charakter analytu, matrice a použitých rozpouštědel konče. Vývoj metody pro konkrétní látku lze zjednodušeně shrnout v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2. Souhrn vývoje metody SPE (22)

| Vývoj metody | Reverzní fáze | Normální fáze | Iontová výměna | |
|---|--|--|--|---|
| Analyt | mírná až nízká polarita | nízká až vysoká polarita / neutrální | nabitý nebo ionizovatelný | |
| Mechanismus separace | separace založena na hydrofobních interakcích | separace založena na polárních interakcích a adsorbci | separace založena na coulombických interakcích | |
| Matrice vzorku | vodná | nepolární organická | vodná / nízká iontová síla | |
| Kondicionace | 1. polární organická solvatace 2. voda | nepolární organická | pufr o nízké iontové síle | |
| Postup eluce | organické činidlo s vyšší polaritou | směsné organické rozpouštědlo s vyšší eluotropní silou | silnější pufr - iontová síla nebo pH pro neutralizaci náboje | |
| | | | <i>Aniontová výměna</i> | <i>Kationtová výměna</i> |
| Polarita sorbentu | nízká až střední | vysoká až střední | vysoká | vysoká |
| Rozmezí polarity rozpouštědla | vysoká až střední | nízká až střední | vysoká | vysoká |
| Rozpouštědlo nanášeného vzorku | voda, pufr o nízké síle | hexan, chloroform, dichlormethan | voda, pufr o nízké iontové síle | voda, pufr o nízké iontové síle |
| Eluční rozpouštědlo | CH ₃ OH/voda, CH ₃ CN/voda | ethylacetát, aceton, CH ₃ CN | pufry, soli s ↑ iontovou silou, ↑ pH | pufry, soli s ↑ iontovou silou, ↑ pH |
| Pořadí eluce složek vzorku | nejdříve nejvíce polární složky vzorku | nejdříve nejméně polární složky vzorku | nejdříve nejméně ionizované složky vzorku | nejdříve nejméně ionizované složky vzorku |
| Změna rozpouštědla pro eluci analyzované látky | snížení polarity rozpouštědla | zvýšení polarity rozpouštědla | snížení iontové síly či pH | snížení iontové síly či pH |

2.3 Vybrané sorbenty na bázi ZrO₂

Ačkoli v dnešní době existuje mnoho druhů sorbentů, především silikagelových, jsou hledány stále nové typy materiálů. Důvodem jsou hlavně v některých případech nevyhovující vlastnosti, jako například u silikagelových nosičů jejich stabilita pouze v určitém rozmezí pH či také jejich nestálost při vyšších teplotách. (20)

Pozornost se obrací na pevné fáze založené na bázi oxidů kovů, přičemž největší naděje jsou vkládány do materiálů z oxidu zirkoničitého. Tyto sorbenty se vyznačují stabilitou v celém rozsahu hodnot pH a také teplotní stálostí, díky které lze tyto sorbenty využít pro kolony v HTLC (High Temperature Liquid Chromatography). Kromě interakcí hydrofobních a iontovýměnných (přítomny i u silikagelových sorbentů) jejich povrch umožňuje také tvorbu donor-akceptorových interakcí. (20)

Sorbenty na bázi ZrO₂, jejichž částice jsou sférické, porézní a dostatečně mechanicky odolné, jsou využívány jako pevné fáze do kolon pro HPLC, GC či SPE. Za zmínku stojí i aplikace Zr(OH)₄, jež se využívá v papírové chromatografii pro separaci aminokyselin. (23, 24)

ZrO₂ lze použít jak v normálním módu jako nemodifikovaný sorbent (ZrO₂-PHASE) i pro chromatografii s iontovýměnným mechanismem (např. ZrO₂-WAX, ZrO₂-SAX, ZrO₂-WCX). Častější využití oxidu zirkoničitého je však v reverzním módu. Povrch je pokryt tenkou vrstvou polybutadienu (ZrO₂-PBD), polystyrenu (ZrO₂-PS) či uhlíku (ZrO₂-CARB). Existují také sorbenty na bázi smíšených oxidů, modifikované kyselinou alkylfosfonovou (PA) či stearovou (SA): PA-MgO-ZrO₂, PA-CeO₂-ZrO₂ či SA-CeO₂-ZrO₂. Jde o případ, kdy jsou oxidy modifikovány Lewisovými bazemi s dlouhými uhlíkatými řetězci. Modifikované povrchy interagují různě podle druhu nanesené vrstvy či navázaných řetězců. Vždy je však nutno myslet na možné interakce oxidu zirkoničitého, který nemá pouze funkci nosiče. (25, 26)

Výsledky mé diplomové práce (2) se zaměřením na studium extrakčních schopností sorbentů TiO₂, ZrO₂ a ZrO₂-SAX vůči vybraným kyselým látkám ve vodném a HILIC prostředí byly podnětem pro výzkum dalších potenciálně účinnějších materiálů na bázi oxidu zirkoničitého. Jmenované sorbenty byly v předešlé práci testovány v HILIC a ve vodném prostředí zejména pro retenci látek typu Lewisových bazí. Díky nedostatečné retenci modelových kyselin, především

v přítomnosti plazmy, jsme se rozhodli testovat ZrO_2 s modifikovaným povrchem. Vybranými sorbenty pro tuto rigorózní práci byly ZrO_2 -CARB a ZrO_2 -PBD.

2.3.1 ZrO_2 -CARB

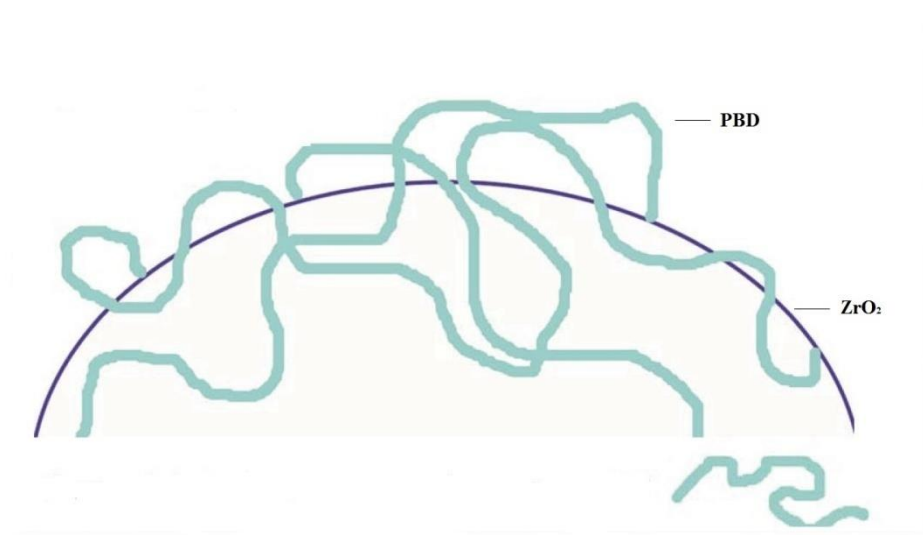
Uhlíkem pokrytý oxid zirkoničitý se svými vlastnostmi podstatně liší od jiných reverzních fází. Uhlíková vrstva je zodpovědná za silnější retenci polárních látek a větší selektivitu při separaci izomerů a homologů. Dále je díky vrstvě uhlíku chemicky stabilnější v porovnání se silikagelovými vázanými fázemi. Naopak nevýhodou této úpravy ZrO_2 je slabá mechanická stabilita, malá plocha povrchu, heterogenita povrchu a s tím související nízká kapacita, a nejednotná struktura pórů.

Přestože existují i jiné druhy pevných fází, jejichž povrch je modifikován uhlíkovou vrstvou, právě oxid zirkoničitý se zdá být ideálním pro pokrytí uhlíkem. Retence analytů probíhá na uhlíkovém povrchu. (24)

2.3.2 ZrO_2 -PBD

Jedná se o značně stabilní sorbent v porovnání s podobně upraveným silikagelem či oxidem hlinitým. Retenční faktory mnoha nepolárních látek bez náboje jsou naopak srovnatelné s retenčními faktory získanými na silikagelových vázaných fázích. Existují ale určité substance, jež jsou na tomto povrchu ireverzibilně zadržovány, stejně jako tomu je v případě mezi aminy a kyselým silikagelovým povrchem. Na polybutadienem pokrytém oxidu zirkoničitém jsou nevratně adsorbovány například některé karboxylové kyseliny či organofosfáty. Za jejich přílišnou retenci můžou donor-akceptorové interakce s oxidem zirkoničitém. (23, 24, 27)

Řetězce polybutadienu nepokrývají celý povrch oxidu zirkoničitého také díky skutečnosti, že protínají jeho povrch na různých místech, jak je vidět na obrázku (Obr. 17).

