

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



## ANALYTICKÉ HODNOCENÍ LÉČIV S VYUŽITÍM HPLC II.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Eva Hanková

Vedoucí práce: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Hradec Králové, 2018

Prohlášení autorky:

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové dne

Podpis: .....

Na tomto místě bych moc ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Milanovi Mokrému, CSc. za jeho čas, odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady, které mi pomohly při vypracování této práce. Mé poděkování patří také celému kolektivu Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývala analytickým hodnocením kyseliny tiaprofenové pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro stanovení kyseliny tiaprofenové byla použita kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) a mobilní fáze složená z acetonitrilu a vodného pufru KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/l v poměru 40 : 60 (v/v). pH pufru bylo upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,0; průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/min a teplota na 22 °C. Jako vnitřní standard byl zvolen naproxen a k detekci byla použita vlnová délka 263 nm.

Protože je kyselina tiaprofenová chirální látka vyskytující se ve formě racemátu, následoval výběr chromatografických podmínek pro separaci jejích enantiomerů. Byly zkoušeny dvě chirální kolony v normálním i reverzním módu. Jako nejvhodnější byla vybrána kolona Chiralcel OD-R, 250 × 4,6 mm, (10 µm) na bázi celulózy za použití mobilní fáze o složení *n*-hexan : propan-2-ol : kyselina octová v poměru 94 : 6 : 0,1 (v/v/v) při průtoku 0,5 ml/min a teplotě 22 °C. Enantiomery byly eluovány v retenčních časech 28,3 a 30,7 minut s rozlišením 1,17.

Na závěr byla provedena extrakce kyseliny tiaprofenové z lidské plasmy, pro kterou byla vybrána metoda extrakce kapalina-kapalina s průměrnou výtěžností 98,9 %.

## Abstract

This diploma thesis dealt with analytical evaluation of tiaprofenic acid using high performance liquid chromatography. To determine tiaprofenic acid, a LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) column and a mobile phase consisting of acetonitrile and aqueous KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 0.01 mol/l in a ratio of 40 : 60 (v/v) were used. The pH of the buffer was adjusted to 3.0 with phosphoric acid, the flow rate was set to 1 ml/min and the temperature at 22 °C. Naproxen was chosen as the internal standard, and a 263 nm wavelength was used for detection.

Since the tiaprofenic acid is a chiral substance present in the form of a racemate, the selection of chromatographic conditions for the separation of its enantiomers followed. Two chiral columns in both normal and reverse mode were tested. The cellulose-based Chiralcel OD-R 250 x 4.6 mm (10 µm) column was chosen as the most suitable, using a mobile phase of n-hexane : propan-2-ol : acetic acid in a ratio of 94 : 6 : 0,1 (v/v/v) at a flow rate of 0.5 ml/min and a temperature of 22 °C. Enantiomers were eluted at retention times of 28.3 and 30.7 minutes with a resolution of 1.17.

Finally, extraction of tiaprofenic acid from human plasma was performed, for which a liquid-liquid extraction method was chosen with an average yield of 98.9 %.

## Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Cíl práce.....	9
3.	Teoretická část .....	10
3.1.	Chromatografické metody.....	10
3.1.1.	Rozdělení chromatografických metod .....	10
3.2.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	14
3.2.1.	Instrumentace HPLC .....	14
3.3.	Základní chromatografické pojmy .....	21
3.3.1.	Distribuční konstanta.....	21
3.3.2.	Retenční charakteristiky.....	21
3.3.3.	Selektivita.....	22
3.3.4.	Rozlišení.....	22
3.3.5.	Účinnost chromatografické kolony .....	23
3.3.6.	Separační módy .....	23
3.4.	Analýza chirálních léčiv.....	24
3.4.1.	Chirální separace s využitím HPLC .....	25
3.4.2.	Chirální stacionární fáze v HPLC .....	26
3.5.	Hodnocení HPLC chromatogramu.....	31
3.5.1.	Kvalitativní analýza.....	31
3.5.2.	Kvantitativní analýza.....	32
3.6.	Validace analytické metody .....	35
3.6.1.	Přesnost .....	35
3.6.2.	Správnost.....	35
3.6.3.	Linearita .....	36
3.6.4.	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	36
3.6.5.	Test způsobilosti chromatografického systému .....	37
3.7.	Úprava biologických vzorků .....	37
3.7.1.	Deproteinace.....	37
3.7.2.	LLE.....	38
3.7.3.	SPE .....	38
3.7.4.	SPME .....	39

3.8.	Kyselina tiaprofenová .....	40
3.8.1.	Studie zabývající se HPLC analýzou kyseliny tiaprofenové ....	42
4.	Experimentální část.....	47
4.1.	Přístroje, materiál a chemikálie.....	47
4.1.1.	Přístroje .....	47
4.1.2.	Chemikálie .....	47
4.1.3.	Standardy.....	48
4.1.4.	Chromatografické kolony.....	48
4.1.5.	Pomůcky.....	49
4.1.6.	Biologický materiál .....	49
4.2.	Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu kyseliny tiaprofenové .....	50
4.2.1.	Výběr stacionární a mobilní fáze .....	50
4.2.2.	Výběr vnitřního standardu.....	51
4.2.3.	Ověření linearity.....	52
4.2.4.	Vypracování podmínek pro separaci enantiomerů.....	52
4.2.5.	Analýza v biologickém materiálu .....	54
4.3.	Výsledky a diskuze .....	57
4.3.1.	Výběr chromatografických podmínek pro HPLC analýzu kyseliny tiaprofenové .....	57
4.3.2.	Vypracování podmínek pro separaci enantiomerů kyseliny tiaprofenové pomocí HPLC .....	63
4.3.3.	Analýza v biologickém materiálu .....	65
5.	Závěr .....	71
6.	Seznam použité literatury .....	72

## 1. Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je široce využívaná analytická metoda, jejíž vývoj začal v sedmdesátých letech minulého století. Slouží k separaci směsí látek od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny a umožňuje jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu. Je zároveň rychlá, účinná a selektivní, proto se stala součástí všech moderních lékopisů a nachází uplatnění v mnoha oborech farmacie. Ve farmaceutickém odvětví se využívá zejména pro kontrolně-analytické hodnocení léčiv, tedy pro jejich identifikaci, stanovení obsahu a kontrolu čistoty. Má význam také v analýze složených lékových přípravků nebo při monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Mimo to se uplatňuje též ve stabilitních studiích, kde podává informaci o průběhu rozkladného procesu a nachází také využití při analýze látek z rostlinného materiálu.

Kyselina tiaprofenová je chirální sloučenina patřící do skupiny nesteroidních protizánětlivých a protirevmatických léčiv. Chemicky se řadí do široké skupiny derivátů kyseliny 2-arylpropionové. Má silné protizánětlivé a analgetické účinky a dobře proniká do synoviální tekutiny, je proto široce využívána zejména při léčbě revmatoidní artritidy a osteoartrózy.