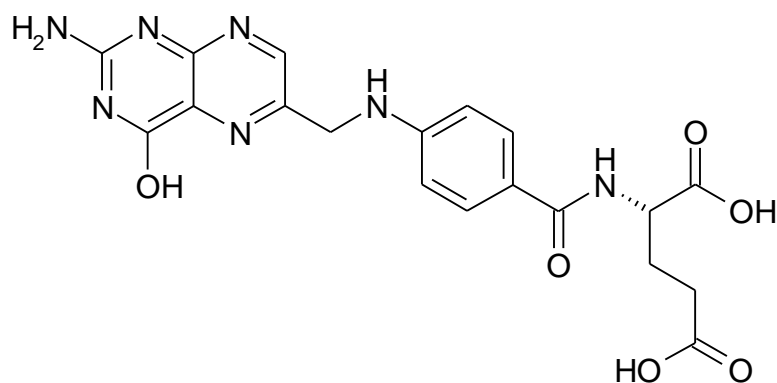


Obr. 17. Struktura pevné fáze ZrO_2 -PBD – převzato a upraveno (28)

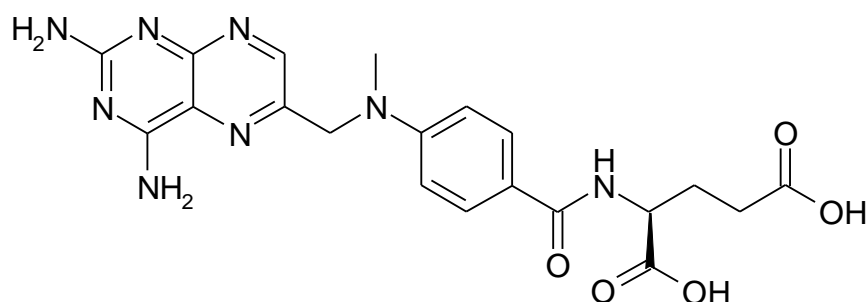
2.4 Methotrexát

Methotrexát je léčivo používané v oblasti terapie nádorového bujení, revmatoidní artritidy a v oblasti imunosupresivní léčby. Patří mezi antagonisty kyseliny listové, kteří byli objeveni kolem roku 1950, a náleží tak do skupiny účinných látek proti malignímu bujení, označovaných jako antimetabolity. Jedná se o analog přírodních metabolitů, který díky své strukturní podobnosti s kyselinou listovou inhibuje v buňkách biosyntézu nukleových kyselin. (29, 30)

Kyselina listová (Obr. 18) je součástí koenzymů, které katalyzují důležité kroky při syntéze purinových bazí a pyrimidinové baze thyminu. Její struktura je velmi specifická a jakákoli obměna vede ke vzniku antagonistických látek – antifolika. K nejpoužívanějším z nich patří právě methotrexát (Obr. 19). Vystupuje jako falešný substrát pro dihydrofolátreduktasu (enzym katalyzující redukci kyseliny dihydrolistové na její biologicky účinný tetrahydroderivát), čímž brání normální funkci tohoto enzymu a v konečném důsledku dochází k inhibici proliferace buněk. Pro cytostatický efekt jsou podávány vysoké dávky methotrexátu. (29)



Obr. 18. Struktura kyseliny listové



Obr. 19. Struktura methotrexátu

V léčbě revmatoidní artritidy je methotrexát aplikován v nízkých dávkách a patří v této oblasti mezi skupinu léčiv zvaných DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs, choroby modifikující léky), tedy léčiva, která modifikují projevy a průběh této nemoci. Zde je methotrexát lékem první volby, který je pacienty vcelku dobře snášen. Oblíbený je i pro svůj rychlejší nástup účinku oproti ostatním léčivům z této skupiny, který je při terapeutických dávkách 6 – 8 týdnů. (31, 32, 33, 34, 35)

2.4.1 Vlastnosti methotrexátu

Methotrexát je kyselina (S)-2-{4-[[2, 4-diaminopteridin-6-yl)methyl]methylamino}-benzoylamino}pentandiová, s molekulárním vzorcem $C_{20}H_{22}N_8O_5$, relativní molekulovou hmotností 454,44 a $pK_a = 4,7$. (36)

Methotrexát je podáván jak perorálně, tak i parenterálně (i.v., i. m. či intratekálně). Na bílkoviny se váže z 50 %, distribuce do orgánů je široká a nepřestupuje přes hematoencefalickou bariéru. Nízké dávky ($< 25 \text{ mg/m}^2$ povrchu těla) jsou snadno vstřebávány z gastrointestinálního traktu (GIT), zatímco vysoké dávky (do 3 g/m^2 povrchu těla) je nutné pro jejich nekompletní absorpci z GIT aplikovat i.v. infuzí. (37, 38)

Do buněk prochází aktivně transportem pro foláty (N^5 -methyl-tetrahydrofolát) a v případě vysokých koncentrací také pasivně difuzí. (37, 38)

Vylučování probíhá ledvinami v nezměněné formě (\downarrow dávky methotrexátu) nebo v podobě jeho metabolitů (\uparrow dávky methotrexátu), hlavními z nich jsou 7-hydroxymethotrexát a 4-amino-4-deoxy- N^{10} -methylpteroová kyselina. Biologický poločas je okolo 2-3 hodin. (37, 38)

2.4.2 Analýza methotrexátu

Pro svou možnou toxicitu (krevní dyskrázie, cirhóza jater) patří mezi sloučeniny, které mají své místo v oblasti monitorování terapeutických hladin. Nežádoucí účinky a tedy nutné monitorování hladin methotrexátu je důležité hlavně v situaci, kdy jsou pacientům podávány vysoké dávky tohoto léku. V některých případech se ale s monitorováním hladin methotrexátu můžeme setkat i při nízkodávkovém režimu, a to především u léčených se sníženou funkcí ledvin nebo u pacientů, kterým je zapotřebí podat léky, které by mohly s methotrexátem interagovat na úrovni farmakokinetiky, či farmakodynamiky. Obecně lze tedy říci, že účelem monitorování hladin methotrexátu je vyhnout se jeho případné toxicitě. Methotrexát a jeho metabolity bývají v biologických vzorcích hodnoceny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. (31, 32, 33, 34, 38)

Samotné analýze vzorků předchází jejich příprava, která je realizována třemi hlavními metodami:

1) Proteinová precipitace

K deproteinizaci se používají silné kyseliny jako trichloroctová, perchlorová či s vodou mísitelná organická rozpouštědla, např. acetonitril. Následuje centrifugace a nástřik supernatantu na kolonu. (38)

Publikované výtěžnosti při použití methanolu jsou 66 – 100 % (39, 40), kyseliny trichloroctové 81 % (41) a acetonitrilu 95 % (42).

2) Extrakce kapalina-kapalina

Zde se nejčastěji používá kyselina pero-chlorová k precipitaci proteinů a k následné extrakci směs ethyl-acetát : isopropanol v poměru 10 : 1, v/v. Variantou popsaného postupu je také neutralizace kyselého supernatantu hydroxidem draselným ještě před extrakcí. Dále je možné k deproteinizaci použít

kyselinu sírovou, síran amonný nebo kyselinu trochloroctovou a k extrakci samotný ethyl-acetát. (38)

V experimentech, kdy byl k extrakci použit chloroform, bylo dosaženo výtěžností 61 – 88 % (43, 44). Za použití směsi *n*-butanol : diethylether v poměru 3 : 4, v/v byly získány lepší výtěžnosti, 95 – 110 % (45). Dále byl k extrakci zkoušen také dichlormethan, který zajistil výtěžnost 88 – 118 % (46).

3) Extrakce na pevné fázi

Mezi nejvíce používané sorbenty zde jsou reverzní fáze, konkrétně SiO₂-C18. Sorbent je promýván kyselými, neutrálními či bazickými roztoky, zatímco eluce analytu je prováděna pomocí organických rozpouštědel (methanol), často smíchaných se silnými organickými kyselinami. (38)

Experimenty pro SPE úpravu vzorku s methotrexátem byly prováděny s využitím silikagelového sorbentu s navázanými oktadecylovými řetězci - SiO₂-C18. Výtěžnosti jsou v těchto případech publikované v rozmezí 80 - 95 %. Nižších hodnot bylo dosaženo při použití 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě jako kondicionačního a promývacího činidla a při eluci 0,1% kyseliny mravenčí ve směsi methanolu s vodou v poměru 9 : 1, v/v. Lepší výsledky byly publikovány pro SPE methotrexátu při aktivaci sorbentu methanolem a následně kondicionaci 0,1M kyselinou fosforečnou. K promytí byla použita voda a k eluci 2% methanolickeý roztok kyseliny trifluoroctové. (47, 48)

Methotrexát a jeho metabolity mohou být separovány za pomoci chromatografie s obrácenými fázemi. Často se k analýze používá kolona s pevnou fází SiO₂-C18, v některých případech také SiO₂-C8. K jejich eluci dochází za izokratických podmínek. Mobilní fáze je směsí vodného pufru s pH v rozmezí 2,5 – 6,7 s podílem organické složky, kterou bývá acetonitril či methanol. (38)

Následná detekce probíhá nejčastěji pomocí UV-VIS spektrofotometru a fluorimetricky, v neposlední řadě také hmotnostním spektrometrem (38). V případě fluorimetrické detekce bylo zapotřebí provést postkolonovou úpravu analytu (fotochemická degradace či oxidace), která vedla ke vzniku fluorescenčních derivátů. (41, 48, 49, 50)

3. Cíle

Úkolem této rigorózní práce je zaměřením se na výzkum a potenciální využití nesilikagelových materiálů na bázi ZrO_2 , především ZrO_2 -CARB, pro SPE. Snahou bylo navázat na výsledky mé diplomové práce (2), ve které byly zkoumány polární pevné fáze na bázi oxidů kovů, především ZrO_2 . Retence modelových kyselin byla na tomto sorbentu vyhodnocena jako dostatečná, avšak nikoli v případě, kdy byla zkoušena retence těchto analytů v přítomnosti biologické matrice (např. plazmy). Cílem bylo vyzkoušet další sorbenty, které by měly výhodnější extrakční schopnosti vůči modelovým analytům a získané poznatky z úvodních obecných experimentů s vybranými zástupci kyselých a zásaditých látek na ZrO_2 -CARB uplatnit při vývoji metody pro selektivní extrakci methotrexátu. K molekule methotrexátu jsme dospěli díky předchozím experimentům s kyselinou listovou. U této kyseliny byl pro její strukturu (karboxylová funkce a objemnější hydrofobní skelet) předpoklad, že by mohlo dojít k její lepší extrakci na vybraném taktéž hydrofobnějším sorbentu ZrO_2 -CARB. Výtěžnosti kyseliny listové byly po SPE výborné jak v jednoduchém vzorku, tak ve vzorcích s plazmou.

Pokusy s methotrexátem byly prováděny na ZrO_2 -CARB a ZrO_2 -PBD s následným porovnáním s výsledky extrakcí na SiO_2 -C18. Reverzní silikagelová fáze byla použita především z referenčního hlediska. Konečným cílem tedy bylo vyvinout metodu SPE pro methotrexát na pevné fázi ZrO_2 -CARB a vyhodnotit její další možné použití.

Při hledání vhodných podmínek pro úspěšnou extrakci methotrexátu na zirkoničitých sorbentech byla také snaha sjednotit používaná činidla tak, aby byl proces co možná nejekologičtější a nejsnazší s eliminací případných chyb při nanášení různých druhů rozpouštědel v jednotlivých krocích postupu.

4. Experimentální část

4.1 Zařízení pro SPE a HPLC

Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

- SPE Manifold Supelco Visiprep
- Polypropylenové SPE kolonky 1 ml
- PE frity pro 1ml SPE kolonky
- Discovery DSC-18Lt 50 μm / 70 Å

ZirChrom (Anoka, USA)

- ZirChrom-CARB 25 μm / 300 Å
- ZirChrom-PBD 25 μm / 300 Å

Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

- HPLC systém Prominence s PDA detektorem SPD-M20A:
 - pumpy LC-20AD
 - autosampler SIL-20AC
 - řídící jednotka CBM-20A
 - kolonový prostor CTO-20AC

Waters Corporation (Massachusetts, USA)

- kolona Symmetry C18, 100 Å , 5 μm , 3,9x150 mm

4.2 Ostatní laboratorní vybavení

- Acidimetr 333 pH-metr - Druopta Praha (Praha, ČR)
- CL31R Multispeed Centrifuge - Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Kraintek K-10 ultrazvuková vana - Kraintek s.r.o. (Podhájska, Slovenská republika)
- Kern ABT 220-4M analytické váhy - KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo)
- Spektrofotometr UV-2401PC - Shimadzu (Kyoto, Japonsko)
- Laboratorní sklo, pomůcky a zařízení pro sušení dusíkem

4.3 Chemikálie

AstraZeneca, Londýn, Spojené království

- Lidokain

Lachema Brno-Neratovice, Česká republika

- Dihydrogenfosforečnan sodný
- Hydrogenfosforečnan sodný
- Kyselina p-aminobenzoová
- Mravenčan amonný
- Octan amonný

Merck Millipore-Merck-Darmstadt, Německo

- Acetonitril
- Čištěná voda (pokud je v rigorózní práci zmíněna voda, je tím myšlena čištěná voda)

Microgenics Corporation , Fremont, USA

- Moč

Penta-Praha, Česká republika

- 25% amoniak
- Hydroxid sodný
- Kyselina dusičná

Sigma Aldrich-St. Louis, USA

- Atenolol
- Diklofenak
- Ibuprofen
- Methotrexát
- Tetrahydrofuran
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan

4.4 Zásobní roztoky

5mM fosfátový pufr:

1,0 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 0,5 g hydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v 1 l vody. Hodnota pH byla 6,4.

5mM mravenčanový pufr:

176 μ l 5% NH_3 bylo v odměrné baňce naředěno vodou, hodnota pH byla upravena pomocí HCOOH na 2,8. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM octanový pufr:

0,019 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě. Hodnota pH byla upravena pomocí CH_3COOH na 4,7. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM pufr TRIS:

0,030 g TRIS bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě. Hodnota pH byla upravena pomocí HCl na 8,3. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

Ředění NH_3 :

NH_3 byl dle konkrétního pokusu ředěn na příslušnou koncentraci vodou, acetonitrilem THF, či MeOH. Pokud není uvedeno, ředění bylo provedeno vodou.

Zásobní roztok kyselých a zásaditých analytů

Každá z kyselin (PAB, DIC, IBU) či zásad (ATE, LID) byla rozpuštěna ve vodě na koncentraci 5 mg/ml. Tyto roztoky byly smíchány a naředěny příslušným prostředím dle uspořádání experimentu na koncentraci 50 µg/ml.

Zásobní roztok methotrexátu

Methotrexát byl rozpuštěn v roztoku K₂CO₃ (2,5 mg/ml) na koncentraci 5 mg/ml. Tento roztok byl smíchán a naředěn vodou na koncentraci 50 µg/ml.

Mobilní fáze A:

Fosfátový pufr o pH 6,4 byl smíchán s ACN v poměru 9 : 1, v/v.

Mobilní fáze B:

100% ACN.

4.5 Postup úpravy vzorku

Kolonky byly vybraným sorbentem plněny na místě množstvím 100 mg pevné fáze a k provedení SPE byla pro tvorbu podtlaku použita vodní vývěva. Pro vzorky ředěné plazmou byla použita králičí plazma s obsahem heparinu.

Pokud není uvedeno jinak, množství použitých činidel v průběhu SPE byla tato:

- *Kondicionace:* 1 ml
- *Nanesení vzorku:* 150 µl zásobního roztoku kyselin/zásad/MTX
- *Promytí:* 1 ml
- *Eluce:* 1,5 ml

Pokud není uvedeno jinak, kondicionační činidlo se shoduje s rozpouštědlem, jenž bylo použito pro naředění vzorku na koncentraci 50 µg/ml.

Vzorky po promytí byly přeplněny do vialek a připraveny k analýze. Vzorky po eluci byly vysušeny proudem dusíku, poté rekonstituovány 250 µl ACN a 250 µl vody. Porovnávací vzorek byl připraven odfoukáním 150 µl vzorku a rozpuštěním ve 250 µl ACN a 250 µl vody.

4.6 Analýza vzorků, podmínky

Analýza výsledných vzorků po SPE byla provedena pomocí HPLC. Nástřík na kolonu Symmetry C18 (100 Å, 5 µm, 3,9 × 150 mm) byl 20 µl, teplota kolony 25 °C, průtok mobilní fáze A a B (v poměru dle konkrétního pokusu) 1 ml/min.

Retence vybraných kyselin a zásad na ZrO₂-CARB:

Mobilní fáze (MF) A a B pro HPLC analýzu vzorků po SPE metodě byly v tomto poměru:

- Pro kyseliny: 60 % MF A a 40 % MF B
- Pro zásady: gradient MF B 10 % - 80 % (10 % - 50 % - 50 % - 80 % - 10 %)

Kyseliny PAB, DIC byly hodnoceny při vlnové délce 288 nm a IBU a zásady ATE, LID při $\lambda = 222$ nm.

Retence methotrexátu na ZrO₂-CARB, ZrO₂-PBD a SiO₂-C18:

Pokud není uvedeno jinak, roztok methotrexátu v plazmě či moči byl ředěn v poměru plazma / moč : roztok MTX 1 : 4. HPLC analýza probíhala za použití pouze mobilní fáze A. MTX byl hodnocen při vlnové délce 300 nm.