## **2. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce bylo nalézt vhodné chromatografické podmínky pro stanovení kyseliny tiaprofenové pomocí HPLC. To spočívalo v optimalizaci složení mobilní fáze, výběru vyhovujícího vnitřního standardu a sestavení kalibrační křivky pro kvantitativní hodnocení. Dalším úkolem bylo nalézt podmínky pro chirální separaci jednotlivých enantiomerů kyseliny tiaprofenové, což zahrnovalo zejména výběr vhodné chromatografické kolony a složení mobilní fáze. Nakonec bylo třeba provést extrakci kyseliny tiaprofenové z lidské plasmy a využít zjištěné poznatky k jejímu stanovení.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné a v analýze léčiv široce využívané. Slouží k separaci analytů ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.<sup>1,2</sup>

Základním principem chromatografie je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi nepohyblivou, stacionární fází a pohyblivou, mobilní fází. Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná a má schopnost různou měrou zadržovat složky analyzované směsi. Mobilní fáze bývá kapalná nebo plynná a je hybnou silou chromatografického děje. Podstatou separace je nestejná afinita analytů k oběma těmito fázím, kdy se ustanovuje dynamická rovnováha mezi opakovanou sorpcí látek do stacionární fáze a desorpcí do mobilní fáze. To se navenek projevuje jako různá rychlost postupu chromatografickým systémem – analyty jsou unášeny ve směru toku různou rychlostí, takže dochází k jejich dělení.<sup>1,3</sup>

#### 3.1.1. Rozdělení chromatografických metod

V současnosti se využívá mnoho druhů chromatografických metod, které můžeme dělit podle různých hledisek:

##### 3.1.1.1. Podle pracovní techniky

###### **Frontální metoda**

Vzorek je rozpuštěn v mobilní fází a do kolony je přiváděn kontinuálně. První z kolony vychází nejméně sorbovaná látka a postupně se k ní přidávají další, až po nejvíce sorbovanou. Touto metodou lze získat v čistém stavu pouze první, nejméně sorbovanou složku. Využívá se spíše pro výzkum sorpčních procesů.<sup>4,5</sup>

###### **Vytěšňovací metoda**

Vzorek se dávkuje jednorázově do proudu mobilní fáze. Ta obsahuje vytěšňující činidlo, které má schopnost sorbovat se na stacionární fází silněji než

složky vzorku. Dochází tedy k vytěšňování složek vzorku ze stacionární fáze a jejich vyplavování z kolony.<sup>4,5</sup>

### **Eluční metoda**

Eluční metoda je zdaleka nejběžnější a má nejširší uplatnění. Vzorek je dávkován jednorázově a jeho složky jsou na koloně zachycovány silněji než mobilní fáze. Analyty nakonec vycházejí z kolony v pořadí od nejméně po nejvíce sorbované a jsou odděleny mobilní fází.<sup>4,5</sup>

Eluci rozdělujeme na izokratickou a gradientovou. Při izokratické eluci se kolona promývá mobilní fází o konstantním složení, a tedy o stejné eluční síle. Je vhodná u látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a tím pádem s podobnými hodnotami distribuční konstanty  $K_D$ . Při gradientové eluci se naopak eluční síla v průběhu analýzy zvyšuje tím, že se k jedné mobilní fázi přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Je vhodná v případech, kdy se složky směsi výrazně liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a izokratická eluce by tak byla velmi časově náročná.<sup>1,5,6</sup>

### **3.1.1.2. Podle podstaty separačního děje**

#### **Adsorpční chromatografie**

Při adsorpční chromatografii nastává rozdělení látek díky různému zadržení (adsorpci) složek směsi na povrchu adsorbentu. Tím bývají nejčastěji částice silikagelu nebo oxid hlinitý. V kapalinové chromatografii mohou mobilní fázi tvořit rozpouštědla nebo jejich směsi, pak se jedná o separaci pevná fáze – kapalina. V plynové chromatografii dochází k separaci pevná fáze – plyn.<sup>1,2</sup>

#### **Rozdělovací chromatografie**

Podstatou je dělení analytů mezi dvě nemísitelné fáze na základě různých rozdělovacích koeficientů těchto látek. V kapalinové rozdělovací chromatografii je stacionární fází kapalina ukotvená na inertním nosiči a mobilní fází tvoří se stacionární fází nemísitelné rozpouštědlo. Složky směsi se poté dělí na základě různých rozpustností v těchto dvou kapalinách. V plynové rozdělovací

chromatografii, kde mobilní fázi tvoří plyn, je separace dána nestejnou rozpustností látek pouze v kapalně stacionární fázi.<sup>1,2</sup>

### **Iontově výměnná chromatografie**

V iontově výměnné chromatografii tvoří stacionární fázi iontoměniče – anexy a katexy. Slouží k dělení elektrolytů v iontové formě na základě jejich různé afinity k iontovým skupinám nepohyblivé fáze. Tento princip lze použít pouze u kapalinové chromatografie.<sup>2</sup>

### **Gelová chromatografie**

U této metody dochází k dělení složek podle velikosti jejich molekul. Stacionární fáze se skládá z nabobtnalého pórovitého gelu ve tvaru zrněk. Molekuly unášené mobilní fází vnikají do pórů, přičemž menší molekuly pronikají do pórů všech velikostí a jsou tedy zadržovány více než molekuly velké.<sup>2,3</sup>

### **Afinní chromatografie**

Umožňuje dělit biologicky aktivní látky na základě jejich schopnosti vázat se specificky a reverzibilně na biospecifický sorbent (afinant). Poté, co ostatní látky projdou kolonou bez zadržení, je analyt eluován pomocí afinantu rozpuštěného v mobilní fázi nebo změnou složení mobilní fáze.<sup>3,6</sup>

#### **3.1.1.3. Podle charakteru mobilní fáze**

### **Plynová chromatografie**

Pomocí plynové chromatografie (Gas chromatography, GC) můžeme zpravidla dělit, identifikovat a stanovovat pouze látky v plynném stavu o relativní molekulové hmotnosti do 400. Je možné analyzovat také látky pevné a kapalně, které lze převést do plynného skupenství bez rozkladu. Pro látky málo těkavé je častým postupem chemická úprava na deriváty s vhodnějšími vlastnostmi.<sup>1,4</sup>

V plynové chromatografii je vzorek dávkován pomocí nástřikové hlavy (dávkovače), která je vyhřívána na zvolenou teplotu. Kapalně vzorky nebo roztoky pevných vzorků jsou zde velmi rychle odpařeny a dávkovány do proudu mobilní fáze, kterou tvoří nosný plyn. Tím bývá například dusík, helium, argon nebo vodík. Mobilní fáze unáší vzorek chromatografickou kolonou umístěnou v termostatu.