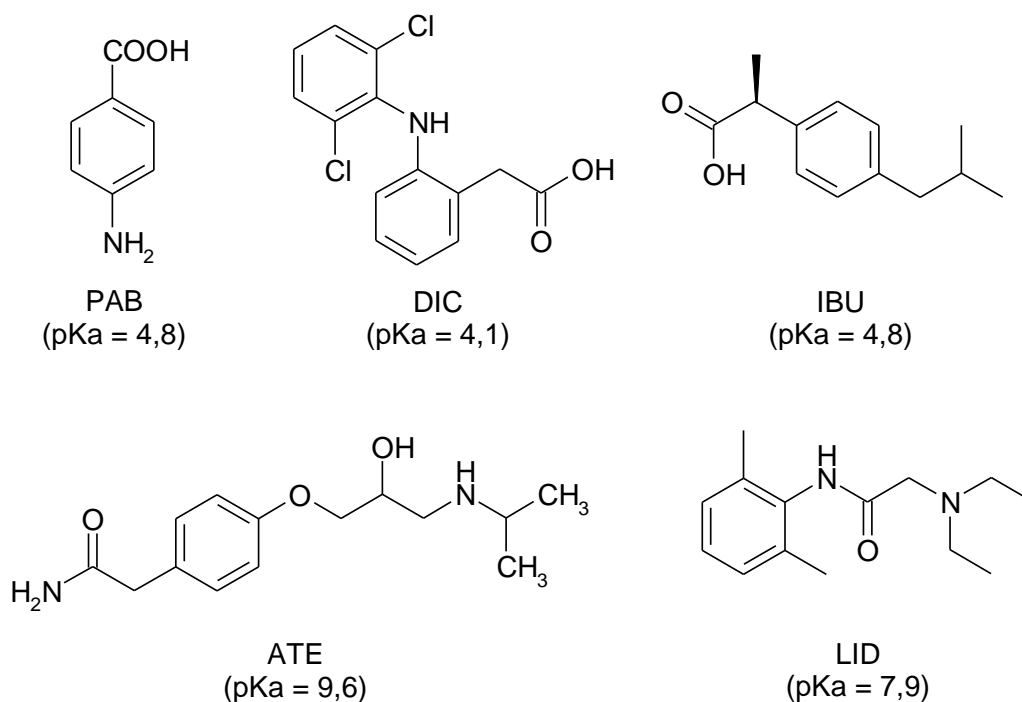
5. Výsledky a diskuze

Povrch námi použitého oxidu zirkoničitého je pokryt vrstvou uhlíku či polybutadienu. Takto modifikované sorbenty by měly s analyty interagovat podobně jako je tomu u jiných klasických reverzních fází, jako například SiO₂-C18 či SiO₂-C8, tedy pomocí především hydrofobních interakcí. Modifikace povrchu ZrO₂ jak polybutadienem, tak i grafitizovaným uhlíkem není 100%, a proto se dá předpokládat, že svou roli v retenci analytů může hrát kromě hydrofobních interakcí také ligandová výměna, popř. iontové interakce.

Nejdříve jsme chtěli otestovat podobně jako v naší diplomové práci (2) retenční chování vybraných kyselých a bazických analytů na ZrO₂-CARB. K dispozici jsme měli kyselinu p-aminobenzoovou (PAB), diklofenak (DIC), ibuprofen (IBU), atenolol (ATE) a lidokain (LID). (Obr. 20) Zkoušeli jsme prostředí o různém pH a následně porovnali retenci těchto modelových látek v přítomnosti biologické matrice (plazma a moč).

Po nalezení vhodných podmínek jsme začali s pokusy extrakce methotrexátu, jež byl pro tuto práci vybrán na základě předešlých experimentů se strukturálně podobnou kyselinou listovou, jež přinesly dobré výsledky za použití SPE na sorbentu ZrO₂-CARB. Retenci jsme následně zkoušeli i na ZrO₂-PBD a pro porovnání na silikagelovém sorbentu C18.

Uváděné koncentrace methotrexátu v krvi při měření jeho farmakokinetického profilu je 50 µg/ml v píku farmakokinetické křivky při vysokodávkovém léčebném režimu a 50 ng/ml po 24 h po perorálním podání (38). Koncentrace našich nanášených vzorků byla právě 50 µg/ml, tudíž by se dalo předpokládat, že by právě zkoumaný sorbent ZrO₂-CARB v případě dobrých výsledků byl použitelný pro úpravu vzorků s methotrexátem v plazmě před vlastní analýzou.



Obr. 20. Struktura modelových látek a jejich hodnoty pKa (51, 52, 53)

5.1 Retence vybraných kyselin a zásad na ZrO₂-CARB

Naším prvním úkolem bylo vyzkoušet různá prostředí s odlišnými hodnotami pH a jejich vliv na retenci vybraných kyselých a zásaditých analytů. Nejprve jsme měli experiment postavený čistě na vodném prostředí, tedy jsme kondicionovali a promývali vodou a poté jsme provedli postupnou eluci následujícími činidly: ACN, 5% NH₃ v ACN, 5% NH₃ v THF. (Tab. 3.)

Tab. 3. Výtěžnost SPE modelových analytů na ZrO₂-CARB, při použití vody pro kondicionaci a promytí

| analyt | 1. eluce | 2. eluce | 3. eluce |
|--------|----------|--------------------------|--------------------------|
| | ACN | 5% NH ₃ v ACN | 5% NH ₃ v THF |
| PAB | 0 % | 83 % | 7 % |
| DIC | 42 % | 49 % | 2 % |
| IBU | 45 % | 45 % | 4 % |
| ATE | 13 % | 93 % | 0 % |
| LID | 61 % | 19 % | 11 % |

Kondicionace: voda

Promytí: voda

Eluce: následně ACN, 5% NH₃ v ACN, 5% NH₃ v THF

Čistý acetonitril jako eluční činidlo se v tomto případě neosvědčil. Téměř veškeré množství přítomných analytů bylo vymyto až 5% NH₃ v ACN. Výjimkou byl lidokain, který byl z větší části eluován již samotným ACN. V případě IBU a DIC došlo k jejich vymytí acetonitrem téměř z 50 %, nicméně k jejich téměř úplné eluci došlo až po použití acetonitrilu s 5% podílem amoniaku.

Dále jsme ke kondicionaci a promytí použili octanový pufr o pH 4,7. Eluci jsme také zčásti pozměnili, eluovali jsme následně těmito rozpouštědly: ACN, THF a 5% NH₃ v ACN. (Tab. 4) Naším cílem bylo zjistit, zda by pro eluci vybraných analytů, které by nebyly vymyty acetonitrem při 1. eluci, nepostačil samotný tetrahydrofuran bez přídavku amoniaku.

Tab. 4. Výtěžnost SPE modelových analytů na ZrO₂-CARB, při použití octanového pufru pro kondicionaci a promytí

| analyt | 1. eluce | 2. eluce | 3. eluce |
|--------|----------|----------|--------------------------|
| | ACN | THF | 5% NH ₃ v ACN |
| PAB | 45 % | 10 % | 49 % |
| DIC | 84 % | 7 % | 8 % |
| IBU | 88 % | 6 % | 6 % |
| ATE | 48 % | 0 % | 54 % |
| LID | 57 % | 0 % | 54 % |

Kondicionace: octanový pufr (pH 4,7)

Promytí: octanový pufr (pH 4,7)

Eluce: následně ACN, THF, 5% NH₃ v ACN

Pouze diklofenak a ibuprofen byly téměř kvantitativně vymyty hned prvním elučním činidlem - ACN. U zbylých analytů (PAB, ATE, LID) došlo jen k jejich částečné eluci (~ 50 %). Následná eluce tetrahydrofuranem byla téměř bez efektu, což dokazuje, že analyty, které se nepodařilo eluovat acetonitrem v prvním kroku, nejsou na ZrO₂-CARB zadržovány pomocí hydrofobních interakcí. Zbylé množství PAB, ATE, LID bylo následně eluováno až acetonitrem s přítomným NH₃. Podíl amoniaku v ACN potřebný k vymytí PAB koresponduje s výsledky z mé diplomové práce (2), kde po eluci 5% NH₃ na ZrO₂ byla výtěžnost PAB 94 %.

Nutnost přídavku NH₃ dokazuje přítomnost interakce prostřednictvím výměny ligandů v případě PAB a v případě bazických analytů interakce iontové.

Použitím mravenčanového pufru jsme měli analyty nařaděny v prostředí s pH 2,8 a pro eluci jsme použili stejná činidla jako v předchozím experimentu,

tedy jsme provedli postupnou eluci kyselin a zásad acetonitrilem, THF a 5% NH₃ v ACN. (Tab. 5)

Tab. 5. Výtěžnost SPE modelových analytů na ZrO₂-CARB, při použití mravenčanového pufru pro kondicionaci a promytí

| analyt | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> | <i>3. eluce</i> |
|--------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| | ACN | THF | 5% NH₃ v ACN |
| PAB | 51 % | 2 % | 53 % |
| DIC | 94 % | 8 % | 5 % |
| IBU | 78 % | 7 % | 6 % |
| ATE | 58 % | 0 % | 39 % |
| LID | 44 % | 0 % | 71 % |

Kondicionace: mravenčanový pufr (pH 2,8)

Promytí: mravenčanový pufr (pH 2,8)

Eluce: následně ACN, THF, 5% NH₃ v ACN

Ačkoli bylo pH sníženo na hodnotu 2,8, dostali jsme po eluci podobné výsledky jako v předešlém pokusu s prostředím o pH 4,7. Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet více bazické prostředí a pro fázi kondicionace a promytí jsme použili TRIS pufr, jenž nám zajistil okolní podmínky s pH 8,3. Pro eluci jsme zkusili použít větší množství čistého acetonitrilu – 4 ml a následně jsme eluovali ještě rovnou 5% NH₃ v ACN. (Tab. 6)

Tab. 6. Výtěžnost SPE modelových analytů na ZrO₂-CARB, při použití TRIS pufru pro kondicionaci a promytí

| analyt | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> |
|--------|-----------------|--------------------------------|
| | 4 ml ACN | 5% NH₃ v ACN |
| PAB | 13 % | 9 % |
| DIC | 96 % | 7 % |
| IBU | 102 % | 12 % |
| ATE | 17 % | 97 % |
| LID | 102 % | 0 % |

Kondicionace: TRIS pufr (pH 8,3)

Promytí: TRIS pufr (pH 8,3)

Eluce: následně 4 ml ACN, 5% NH₃ v ACN

Větší množství acetonitrilu použitého při eluci bylo úspěšné v případě diklofenaku a ibuprofenu, což opět potvrzuje přítomnost ligandové interakce. V případě kyseliny p-aminobenzoové byla celková výtěžnost nízká, protože část (21 %) byla dokonce detekována v promývací fázi. Pro eluci atenololu byl potřebný 5% přídavek

amoniaku v acetonitrilu. Lidokain byl kvantitativně eluován již 4 ml ACN. Roli při rozdílné retenci těchto dvou bazických látek hraje pravděpodobně vliv pH, tedy že se zde uplatňují kromě hydrofobních interakcí také iontová výměna, v případě atenololu s $pK_a = 9,6$ v prostředí TRIS pufru.

Jako nejvhodnější podmínky pro průběh extrakce jsme vybrali uspořádání experimentu s použitím vody, tedy i vzorek analytů naředěný vodou. Jako vhodné eluční činidlo se jevil acetonitril, v množství 4 ml, případně následně 1,5 ml 5% NH_3 v ACN. Rozhodli jsme se proto tento postup ověřit na vzorku kyselin a zásad v přítomnosti plazmy, přičemž jsme sorbent promývali postupně nejdříve vodou a poté 20% ACN pro vymytí balastů z plazmy uchycených na ZrO_2 -CARB. Zásobní roztoky kyselin a zásad byly naředěny plazmou v poměru plazma : roztok analytů 1 : 4. (Tab. 7)

Tab. 7. Výtěžnost SPE modelových analytů v plazmě na ZrO_2 -CARB

| analyt | <i>1. promytí</i> | <i>2. promytí</i> | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> |
|--------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------------------|
| | voda | 20% ACN | 4 ml ACN | 5% NH_3 v ACN |
| PAB | 52 % | 17 % | 2 % | 9 % |
| DIC | 14 % | 9 % | 19 % | 17 % |
| IBU | 17 % | 32 % | 5 % | 21 % |
| ATE | 4 % | 15 % | 12 % | 60 % |
| LID | 0 % | 0 % | 70 % | 0 % |

Kondicionace: voda

Promytí: následně voda, 20% ACN

Eluce: následně 4 ml ACN, 5% NH_3 v ACN

Retence všech látek až na lidokain a atenolol v přítomnosti plazmy byla snížena a tyto byly detekovány v promývací fázi. Pouze již zmíněné baze byly na ZrO_2 -CARB zadrženy, avšak eluovány byly v případě LID jen ze 70 % při první eluci ACN a v případě ATE pouze z 60 % až při druhé eluci 5% NH_3 v ACN. Příčinou těchto nízkých extrakčních výtěžností a ztráta analytů v promývací fázi je nejspíš nežádoucí interference plazmy se zkoušeným sorbentem.

Stejný pokus jsme provedli s látkami v prostředí moči. Analyty byly opět naředěny v poměru moč : roztok látek 1 : 4. (Tab. 8)

Tab. 8. Výtěžnost SPE modelových analytů v moči na ZrO₂-CARB

| analyt | <i>1. promytí</i> | <i>2. promytí</i> | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> |
|--------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|
| | voda | 20% ACN | 4 ml ACN | 5% NH₃ v ACN |
| PAB | 2 % | 34 % | 2 % | 15 % |
| DIC | 0 % | 0 % | 76 % | 35 % |
| IBU | 0 % | 15 % | 10 % | 29 % |
| ATE | 0 % | 34 % | 14 % | 72 % |
| LID | 0 % | 0 % | 78 % | 0 % |

Kondicionace: voda**Promytí:** následně voda, 20% ACN**Eluce:** následně 4 ml ACN, 5% NH₃ v ACN

V tomto případě matrice vzorku tolik neinterferovala s povrchem pevné fáze. Pouze kyselina p-aminobenzoová byla sorbentem zadržena a došlo pouze k její částečné eluci. Některé analyty byly vymyty již po první eluci (DIC, LID), u dalších (IBU, ATE) byl potřeba v acetonitrilu obsažený amoniak, jakožto silná Lewisova báze, pravděpodobně nutná k přerušení interakcí mezi těmito látkami a ZrO₂-CARB.

5.2 Retence methotrexátu na ZrO₂-CARB, ZrO₂-PBD a SiO₂-C18

Výsledky z předešlých experimentů s roztoky vybraných modelových látek jsme aplikovali na vzorek methotrexátu. Nejdříve jsme zkoušeli míru extrakční schopnosti pro MTX vybraného sorbentu ZrO₂-CARB a porovnávali ji s fázemi ZrO₂-PBD a SiO₂-C18. (Tab. 9) Kondicionaci sorbentů jsme provedli vodou, promývali jsme postupně nejdříve vodou, poté 10% ACN a pro následnou eluci MTX jsme použili ACN v množství 4 ml, poté 5% NH₃ v ACN a nakonec 5% NH₃ v THF.

Tab. 9. Porovnání retence MTX bez plazmy různými sorbenty

| MTX <i>bez plazmy</i> | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> | <i>3. eluce</i> |
|--------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 4 ml ACN | 5% NH₃ v ACN | 5% NH₃ v THF |
| ZrO ₂ -CARB | 0 % | 29 % | 87 % |
| ZrO ₂ -PBD | 31 % | 18 % | 77 % |
| SiO ₂ -C18 | 14 % | 14 % | 22 % |

Kondicionace: voda**Promytí:** následně voda, 10% ACN**Eluce:** následně 4 ml ACN, 5% NH₃ v ACN, 5% NH₃ v THF

V promývací fázi nebyl MTX detekován na žádném ze zkoušených sorbentů. Teprve až 5% amoniak ředěný THF dokázal v případě ZrO₂-CARB a ZrO₂-PBD eluovat methotrexát z povrchu těchto sorbentů. Na reverzní silikagelové fázi však byl

pravděpodobně methotrexát zadržen silnější interakcí. Stejný postup jsme aplikovali i na methotrexát v přítomnosti plazmy. (Tab. 10)

Tab. 10. Porovnání retence MTX v plazmě různými sorbenty

| MTX v plazmě | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> | <i>3. eluce</i> |
|------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 4 ml ACN | 5% NH₃ v ACN | 5% NH₃ v THF |
| ZrO ₂ -CARB | 0 % | 22 % | 88 % |
| ZrO ₂ -PBD | 11 % | 11 % | 76 % |
| SiO ₂ -C18 | 22 % | 14 % | 24 % |

Kondicionace: voda

Promytí: následně voda, 10% ACN

Eluce: následně 4 ml ACN, 5% NH₃ v ACN, 5% NH₃ v THF

Mechanismus retence v tomto případě nebyl ovlivněn přítomnou plazmou a byly tak získány obdobné výsledky jako v předešlém pokusu. Dále jsme zkoušeli možnost použití samotného tetrahydrofuranu jako elučního činidla a tím zrychlit celý proces, jelikož by došlo ke zkrácení doby potřebné k vysušení vzorku proudem dusíku po SPE. (Tab. 11) K promytí jsme již použili přímo 10% ACN a zkoušce byl podroben pouze ZrO₂-CARB.