V koloně se analyty mnohonásobně sorbují na stacionární fázi a desorbují nosným plynem, přičemž dochází k jejich dělení. Složky opouštějící kolonu jsou indikovány v detektoru a signál je následně pomocí vyhodnocovacího zařízení převeden na chromatografický záznam.<sup>1,2,4</sup>

Plynová chromatografie umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení a má podobné výhody jako HPLC, tedy vysokou citlivost, vysokou separační účinnost a jednoduchost. Její využití je však oproti HPLC daleko menší, vzhledem k tomu, že se GC nedá použít pro analýzu netěkavých nebo tepelně nestálých látek, které tvoří asi 90 % léčiv. Přesto je součástí všech moderních lékopisů a uplatňuje se při identifikaci, kontrole čistoty i stanovení obsahu léčiv a jejich metabolitů.<sup>1,2</sup>

### **Kapalinová chromatografie**

V kapalinové chromatografii tvoří mobilní fázi kapalina. Ta se na rozdíl od plynové chromatografie výrazně podílí na separačním procesu prostřednictvím interakcí s analyzovanou směsí. Kapalinová chromatografie je také oproti plynové vhodná pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, protože není nutné převádět vzorek na plyn.<sup>4</sup>

#### **3.1.1.4. Podle uspořádání stacionární fáze**

##### **Plošné techniky (PC, TLC)**

Při těchto metodách je stacionární fáze umístěna v ploše. U papírové chromatografie (Paper chromatography, PC) je stacionární fázi voda, která je jako přirozená vlhkost součástí chromatografického papíru z celulózy.

Druhou technikou je tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography, TLC), kdy je stacionární fáze na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého nanášena v tenké vrstvě na podložku ze skla, hliníku nebo polyesteru. Obě metody jsou jednoduché a nenáročné na laboratorní vybavení.<sup>1,4</sup>

##### **Kolonová chromatografie**

Nejstarším typem je klasické sloupcové provedení kapalinové chromatografie, kdy se používá skleněná trubice o délce asi 50 cm a průměru cca

2 cm naplněná zrnitým sorbentem s hrubými částicemi. Mobilní fáze je přiváděna shora a kolonou postupuje působením gravitační síly. Eluát je poté odebrán po frakcích.<sup>4,5</sup>

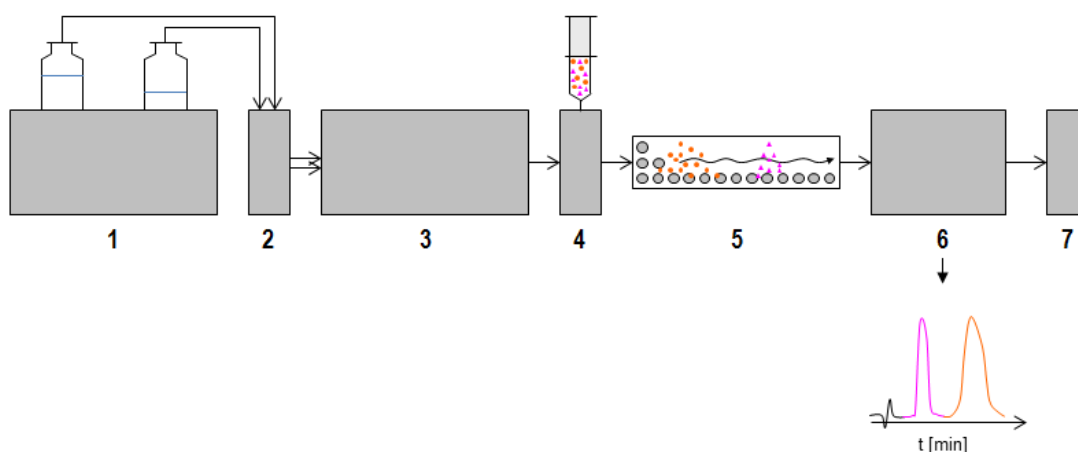
Sloupcová chromatografie se dnes už příliš často nepoužívá, díky rozvoji laboratorní techniky se však stala základem pro hojně využívanou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii používající automatické dávkovací systémy, vysokotlaká čerpadla, široké spektrum sorbentů a vysoce citlivé detektory.<sup>4,5</sup>

### 3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography, HPLC) je dnes jedna z velmi progresivních analytických metod. Jedná se o kolonovou separační metodu, která umožňuje současně kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek směsi, přičemž pro analýzu stačí pouze malé množství vzorku. Jejimi přednostmi jsou také vysoká selektivita a citlivost, relativně krátký čas analýzy a možnost automatizace.<sup>2</sup>

#### 3.2.1. Instrumentace HPLC

Uspořádání kapalinového chromatografu je znázorněno na následujícím schématu:



Obrázek 1: Schematické znázornění HPLC systému: zásobníky mobilní fáze (1), odplyňovač (2), vysokotlaké čerpadlo (3), dávkovač vzorků (4), kolona (5), detektor (6), odpad (7).<sup>7</sup>

Mobilní fáze je uchovávána v zásobnících. Ty musí být chemicky odolné, dobře uzavřené a většinou obsahují speciální filtry bránící vniknutí pevných částic do systému. Mobilní fáze nejprve prochází odplyňovačem, který odstraňuje nežádoucí bubliny vzduchu. Následuje čerpací systém, dávkovač vzorků, chromatografická kolona a detektor, který poskytuje data pro vyhodnocovací zařízení (počítač). Jednotlivé části chromatografu jsou vzájemně spojeny dobře těsnícími kapilárami, které bývají vyrobeny z nerezové oceli, PEEK (polyetheretherketonu) nebo PTFE (polytetrafluorethylenu).<sup>6,8</sup>

### **3.2.1.1. Vysokotlaká čerpadla**

Mobilní fáze je v systému poháněna vysokotlakými čerpadly. Ta musí zajišťovat stabilní, bezpulzní průtok a musí být schopna dosáhnout širokého rozmezí tlaků (asi 1-60 MPa, při ultra-HPLC i více) a průtoků (0,1-10 mililitrů za minutu). Čerpadla mohou být navíc doplněna zařízením na tlumení pulzů.<sup>5,6</sup>

Moderní čerpadla umožňují jak izokratickou eluci, kdy je přiváděna mobilní fáze s konstantním složením, tak i gradientovou eluci, protože jsou schopny dodávat rozpouštědla z více zásobníků a měnit tak složení mobilní fáze podle předem stanoveného programu.<sup>9</sup>

### **3.2.1.2. Dávkovací zařízení**

Jako dávkovače se dnes téměř výhradně používají vysokotlaké dávkovací ventily se smyčkou, a to buď manuální, nebo mnohem častěji automatizované - tzv. autosamplery. Autosampler je spojen se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) s roztokem vzorku. Ten je pomocí jehly dávkován do proudu mobilní fáze. Objem dávkovací smyčky může být od desítek nanolitřů po mililitry. Dávkování musí být reprodukovatelné a přesné, aby bylo eliminováno rozmývání píků.<sup>6,10</sup>

### 3.2.1.3. Chromatografická kolona

Kolona je základem celého chromatografického systému. Skládá se z vlastního těla a koncovek. Plášť kolony je vyroben nejčastěji z nerezové oceli, ale existují také kolony z tvrzeného skla (vhodné však pouze pro tlaky do 20 MPa) nebo z polymerních materiálů. Kolona je zakončena porézními kovovými fritami, které umožňují plynulý tok mobilní fáze a zadržují náplň kolony. Na obou stranách je pak opatřena koncovkou, která se skládá z ochranného kroužku a koncové hlavice, která má otvor na šroub přivádějící kapiláru. Celý systém musí být dostatečně utěsněn a odolávat vysokým tlakům.<sup>6</sup>

Chromatografická kolona je umístěna v termostatu. Ten by měl zajistit konstantní teplotu v celém prostoru a omezit lokální teplotní výkyvy. Většina separací se provádí při teplotě místnosti, ale pro dosažení lepší účinnosti je někdy vhodné pracovat při vyšších teplotách.<sup>6</sup>

Náplň kolony je tvořena nosičem, na který je navázána stacionární fáze. Někdy může stacionární fázi tvořit samotný nosič, jako je tomu v případě nemodifikovaného silikagelu.<sup>11</sup>

Kolony se podle charakteru náplně dělí na monolitické a náplňové:

#### **Monolitické kolony**

U těchto kolon představuje stacionární fázi jediný kus pórovitého materiálu, který vyplňuje celý prostor kolony. Nejčastěji je tvořen polymerem nebo silikagelem. Monolit zpravidla obsahuje póry dvou velikostí: makropóry o velikosti kolem 1-2  $\mu\text{m}$ , kterými protéká mobilní fáze, a menší póry (mesopóry a mikropóry) o velikosti do 50 nm, které interagují s analyty a umožňují jejich dělení. Výhodou monolitických kolon je zejména možnost aplikovat vysoký průtok mobilní fáze (až 10 ml/min). Tím je možno zkrátit čas analýzy bez překročení tlakových limitů systému a bez snížení separační účinnosti.<sup>12,13</sup>



## Náplňové kolony

Sorbent těchto kolon je tvořen kulovitými částicemi, které vyplňují celý objem pláště. Pro HPLC se dnes používají výhradně komerčně vyráběné náplňové kolony, které se vzájemně liší svými rozměry, konstrukcí, druhem sorbentu i jeho zrněním. Analytické kolony mívají nejčastěji délku od 10 do 300 mm a vnitřní průměr 2,1 až 5 mm. Mezi základní technické požadavky patří odolnost vůči vysokým tlakům, chemická odolnost a pokud možno dokonale hladký vnitřní povrch.<sup>4,6</sup> Částice sorbentu mohou mít různý průměr, charakter a také rozdílnou velikost pórů. Na velikosti částic a jejich pórů totiž závisí celkový povrch sorbentu, který významně ovlivňuje účinnost chromatografické kolony. Většinou mívají částice rozměr mezi 2 a 10  $\mu\text{m}$ , mohou však být i menší. Ideálně by měly mít pravidelný kulovitý tvar, jednotnou velikost a homogenně vyplňovat kolonu.<sup>10,11</sup>

Nejvíce využívaným materiálem pro výrobu sorbentu je silikagel. Je použitelný jak pro náplňové, tak pro monolitické kolony a vyniká dobrou mechanickou odolností. Jeho nevýhodou je nestabilita při pH větším než 8, výhodou je naopak možnost syntetizovat částice silikagelu s definovanou velikostí pórů a definovaným průměrem. Jeho povrch lze také dále chemicky modifikovat vazbou různých ligandů. Dalším materiálem, který může tvořit náplň kolon, jsou porézní polymery – nejčastěji je to zesíťovaný polystyren, méně často pak substituované methakryláty a polyvinylalkoholy. Jejich hlavní výhodou oproti silikagelu je stabilita v širokém rozmezí hodnot pH. Mimo to se můžeme setkat i s anorganickými nosiči vyrobenými z oxidu zirkoničitého, hlinitého, titaničitého nebo z grafitu.<sup>11</sup>

## Chemicky vázané stacionární fáze

Jako náplň chromatografických kolon se často používají chemicky vázané stacionární fáze. Nejčastěji bývají ukotveny na silikagelový nosič, který na svém povrchu obsahuje volné silanolové skupiny Si–OH. Tyto hydroxylové skupiny se pro vazbu využívají tím, že se nechají zreagovat s mono-, di-, nebo trichlororganosilany za vzniku siloxanové vazby Si–O–Si–R. Obměnou alkylového zbytku R lze poté připravit rozmanité spektrum stacionárních fází lišících se fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Z alkylových ligandů je nejběžnější oktadecylsiloxanová (ODS) fáze

obsahující alkylový řetězec C<sub>18</sub>. Používají se však i uhlovodíkové řetězce o délce dvou až třiceti uhlíků, fenyly, difenyly a alkylfenyly. Z polárních stacionárních fází lze zmínit například nitrily, aminy nebo dioly, které jsou na silikagel zpravidla vázané přes propylový řetězec kvůli lepší sterické dostupnosti pro analyt.<sup>6,10,14</sup>

Na povrchu chemicky vázaných stacionárních fází se však obvykle kromě funkčních skupin nachází také určité množství nezreagovaných silanolových a siloxanových skupin. Ty mohou způsobovat nežádoucí jevy, jako je chvostování píků, zejména při analýze bazických látek, kdy je potřeba pracovat při vyšších hodnotách pH (tj. 6–8). Řešením tohoto problému může být přidavek organických aminů (např. triethylaminu) do mobilní fáze, které na volných silanolových skupinách kompetují s analytem. Další možností je tzv. endcapping, zaslepení pomocí reakce s trimethylchlorsilanem, nebo double endcapping, kdy jsou sousední alkylsilanové řetězce propojeny propylenovým můstkem, který stericky brání přístup k volným silanolům.<sup>6,10,14</sup>

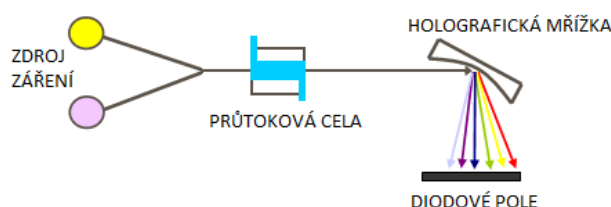
#### **3.2.1.4. Detektor**

Eluát vycházející z kolony je zpracováván v detektoru. Ideální detektor by měl být vysoce citlivý a univerzální, tedy schopný detekovat všechny oddělené složky vzorku. Měl by také mít malý vnitřní objem, aby byl jeho mimokolonový příspěvek minimální. Signál detektoru má být stabilní, reprodukovatelný a neměl by být ovlivněn změnami složení mobilní fáze ani změnami teploty a průtoku. Měl by také poskytovat lineární odezvu v co nejširším rozsahu koncentrací, mít co nejmenší šum a neobsahovat drift.<sup>6,10,14</sup>