Tab. 11. Výtěžnost SPE methotrexátu ve vzorku bez plazmy a s plazmou na ZrO₂-CARB

| MTX | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> |
|------------|-----------------|--------------------------------|
| | THF | 5% NH₃ v THF |
| bez plazmy | 29 % | 79 % |
| v plazmě | 23 % | 92 % |

Kondicionace: voda

Promytí: 10% ACN

Eluce: následně THF, 5% NH₃ v THF

I v tomto případě, jako se nám už jednou ukázalo, je ke zrušení interakcí mezi MTX a konkrétním sorbentem nutný obsah amoniaku v tomto případě v organickém rozpouštědlu THF. Stejný pokus jsme uskutečnili s roztokem MTX naředěným močí. (Tab. 12) Zde jsme již porovnávali výsledky vybraných sorbentů.

Tab. 12. Porovnání retence MTX v moči různými sorbenty

| MTX v moči | <i>1. eluce</i> | <i>2. eluce</i> |
|------------------------|-----------------|--------------------------------|
| | THF | 5% NH₃ v THF |
| ZrO ₂ -CARB | 25 % | 88 % |
| ZrO ₂ -PBD | 19 % | 80 % |
| SiO ₂ -C18 | 12 % | 27 % |

Kondicionace: voda

Promytí: 10% ACN

Eluce: následně THF, 5% NH₃ v THF

Bylo dosaženo opět poměrně dobrých výsledků extrakce methotrexátu z moči. Ačkoli na silikagelové fázi byl MTX nejspíše zase pevněji zachycen a k jeho úplné eluci nedošlo.

Dále jsme již pracovali pouze se vzorky MTX v plazmě či moči.

1.) MTX v plazmě

ZrO₂-CARB

Nejdříve jsme pro lepší průběh SPE a snadnější manipulaci s činidly zčásti obměnili právě používaná rozpouštědla. Před samotnou kondicionací 10% ACN jsme ještě sorbent ZrO₂-CARB aktivovali pomocí acetonitrilu, abychom případně ještě více zlepšili podmínky a extrakční schopnost této pevné fáze. Promývali jsme opět 10% ACN a k eluci MTX v plazmě jsme použili přímo 5% NH₃ v THF. Extrakční výtěžnost činila 97 %. Dále jsme chtěli zjistit, jaké množství amoniaku je ještě nutné pro úspěšnou eluci MTX. Za stejného průběhu SPE jsme v dalším experimentu eluovali následně odstupňovanými koncentracemi amoniaku ředěného methanolem. Eluci jsme uskutečnili tedy postupně 0,85%, 1,7%, 3,4% a 6,8% NH₃ v MeOH. Methanolický roztok amoniaku jsme použili opět z důvodu zkrácení doby potřebné k vysušení vzorků po extrakci. Analýza nám ukázala, že již právě nejméně koncentrovaný amoniak vymyl MTX z povrchu ZrO₂-CARB, a to z 92 %, a tedy že druh použitého organického rozpouštědla nehraje zásadní roli. V následujícím experimentu jsme zkusili eluovat v řadě ještě s nižšími koncentracemi methanolického roztoku NH₃ – následně 0,1%, 0,2%, 0,4% a 0,85% NH₃ v MeOH. Ukázalo se, že opět již nejnižší koncentrace postačuje k vymytí MTX ze ZrO₂-CARB, ačkoli už jen ze 72 %, dalších 18 % bylo vymyto následně 0,2% NH₃ v MeOH. Pro úplnost jsme ještě vyzkoušeli eluci

samotným MeOH při stejném uspořádání pokusu. K eluci MTX nedošlo vůbec. Z výsledků nám bylo jasné, že určitý podíl amoniaku je v elučním činidle nutný.

ZrO₂-CARB - opakovatelnost

Následně jsme zkoušeli opakovatelnost výše uvedeného postupu, kdy jsme aktivovali sorbent 100% ACN, kondicionovali 10% ACN, vzorek jsme po nanesení promyli 10% ACN a k eluci jsme použili 0,2% NH₃ v MeOH. Opakovatelnost jsme provedli na 6 kolonkách zároveň. Průměr extrakčních výtěžností činil 79 % s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) 11 %. Tutéž opakovatelnost jsme zkoumali s 0,4% NH₃ v MeOH pro eluci. Průměr výsledných výtěžností byl ještě nižší – 59 % s RSD 14 %. Těchto šest kolonek jsme následně promyli ještě 0,85% NH₃ v MeOH. Došlo k následné eluci zadržného MTX. To nás zavedlo k názoru, že ačkoli je zřejmě nutná přítomnost amoniaku v MeOH, aby došlo k eluci methotrexátu, nestačí k jeho dostatečnému vymytí množství pouze 1,5 ml tohoto činidla. V příštím experimentu jsme za stejných podmínek tedy použili k eluci 3 ml 0,2% NH₃ v MeOH a průměr výtěžností z 6 kolonek činil 94 % s RSD 4 %. Pro zjednodušení průběhu metody jsme obměnili používaný acetonitril za methanol a zkusili, zda tyto podmínky stále vyhovují pro extrakci MTX. ZrO₂-CARB jsme tedy aktivovali 100% MeOH, kondicionovali a promývali 10% MeOH, k eluci jsme použili 3 ml NH₃ v MeOH. MTX byl za těchto podmínek z povrchu sorbentu úspěšně extrahován z 93 %. Pro nejvhodnější extrakci methotrexátu na ZrO₂-CARB jsme dospěli k těmto podmínkám:

Aktivace sorbentu: 1,5 ml 100% MeOH

Kondicionace: 1 ml 10% MeOH

Promytí: 1 ml 10% MeOH

Eluce: 3 ml 0,2% NH₃ v MeOH

Dále nám už zbývalo provést tento proces pro methotrexát v prostředí neředěné plazmy. Extrakční výtěžnost v experimentu s neředěnou plazmou za vybraných podmínek nám pro MTX vyšla 94 %.

2.) MTX v moči

ZrO₂-CARB a opakovatelnost

Výsledně zvolené podmínky pro SPE methotrexátu v plazmě jsme aplikovali na MTX v moči. K eluci MTX došlo v průměru ze 100 %. Následně provedená opakovatelnost na 6 kolonkách byla také vysoká – 99 % s relativní směrodatnou odchylkou 2 %. Výtěžnost experimentu s MTX v neředěné moči byla taktéž vysoká - 105 %.

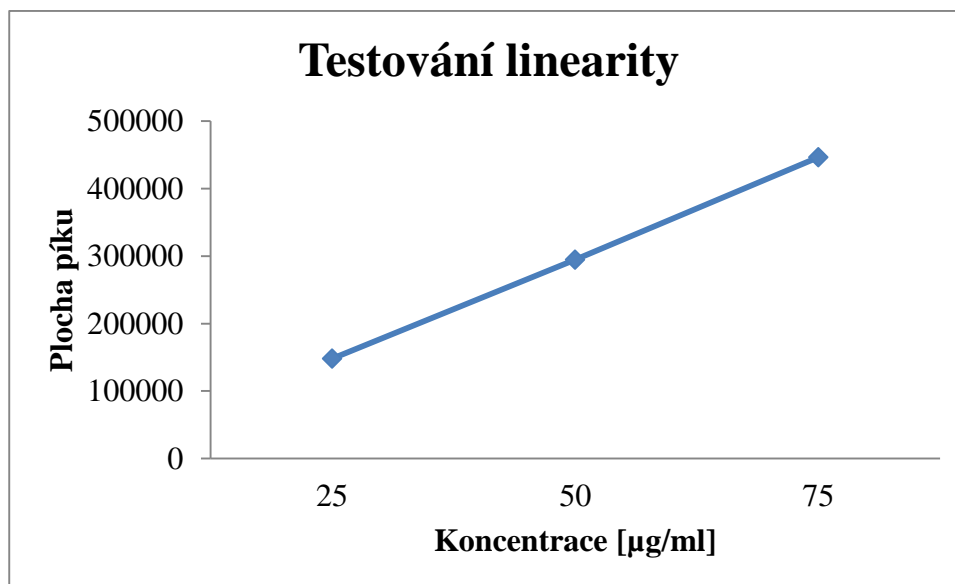
3.) Srovnání se sorbenty ZrO₂-PBD a SiO₂-C18

Pro porovnání jsme zkoumali extrakci MTX v plazmě na ZrO₂-PBD a SiO₂-C18. Za podmínek aktivace 100% ACN, kondicionace a promytí 10% ACN a eluce 0,2% NH₃ v MeOH jsme nezískali dobré výsledky extrakce, jelikož téměř všechen methotrexát byl přítomen po analýze v promývací fázi, a to u ZrO₂-PBD ze 109 % a u SiO₂-C18 z 98 %. Obměnili jsme proto postup tak, že jsme kondicionovali namísto 10% ACN pouze vodou – stejně jako v experimentech s modelovými analyty. V promytí již nebylo detekováno žádné množství MTX, avšak nedošlo ani k úspěšné eluci. Na ZrO₂-PBD byl MTX vymyt pouze ze 14 % a na SiO₂-C18 z 16 % za použití 0,2% methanolického NH₃ v objemu 3 ml.