Existuje mnoho druhů detektorů, v praxi se však dnes nejvíce využívá ultrafialovo-viditelná spektroskopie (UV-VIS) nebo spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Menší využití poté nachází fluorescenční, elektrochemická nebo refraktometrická detekce.<sup>6</sup>

## Spektrofotometrické (UV-VIS) detektory

UV-VIS spektroskopy patří k nejběžnějším detektorům, jsou poměrně jednoduché, spolehlivé a lze jimi detekovat mnoho látek. Jsou založeny na měření absorpance roztoku, který prochází průtokovou celou. Cella musí poskytovat dostatečně dlouhou absorpční dráhu pro světelný paprsek, ale přitom mít co nejmenší mimokolonový příspěvek objemu. Podle konstrukčního řešení rozlišujeme několik typů UV-VIS detektorů: jednodušší detektory s fixní vlnovou délkou, detektory s měnitelnou nebo programovatelnou vlnovou délkou a nejdokonalejší detektory s diodovým polem.<sup>4,6,10</sup>



Obrázek 2: Schematické znázornění detektoru s diodovým polem<sup>15</sup>

U detektoru s diodovým polem (PDA, photodiode-array nebo DAD, diode array detector) je zdrojem záření deuteriová výbojka. Z ní skrz štěrbinu vychází paprsek, který je přes čočku a clonu nasměrován do průtokové cely ve tvaru Z. Za průtokovou celou prochází paprsek skrz holografickou mřížku na diodové pole, přičemž na každou z fotodiod dopadá záření o určité vlnové délce. PDA detektor tedy na rozdíl od ostatních spektrofotometrických detektorů může snímat celé UV-VIS spektrum v reálném čase. V důsledku je tedy možné sledovat závislost absorpance na čase a zároveň i na vlnové délce. Výstupem těchto měření jsou trojrozměrné chromatogramy, díky kterým lze sledovat například čistotu píků.<sup>1,6</sup>

## Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou vysoce selektivní a o mnoho citlivější než UV detektory, nejsou však natolik univerzální. Lze je použít k detekci látek vykazujících fluorescenci, nebo látek, které lze převést na fluoreskující deriváty. Detekce je založena na schopnosti analytů absorbovat primární elektromagnetické záření a následně emitovat sekundární záření o vyšší vlnové délce, které je zachyceno fotonásobičem.<sup>2,4</sup>

### **Elektrochemické detektory**

Patří sem detektory voltametrické, amperometrické a polarografické, sledující závislost elektrické veličiny na koncentraci měřené látky. Využívají schopnost látek elektrochemicky reagovat na rozhraní elektrody a mobilní fáze, přičemž nejčastěji jsou využívány redoxní reakce. Tyto detektory jsou značně citlivé, nelze je ale použít u gradientové eluce a nemají příliš širokou aplikovatelnost.<sup>2,4,6</sup>

### **Refraktometrické detektory**

Jsou velmi univerzální, ale nemají příliš velkou citlivost. Měří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze, přičemž čím větší je tento rozdíl, tím je detekce citlivější. Protože odezva závisí na teplotě, je potřeba v průběhu analýzy udržovat přesnou a konstantní teplotu.<sup>2,4,6</sup>

### **Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) je vysoce specifická metoda, která funguje na principu separace nabitých částic podle poměru jejich hmotnosti ( $m$ ) a náboje ( $z$ ). Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum – četnost jednotlivých iontů v závislosti na hodnotě  $m/z$ .

Na začátku analýzy musí být molekuly analytu nejprve ionizovány. Existuje velké množství ionizačních technik, ve spojení s HPLC se však nejčastěji používá ionizace za atmosférického tlaku. Ta patří mezi měkké ionizační techniky a zahrnuje ionizaci elektrosprejem (ESI, electrospray ionization), chemickou ionizaci (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) a fotoionizaci (APPI, atmospheric pressure photoionization). Za iontovým zdrojem je umístěn hmotnostní analyzátor, ve kterém jsou nabitě částice rozděleny podle poměru  $m/z$  a následně urychleny. Nakonec jsou ionty zachyceny v detektoru, který poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů.<sup>6</sup>

Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií je vysoce selektivní, vysoce citlivé a užitečné především pro analýzu komplexních vzorků, jako jsou biologické tkáně a tekutiny. Poskytuje větší jistotu při identifikaci vzorku díky tomu, že spolu s retenčním časem poskytuje informace o molekulové hmotnosti látek a o jejich strukturně specifických fragmentech.<sup>2,6</sup>

### 3.3. Základní chromatografické pojmy

V následujícím textu budou uvedeny některé základní pojmy a charakteristiky kapalinové chromatografie vztahující se především k izokratické eluci.

#### 3.3.1. Distribuční konstanta

Jak je známo, při chromatografickém ději probíhá rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze. Na fázovém rozhraní při tom dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi koncentrací látky ve stacionární fázi  $c_s$  a koncentrací látky v mobilní fázi  $c_m$ . Poměr těchto koncentrací se nazývá distribuční (rozdělovací) konstanta  $K_D$ . Čím více je složka vázána ve stacionární fázi, a tedy déle zadržována na koloně, tím je její distribuční konstanta vyšší.<sup>4,6</sup>

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

#### 3.3.2. Retenční charakteristiky

Zadržení složek směsi na stacionární fázi popisují retenční charakteristiky. Základní veličinou je **retenční čas**  $t_R$ , což je doba od nástřiku vzorku do maxima eluce, které se zobrazí jako vrchol píku. **Retenční objem**  $V_R$  je pak objem mobilní fáze, který proteče kolonou za tuto dobu. Retenční objem lze vypočítat na základě znalosti objemového průtoku kolonou  $F_m$ .<sup>6</sup>

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

Retenční čas nebo retenční objem inertní látky, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, je označován jako **mrtvý retenční čas**  $t_0$ , respektive **mrtvý retenční objem**  $V_0$ .<sup>6</sup>

Další z veličin je takzvaný **redukovaný retenční čas**  $t'_R$ , který je dán rozdílem retenčního času dané látky a mrtvého retenčního času.<sup>6</sup>

Obecným vyjádřením retence látky je **retenční faktor  $k$** . Vystihuje relativní zadržení složky na koloně a lze ho vyjádřit následujícími způsoby:<sup>6</sup>

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

### 3.3.3. Selektivita

Selektivita (také označovaná jako relativní retence nebo retenční poměr) se značí symbolem  $\alpha_{1,2}$  nebo  $r_{1,2}$  a vyjadřuje, nakolik jsou od sebe vzdálena těžiště píků dvou látek. Čím je tato hodnota vyšší, tím je systém selektivnější. Je dána vztahem:

$$\alpha_{1,2} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde  $k_1$  a  $k_2$  jsou retenční faktory látek 1 a 2.<sup>10</sup>

### 3.3.4. Rozlišení

Rozlišení značí míru kvality separace dvou sousedních píků na chromatogramu. Je to bezrozměrná veličina a pro dostatečnou separaci látek by měla mít hodnotu  $R_{1,2} > 1,5$ , při níž dochází pouze k 0,1% překrytu píků u jejich základny. Vyjadřuje se jako rozdíl retenčních časů  $t_{R2}$ ,  $t_{R1}$  dělený průměrnou hodnotou šířky píků, kde  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky píků na úrovni základní linie:<sup>6</sup>

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)/2}$$

Rozlišení můžeme také vyjádřit za použití šířek píků v polovině jejich výšky  $w_{h1}$  a  $w_{h2}$ :<sup>6</sup>

$$R_{1,2} = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

### 3.3.5. Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony charakterizuje schopnost dělit složky směsi a dá se hodnotit podle **počtu teoretických pater**  $N$ . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Počet teoretických pater je bezrozměrná veličina a závisí na mnoha faktorech, jako jsou délka kolony, velikost částic náplně, teplota, retenční faktor dané látky, rychlost průtoku mobilní fáze nebo její viskozita.