5.3 Testování linearity – ZrO₂-CARB

Linearitu metody za konečných podmínek jsme testovali v rozmezí +/- 50 % obsahu MTX na třech hladinách v plazmě 25 µg/ml, 50 µg/ml a 75 µg/ml. (Obr. 21)

Obr. 21. Graf závislosti ploch píků na koncentraci MTX v prostředí plazmy



Aktivace sorbentu: 100% MeOH
Kondicionace: 10% MeOH
Promytí: 10% MeOH
Eluce: 3 ml 0,2% NH₃ v MeOH

Nanesené koncentrace MTX byly ze sorbentu úspěšně extrahovány a závislost plochy píků na koncentraci MTX byla lineární.

5.4 Regenerace ZrO₂-CARB

V samotném závěru našich experimentů jsme se pokusili použítý sorbent regenerovat a vyzkoušet na něm opět jeho extrakční schopnosti. Jeho regeneraci jsme provedli dle postupu výrobce, tedy 3,5 g ZrO₂-CARB jsme promyli vždy dvojnásobně:

- 25 ml 20/80 ACN/0,1M NaOH,
- 25 ml vody,
- 25 ml 20/80 ACN/0,1M HNO₃,
- 25 ml vody,
- 25 ml THF.

Po každém kroku (mimo kroku s THF) byl sorbent vložen na 10 min do ultrazvukové vany a na 10 min do centrifugy při 5000 otáčkách za minutu.

Na takto ošetřeném sorbentu byl při námi konečně zvolených podmínkách methotrexát úspěšně extrahován, a to ze 99 %.

6. Závěr

Výsledky různých uspořádání SPE zkoušených v úvodních experimentech s modelovými látkami nám poskytly přehled o extrakčních schopnostech ZrO₂-CARB, a tyto poznatky jsme následně využili k vývoji metody pro SPE extrakci methotrexátu z plazmy a moče.

Při výzkumu extrakčních schopností sorbentu ZrO₂-CARB s využitím modelových analytů jsme se dosáhli různých výsledků. Kyseliny p-aminobenzoovou, diklofenak, ibuprofen a báze atenolol, lidokain jsme v prostředích o různých pH extrahovali pomocí SPE. Za nepřítomnosti biologické matrice jsme dospěli k výtěžnosti větší než 95 % téměř u všech vybraných látek při jejich eluci 5% amoniakem ředěným ACN.

Při pH 4,7 a 2,8 stačilo k eluci DIC a IBU použít 100% acetonitril, zbylé analyty bylo potřeba eluovat opět 5% NH₃ v ACN. V zásaditém pH 8,3 došlo k eluci acetonitrem (4 ml) kromě DIC a IBU také u LID. Jistý vliv na různé chování kyselin při jejich extrakci lze kromě hydrofobních interakcí přisuzovat také ligandové výměně s povrchem ZrO₂-CARB. Naopak bazické látky tuto schopnost postrádají, ale jejich chování ovlivňuje mimo hydrofobních interakcí také iontová výměna s nemodifikovaným oxidem zirkoničitým.

Extrakční výtěžnost kyselin a zásad v pokusech s plazmou či s močí již nebyla tak vysoká. V experimentech, kdy jsme použili jako matici plazmu, byly všechny analyty až na lidokain a atenolol zčásti detekovány také v promývací fázi. Lidokain byl eluován jen ze 70 % čistým ACN a ATE z 60 % 5% NH₃ v ACN. V prostředí moči jsme dosáhli o něco lepších výsledků pro DIC (76 %), LID (78 %) po eluci 4 ml ACN a ATE (72 %) po eluci až 5% NH₃ v ACN. Je tomu tak proto, že biologická matrice také patrně interaguje s povrchem sorbentů a obsazuje vazebná místa pro analyty.

Následovaly pokusy s methotrexátem na ZrO₂-CARB, ZrO₂-PBD a SiO₂-C18. MTX byl úspěšně eluován z povrchů ZrO₂-CARB a ZrO₂-PBD 5% NH₃ v THF. Tyto experimenty s MTX byly provedeny v prostředí bez plazmy, následně s plazmou a s močí. Naopak na SiO₂-C18 byl MTX zachycen a k jeho úplné eluci nedošlo.

Při hledání vhodných podmínek pro extrakci MTX pomocí SPE metody jsme pro ZrO₂-CARB došli k postupu, kdy byl tento sorbent aktivován před samotným procesem 100% methanolem, dále kondicionován 10% MeOH, nanesený vzorek methotrexátu v plazmě nebo moči byl promyt 10% MeOH a zachycený methotrexát byl

nakonec eluován 3 ml 0,2% NH_3 v MeOH. Metoda za těchto podmínek byla pro MTX opakovatelná s RSD 4 % při průměrné výtěžnosti 94 % v plazmě a s RSD 2 % a průměrné výtěžnosti 99 % v moči. Extrakce byla úspěšná i při nanesení methotrexátu v prostředí neředěné plazmy či moči.

Závěrem lze konstatovat, že jsme dosáhli daných cílů. Vyvinuli jsme postup SPE pro methotrexát. Výsledky extrakce MTX na ZrO_2 -CARB při výsledném upořádání dosahují téměř 100% výtěžností a to jak v jednoduchém vzorku, tak také v přítomnosti plazmy, či moči. Výsledky jsou opakovatelné. Úspěšně proběhl také pokus regenerovat ZrO_2 -Carb pro jeho opakované použití. V rámci samotného uspořádání se nám také podařilo sjednotit používaná činidla. Dále by bylo zapotřebí se zaměřit na nižší koncentrace MTX a otestovat tak linearitu námi vyvinuté metody. S tím souvisí i samotná analýza výsledného vzorku po extrakci, která by pro tyto potřeby měla být realizována citlivějšími systémy, např. pomocí hmotnostního spektrometru. Bylo by také vhodné otestovat extrakční schopnost ZrO_2 -CARB také pro hlavní metabolit MTX – 7-hydroxymethotrexát, který je v praxi hodnocen ve vzorcích lidské plazmy. Před praktickým využitím musí být metoda zvalidována v souladu s ICH směrnicemi.

7. Zdroje

1. MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Vol. 162. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 458 s. ISBN 0-471-32845-6. (2003)
2. NEZVEDOVÁ, M. Nesilikagelové materiály v analýze léčiv I. 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv.
3. Waters. A Sample Preparation Primer and Guide to Solid Phase Extraction Methods Development. [online] (2001) [cit. 2014-10-26], dostupné z: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa20300.pdf>>
4. MOKRÝ, M. Přednášky z předmětu Monitorování lékových hladin. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK. Ak. r. 2012/2013.
5. ALTUN, Z. New Techniques for Sample Preparation in Analytical Chemistry. Karlstad, Karlstad University Studies 2005:24. Sweden: Universitetsstryckeriet, Karlstad. 34 s. ISSN 1403-8099. ISBN 91-85335-65-7. [online] (2005) [cit. 2014-10-26], dostupné z: <<http://kau.diva-portal.org/smash/get/diva2:5262/FULLTEXT01.pdf>>
6. Supelco. Guide to Solid Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co. [online] (1998) [cit. 2014-10-26], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>
7. BEHMÜLLER, R.; FORSTENLEHNER, I. C.; TENHAKEN, R.; HUBER, Ch. G. Quantitative HPLC-MS analysis of nucleotide sugars in plant cells following off-line SPE separation. Anal Bioanal Ch., DOI 10.1007/s00216-014-7746-3.
8. Sigma-Aldrich. Analytical/Chromatography. [online] (2014) [cit. 2014-11-8], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html>>
9. Solid-Phase Extraction (SPE). [online] [cit. 2014-10-26], dostupné z: <<http://www.uoi.gr/research/labs/envitech/SPE.htm>>
10. Phenomenex, Inc. SPE Reference Manual & Users Guide, 2011. Gen-Lab Kft.

11. SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. Introduction to solid phase extraction. [online] (2000) [cit. 2014-11-14], dostupné z: <http://ww2.araku.ac.ir/~g_azimi/Solid_Phase_ext/SPE_CH01.PDF>
12. CHEN, L.; WANG, H.; ZENG, Q.; XU, Y.; SUN, L.; XU, H.; DING, L. On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography - A Review. *J. Chromatogr. Sci.* 2009, 47 (8), s. 614-623.
13. Labicom s.r.o. Manuální SPE. [online] (2014) [cit. 2014-10-26], dostupné z: <<http://www.labicom.cz/manualni-spe-144/>>
14. Labicom s.r.o. Supelco. [online] [cit. 2014-10-26], dostupné z: <http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Manifold_Supelco_SPE.pdf>
15. Supelco Solid Phase Extraction Products. [online] (2007) [cit. 2014-11-12], dostupné z: <http://www.lsc.gr/attachments/File/spe_brochure.pdf>
16. MAJORS, R.; STEVENS, J. Advances in Method Development in SPE. [online] (2009) [cit. 2014-11-14], dostupné z: <<http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Advances%20in%20Method%20Development%20SPE.pdf>>
17. Waters. SPE Method Development. [online] (2014) [cit. 2014-11-14], dostupné z: <http://www.waters.com/waters/en_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845>
18. Santiago. Florisil. [online] (2014) [cit. 2014-11-8], dostupné z: <<http://www.santiago.cz/eshop/chemikalie-santiago/silikagel/florisil>>
19. Macherey-Nagel. Florisil® adsorbent for column chromatography. [online] (2014) [cit. 2014-11-8], dostupné z: <<http://www.mn-net.com/LCadsorbents/LCadsorbents/FlorisilforLC/tabid/6003/language/en-US/Default.aspx>>
20. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; McCORMICK, A.; CARR, P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chrom. A.* 2004, 1028, s. 1-30.

21. UCDavis. Ion Exchange Chromatography. [online] 2014 [cit. 2014-11-8], dostupné z:
<http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography/Ion_Exchange_Chromatography>
22. Waters. SPE Method Development Summary. [online] (2014) [cit. 2014-10-26], dostupné z: <http://www.waters.com/waters/en_CZ/SPE-Method-Development-Summary/nav.htm?cid=10083883&locale=en_CZ>
23. NAWROCKI, J.; RIGNEY, M. P.; McCORMICK, A.; CARR, P.W. Chemistry of zirconia and its use in chromatography. *J. Chrom. B.* 1993, 657, s. 229-282.
24. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; ZHAO, J.; McNEFF, C. V.; McCORMICK, A.; CARR, P. W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chrom. A.* 2004, 1028, s. 31-62.
25. DOUŠA, M. a kol. Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC. [online] (2014) [cit. 2014-11-15], dostupné z:
<<http://www.hplc.cz/Teorie/zir-chrom.htm>>
26. HU, Yu-Ling; FENG, Yu-Qi; WAN, Jian-Di; DA, Shi-Lu. Comparison of chromatographic properties of lewis base-modified mixed oxides as stationary phases for HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 2002, 25(1), s. 83-99.
27. NAWROCKI, J.; DUNLAP, Ch. J.; CARR, P. W.; BLACKWELL, J. A. New Materials for Biotechnology: Chromatographic Stationary Phases Based on Zirconia. *Biotechnol. Prog.* 1994, 10, s. 561-573.
28. ZirChrom. Newsletter Vol. #14. [online] (2014) [cit. 2014-11-15], dostupné z:
<<http://www.zirchrom.com/newsletterprint.asp>>
29. HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.; ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV.* Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum, 2006. 166 s. ISBN 80-246-1169-4.
30. SLÍVA, J.; VOTAVA, M. *Farmakologie.* Praha: Nakladatelství Triton, 2010. 238 s. ISBN 978-80-7387-424-7.
31. Lab Tests Online. Methotrexate. [online] (2014) [cit. 2014-11-29], dostupné z:
<<http://labtestsonline.org/understanding/analytes/methotrexate/tab/test/>>

32. AVERNS, H. Guideline for the prescription and monitoring of methotrexate for the rheumatic diseases. [online] (2008) [cit. 2014-11-29], dostupné z: <https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&sqi=2&ved=0CEsQFjAF&url=http%3A%2F%2Frheumors.com%2FMethotrexate_monitoring.doc&ei=XOt5VPaGHYLLatTNgpgH&usg=AFQjCNHmAcvDBw4A9x7LK0ADuwjF-TIfuw&sig2=gaXIJBjYqMw_qxUPnQ_Hvg&bvm=bv.80642063,d.d2s>
33. GRIM, J. Interakce nízkodávkovaného metotrexátu. Ústav farmakologie, LF UK, Hradec Králové. [online] (2001) [cit. 2014-11-29], dostupné z: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/interakce-nizkodavkovaneho-metotrexatu-133843>>
34. ŠEDO VÁ, L.; SVOBODO VÁ, R. Methotrexát v léčbě revmatoidní artritidy. [online] (2009) [cit. 2014-11-29], dostupné z: <<http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Methotrexat-v-lecbe-revmatoidni-artritidy/6-F-IP.magarticle.aspx>>
35. John Hopkins Arthritis Center. [online] (2015) [cit. 2015-2-7], dostupné z: <<http://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-treatment/>>
36. PubChem. Methotrexate. [online] (2015) [cit. 2015-2-7], dostupn z: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methotrexate#section=Top>>
37. VOKŘÁL, I. Semináře z předmětu Farmakologie II. Katedra farmakologie a toxikologie. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK. Ak. r. 2012/2013.
38. RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. J. Chrom. B. 2001, 764, s. 217-254.
39. GUO, P.; Wang, X.; LIU, L.; BELINSKY, M. G.; KRUH, G. D.; GALLO, J. M. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007, 43, s. 1789-1795.
40. SONEMOTO, E.; KONO, N.; IKEDA, R.; WADA, M.; UEKI, Y.; NAKASHIMA, K. Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS. Biomed. Chrom. 2012, 26, s. 1297-1300.

41. UCHIYAMA, M.; MATSUMOTO, T.; MATSUMOTO, T.; JIMI, S.; TAKAMATSU, Y.; TAMURO, K.; HARA, S. Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction. *Biomed. Chrom.* 2012, 26, s. 76-80.
42. WANG, R.; GUO, L.; XIE, H.; ZHANG, J.; LI, X.; LI, W.; WANG, J.; WU, X.; JIA, Z. Determination of Concentration of Methotrexate Enantiomers in Intracellular and Extracellular Fluids of HepG₂ Cells by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Cell. Biochem. Biophys.* 2013, 67, s. 1343-1351.
43. COCIGLIO, M.; HILLAIRE-BUYS, D.; ALRIC, C. Determination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by liquid chromatography for routine monitoring of plasma levels. *J. Chrom. B.* 1995, 674, s. 101-110.
44. STEINBORNER, S.; HENION, J. Liquid-Liquid Extraction in the 96-Well Plate Format with SRM LC/MS Quantitative Determination of Methotrexate and Its Major Metabolite in Human Plasma. *Anal. Chem.* 1999, 71, s. 2340-2345.
45. SPARREBOOM, A.; LOOS, W. J.; NOOTER, K.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. Liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of methotrexate in cancer patients co-treated with docetaxel. *J. Chrom. B.* 1999, 735, s. 111-119.
46. LI, H.; LUO, W.; ZENG, Q.; LIN, Z.; LUO, H.; ZHANG, Y. Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. *J. Chrom. B.* 2007, 845, s. 164-168.
47. RULE, G.; CHAPPLE, M.; HENION, J. A 384-Well Solid-Phase Extraction for LC/MS/MS Determination of Methotrexate and Its 7-Hydroxy Metabolite in Human Urine and Plasma. *Anal. Chem.* 2001, 73, s. 439-443.
48. SKIBIŃSKA, Ł.; GREGORCZYK, J.; JARMOŁOWICZ, A. HPLC Determination of Methotrexate and Its Metabolites in Blood Plasma. *Chem. Anal. (Warsaw)* 2005, 50, s. 551-560.

49. BECK, O.; SEIDEMAN, P.; WENBERG, M.; PETERSON, C. Trace Analysis of Methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in Human Plasma and Urine by a Novel High-Performance Liquid Chromatographic Method. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1991, 13, s. 528-532.
50. LOBO, E. D.; BALTHASAR, J. P. Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for methotrexate in the presence and absence of anti-methotrexate antibody fragments in rat and mouse plasma. *J. Chrom. B*. 1999, 736, s. 191-199.
51. Drugbank. Open Data Drug & Drug Target Database. [online] (2014) [cit. 2014-04-30], dostupné z: <<http://www.drugbank.ca/>>
52. Drug Future. Atenolol. [online] (2013) [cit. 2014-12-2], dostupné z: <<http://www.drugfuture.com/chemdata/atenolol.html>>
53. SKLENÁŘ, Z.; HORÁČKOVÁ, K. Nové léčivé látky v magistraliter receptuře X – lidokain a lidokain-hydrochlorid. *Prakt. lékařn.* 2011, 7 (5), s. 232-235. [online] [cit. 2014-12-2], dostupné z: <<http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2011/05/07.pdf>>