Pro porovnání účinnosti kolon o různé délce je používán **výškový ekvivalent teoretického patra**  $H$ , který lze definovat jako délku kolony připadající na jedno teoretické patro.<sup>4,6</sup> Pro kolonu o délce  $L$  lze vypočítat jako  $H = \frac{L}{N}$

### 3.3.6. Separační módy

**Chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC, normal-phase HPLC)** je tradiční uspořádání, které využívá polární stacionární fázi a méně polární mobilní fázi. Stacionární fázi tvoří silikagel nebo chemicky vázané polární fáze, mobilní směs je zpravidla směs dvou organických rozpouštědel. Používá se například hexan, isooktan, toluen, dichlormethan a další. Podle polaritoy jsou rozpouštědla seřazena do tzv. eluotropické řady, kde nejnižší eluční sílu  $\epsilon_p^0 = 0$  má pentan. Se zvyšující se polaritou rozpouštědel roste jejich eluční síla, což se projeví jako zkrácení retenčních časů při analýze. Dnes je chromatografie na normálních fázích oproti minulosti spíše na ústupu a využití nalézá v případech, kdy není možné použít jinou metodu. To se může stát například, pokud je analyt příliš lipofilní, a tudíž nerozpustný v polárnějších fázích, nebo pokud se v roztoku s obsahem vody rozkládá.<sup>6</sup>

**Chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC, reversed-phase HPLC)** je opačné uspořádání, kdy analýza probíhá na nepolární stacionární fázi a mobilní fáze je polární. Mobilní fázi je ve většině případů směs vody nebo vodného pufru s přísávkem mísitelného organického rozpouštědla, kterým bývá acetonitril, methanol, ethanol, aceton nebo tetrahydrofuran. Platí zde opačný vztah mezi polaritou rozpouštědla a jeho eluční silou než v normálním módu, tedy čím je roztok polárnější, tím je jeho eluční síla nižší. Stacionární fázi tvoří nejčastěji chemicky

vázané nepolární fáze, z nichž nejpoužívanější je oktadecylsilylovaný (C<sub>18</sub>) silikagel. Využití reverzního módu je poměrně široké; je vhodný jak pro separace neutrálních látek, tak pro látky polární a iontové, u nich však dochází k velmi slabému zadržování na koloně, proto se často musí retence ovlivnit zvýšením iontové síly mobilní fáze nebo úpravou pH, která u slabých kyselin a zásad potlačí disociaci.<sup>6,11</sup>

### **3.4. Analýza chirálních léčiv**

Lidský organismus je enantiospecifické prostředí tvořené biomolekulami, jako jsou receptory a enzymy, proteinové transportéry, iontové kanály a proteiny krevní plasmy. To je důvod, proč se v případě chirálních léčiv může zásadně lišit biologická aktivita jejich enantiomerů a mohou tak vznikat kvantitativní i kvalitativní rozdíly v jejich účinku na lidský organismus.<sup>16,17</sup>

Odlišnosti se mohou projevit například ve farmakodynamice léčiva, kdy jeden z enantiomerů může vykazovat vyšší aktivitu, může působit rozdílně, nebo dokonce opačně. Jednotlivé stereoizomery se ale také mohou chovat různě z hlediska farmakokinetiky, tedy při absorpci, tkáňové distribuci, metabolismu a exkreci. Výsledkem mohou být nestejně lékové interakce, toxicita a nežádoucí účinky jednotlivých enantiomerů. Proto se dnes jako léčiva stále častěji využívá pouze samotného eutomeru, tedy izomeru, který má vyšší požadovanou aktivitu. Druhá složka, která má nižší aktivitu nebo nevýhodné vlastnosti, se nazývá distomer.<sup>16,17</sup>

Dnes se většina používaných chirálních léčiv nachází ve formě racemátu, tedy jako směs dvou enantiomerů ve stejném poměru. Separovat enantiomery za běžných chromatografických podmínek není možné, protože v achirálním prostředí mají stejné fyzikální a chemické vlastnosti. Pro jejich dělení se tedy využívá interakce s tzv. chirálním selektorem. Principem je zpravidla vznik dvou trvalých nebo dočasných diastereoizomerů – kvalitativně odlišných sloučenin se vzájemně rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.<sup>17</sup>



### 3.4.1. Chirální separace s využitím HPLC

#### 3.4.1.1. Nepřímé dělení enantiomerů

Prvním ze způsobů, jak enantiomery separovat, je nepřímé dělení, jehož principem je derivatizace látky chirálním selektorem. Výsledkem reakce je směs dvou diastereoizomerů, které lze poměrně snadno dělit i v achirálním prostředí, protože mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Nejčastěji je pro derivatizaci molekuly využívána karboxylová, hydroxylová nebo aminová skupina. Nevýhodou této metody je nutnost použití derivatizačního činidla o vysoké enantiomerní čistotě a experimentální náročnost při přípravě derivátů. Reakce musí navíc probíhat kvantitativně a nesmí nastávat racemizace nebo epimerace produktu.<sup>6,17</sup>

#### 3.4.1.2. Přímé dělení enantiomerů

Enantiomery lze dělit pomocí chromatografických metod také přímo, bez předchozí derivatizace, a to na principu tvorby přechodných diastereoizomerních komplexů s chirálním selektorem. Chirální selektor (CS) může být přidán do mobilní fáze nebo navázán na fázi stacionární, přičemž upřednostňován bývá druhý způsob.<sup>17</sup>

Výhodou chirálních selektorů v mobilní fázi je práce s levnější, nechirální kolonou a možnost vyzkoušet v rychlém sledu různé druhy a koncentrace chirálních aditiv. Proto je tato metoda používána při dělení větších sérií látek. Chirální selektor v mobilní fázi však zvyšuje absorbanci, může mít omezenou stabilitu a je nutné ho přidávat do mobilní fáze kontinuálně. V případě preparativní chromatografie také může být nevýhodou nutnost rozdělit na konci analýzy komplex analytu a chirálního selektoru.<sup>17</sup>

Mnohem častěji bývá používána nechirální mobilní fáze a chirální stacionární fáze (CSP, chiral stationary phase), kdy je chirální selektor navázán na inertním nosiči, nejčastěji silikagelu. Výhodou je permanentní přítomnost chirálního selektoru v separačním systému, jeho dobrá stabilita a možnost jímat čisté enantiomery. Tato metoda je také snadnější a rychlejší, nevýhodou však může být vyšší cena chirálních kolon.<sup>6,10</sup>

### 3.4.1.1. Chirální rozpoznávání

Princip enantiospecifického rozpoznávání se snaží vysvětlit a popsat takzvaný model tříbodové interakce. Podle něj je pro chirální rozpoznávání třeba, aby mezi analytem a chirálním selektorem došlo ke kontaktu pomocí minimálně tří různých vazeb, přičemž alespoň jedna z nich je stereoselektivní. Mezi hlavní typy vazeb podílející se na chirálním rozpoznávání řadíme například vodíkové můstky, elektrostatické a  $\pi$ - $\pi$  interakce, případně hydrofobní interakce.<sup>6,17</sup>

Bylo zjištěno, že všechny tři vazby nemusí být přitažlivé, protože důležitou roli hrají i repulsní interakce. Pro vlastní separaci totiž není tak důležitá celková síla interakce analytu a chirálního selektoru, jako spíše rozdíl v interakčních energiích jednotlivých enantiomerů s chirálním selektorem. Vznikající krátkodobé diastereoizomerní komplexy pak postupují chromatografickým systémem různou rychlostí a dochází k jejich separaci.<sup>6,17</sup>

### 3.4.2. Chirální stacionární fáze v HPLC

Jako chirální selektory vázané na stacionární fázi se používají některé látky přírodního původu, ale především látky syntetické a polosyntetické, které mají vyšší selektivitu. Nejčastěji se chirální stacionární fáze dělí podle molekulární struktury na polysacharidy, cykloextriny, glykopeptidy, deriváty chininu a různé syntetické látky, například crown-ethery aj.<sup>6,17</sup>

#### 3.4.2.1. Polysacharidy a jejich deriváty

Z přírodních polysacharidů jde především o celulózu, amylozu a škrob. Celulóza je lineární polymer tvořený jednotkami  $\beta$ -1,4-D-glukopyranózy, kdy každá jednotka obsahuje tři hydroxylové skupiny a pět center chiralit. Hydroxylové skupiny jsou příčinou četných vodíkových vazeb mezi jednotlivými řetězci polymeru a jsou také vhodným místem pro tvorbu polosyntetických derivátů.<sup>6,17</sup>

Dalším přírodním polysacharidem je škrob, který je tvořen z 80 % amylopektinem a z 20 % amylozou. Používá se však spíše samotná amyloza, která se skládá z  $\alpha$ -1,4-D-glukopyranózových jednotek spojených v lineární řetězec. Přírodní

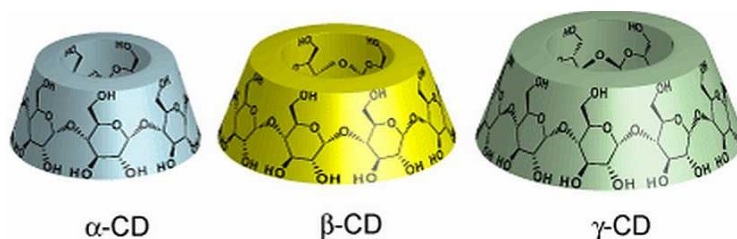
polysacharidy jako celulóza nebo amyulóza se však příliš neosvědčily a v praxi se používají pouze jejich deriváty.<sup>6,17</sup>

Tyto chemické deriváty polysacharidů jsou dnes jedny z nepoužívanějších chirálních stacionární fází. Na trhu je nalezneme například pod komerčními názvy Chiralpak® (deriváty amyulózy) nebo Chiracel® (deriváty celulózy). Derivatizace probíhá na volných hydroxylových skupinách pomocí různých chirálních selektorů, kterými jsou například fenyلكarbamáty (4-chlorofenyلكarbamát, 4-methylfenyلكarbamát, 1-fenylethylkarbamát, 3,5-dimethylfenyلكarbamát a různé chloromethylfenyلكarbamáty), dále pak organické estery (cinnamát, benzoát), nitráty a ethery. Kromě chirálního selektoru je podstatná také volba polysacharidu, kdy celulóza se svým šroubovitým uspořádáním má odlišnou separační schopnost než lineární amyulóza.<sup>6,17</sup>

Polysacharidy mohou být na chirální stacionární fázi navázány dvěma způsoby. První variantou je pouhé pokrytí nosiče, nejčastěji silikagelu, daným chirálním selektorem (tzv. coating). Takto vzniklá stacionární fáze je však málo stabilní, polysacharid je náchylný k rozpouštění a výběr mobilní fáze je značně omezen. Většinou je tedy využíván druhý způsob, kdy je chirální selektor chemicky vázán na hydroxylové skupiny sacharidu. Tyto imobilizované CSP jsou stabilnější, jejich selektivita ale může být obecně nižší kvůli zhoršené stereospecifické konfiguraci.<sup>6,17</sup>

### 3.4.2.2. Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy vznikající enzymatickým štěpením škrobu za přítomnosti některých mikroorganismů. Skládají se ze šesti až dvanácti jednotek  $\beta$ -1,4-D-glukopyranosy, pro chirální separace se však v praxi používají pouze  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\beta$ -cyklodextrin a  $\gamma$ -cyklodextrin složené ze šesti, sedmi, respektive osmi glukózových jednotek. Nejběžněji je používán  $\beta$ -cyklodextrin, jehož vnitřní dutina je svým rozměrem vhodná pro inkluzi nejširšího spektra molekul.<sup>17</sup>



Obrázek 3: Schematické znázornění hlavních cyklodextrinů<sup>18</sup>

Struktura cyklodextrinů připomíná tvar komolého kužele s otevřenými základnami. Povrch kužele je hydrofilní díky sekundárním hydroxylovým skupinám na okraji širší základny a primárním hydroxylovým skupinám na okraji užší základny, kdy jeden nebo dva z těchto primárních hydroxylů slouží k vazbě na nosič, nejčastěji silikagel. Do vnitřní dutiny kužele jsou naopak orientovány hydrofobní části molekuly (etherické kyslíky a vodíky) a tato dutina slouží k inkluzi hydrofobních částí separovaných molekul.<sup>6,17</sup>

Inkluze do kavity cyklodextrinů představuje nejdůležitější interkaci s analytem. Vytváří se tzv. inkluzní komplex, při jehož vzniku hraje důležitou roli vzájemná kompatibilita analytu a cyklodextrinu závislá na jejich velikosti a tvaru. Nesubstituovanou fenylovou skupinu analytu například nejlépe váže  $\alpha$ -cyklodextrin, kdežto o něco větší  $\beta$ -cyklodextrin má kavitu vhodnou pro substituované fenylové, naftylové a bifenylové kruhy. Pro polycyklické aromáty se třemi až pěti kruhy je nejvhodnějším selektorem  $\gamma$ -cyklodextrin. V prostředí s vysokým obsahem vody disponuje  $\alpha$ -cyklodextrin určitou flexibilitou a může být schopen pojmout i rozsáhlejší molekuly, kdežto  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrin jsou ve vodě a organických rozpouštědlech rigidní.<sup>6,17</sup>

Na stereospecifických interakcích cyklodextrinů se také podílejí hydroxylové skupiny ležící na okrajích kužele, které mohou být dále substituované polárními i nepolárními skupinami. Tím lze získat celou řadu derivátů pro širší okruh analytů a pro různé chromatografické systémy, protože tyto substituenty mohou nést další chirální centra, aromatické zbytky nebo skupiny schopné tvořit vodíkové vazby. Příkladem takových derivátů mohou být třeba acetyl- $\beta$ -cyklodextrin, hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin, naftylethylarbamoyl- $\beta$ -cyklodextrin a další.<sup>17</sup>

### 3.4.2.3. Glykoproteiny

K tvorbě enantioselektivního prostředí jsou vhodné také některé glykoproteiny. Jejich molekulová struktura se skládá z řetězců L-aminokyselin s navázanými sacharidy, takže obsahují řadu vazebných míst a chirálních center. Používají se například hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumin), kyselý  $\alpha_1$ -glykoprotein (AGP, oromukosid), ovomukoid (OVM) a enzymy jako je pepsin, trypsin nebo chymotrypsiny. Nevýhodou glykoproteinových fází je však menší kapacita a snížení účinnosti při vyšších koncentracích analytu. Separace probíhá především na principu elektrostatických sil, hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb.<sup>6,10,17</sup>

Do kategorie glykoproteinů se dají zařadit také CSP ze skupiny makrocyclických antibiotik. Nejpoužívanějšími jsou vankomycin, teikoplanin a ristocetin A. Vznikají jako fermentační produkty bakterií a jejich molekula sestává z peptidového řetězce substituovaného cukernými zbytky, vzájemně propojenými fenyly a mnoha dalšími funkčními skupinami. Všechny glykopeptidy jsou velmi selektivní, jejich použití se však liší. Přestože mají podobnou strukturu, díky určitým rozdílům vykazují vůči analytům odlišnou stereospecifitu.<sup>17</sup>

S cílem rozšířit počet separovatelných chirálních látek byly připraveny různé deriváty makrocyclických CSP. Úspěšnou modifikací je například odštěpení cukerných částí molekul, kdy dochází k odhalení a zpřístupnění ionizovatelných skupin. Vzniklé vankomycin-aglykonové a teikoplanin-aglykonové stacionární fáze pak umožňují lepší separaci nativních i cyklických aminokyselin. Následnou methylovací teikoplaninového aglykonu vznikla také vhodná fáze pro separaci hydrofobních látek.<sup>17</sup>

### 3.4.2.4. Deriváty chininu

Chirální stacionární fáze na bázi derivátů chininu se používají hlavně pro preparativní účely. Slouží k dělení látek obsahujících karboxylovou, sulfonovou a fosforečnanovou skupinu nebo fenolických sloučenin a slabých kyselin. Při separaci se uplatňují iontové interakce, vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce a sterické faktory.<sup>17</sup>

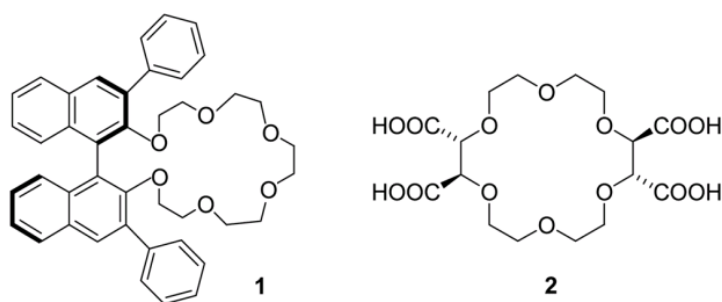
### 3.4.2.5. Ligandově výměnné CSP

Principem ligandové výměny je vznik reverzibilních diastereoizomerních metalo-komplexů. Tyto koordinační komplexy jsou tvořeny minimálně dvěma ligandy, sestávajícími z molekuly chirálního selektoru a molekuly analytu a centrálním iontem. Tím bývá kation přechodného kovu ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), přičemž nejstabilnější komplexy vznikají s  $\text{Cu}^{2+}$  ionty. Jako chirální selektory se osvědčily například aminokyseliny prolin, hydroxyprolin, leucin, valin nebo fenylnalanin navázané na silikagel. Mobilní fázi bývá pufr s malým přídavkem komplexujícího iontu.<sup>6,10,17</sup>

### 3.4.2.6. Crown-ethery

Crown-ethery se řadí mezi syntetické CSP a chemicky jsou to makrocyclické polyethery, jejichž základní strukturální jednotkou je ethylenoxidový můstek. Principem chirálního rozpoznávání je u nich vícenásobná vazba mezi etherovými kyslíky, které slouží jako donory elektronů, a kationtovou skupinou analytu. Pevné komplexy vznikají především s kationty kovů a substituovanými amonnými ionty.<sup>6,17</sup>

Crownethery mohou být dále začleněny do větší chirální molekuly – v praxi jsou používány (3,3-difenyl-1,1'-binaftyl)-20-crown-6-ether nebo (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetrakarboxylová kyselina, případně jejich kombinace. Jako mobilní fáze bývají používány kyseliny, nejčastěji kyselina chloristá o pH 1-2.<sup>6</sup>



Obrázek 4: Crownetherové chirální selektory:  
(3,3-difenyl-1,1'-binaftyl)-20-crown-6-ether (1) a  
(+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetrakarboxylová kyselina (2)<sup>19</sup>

### 3.4.2.7. Syntetické CSP s vtištěnými templáty

Jsou to chirální stacionární fáze vzniklé polymerací monomerů, jako je kyselina methakrylová, se síťovacím činidlem za přítomnosti templátové molekuly, kterou tvoří např. enantiomer aminokyseliny. Templát je následně z molekuly polymeru odstraněn a zůstává jeho otisk. Takto vzniklý polymer je poté schopen vysoce selektivně interagovat s látkami strukturně podobnými molekule templátu.<sup>17</sup>

### 3.4.2.8. Pirklovy chirální stacionární fáze

U takzvaných Pirklových fází je separace založena především na aromatických  $\pi$ - $\pi$  interakcích, kdy dochází k přenosu náboje a tvorbě komplexů mezi  $\pi$ -donorem a  $\pi$ -akceptorem. Molekula donoru je označována jako  $\pi$ -báze a má tendenci ztrácet elektron díky zvýšené elektronové hustotě na aromatickém jádře, způsobené kladným mezomerním efektem. Často to tedy bývají aromatické aminy, ethery a uhlovodíky.  $\pi$ -Akceptory ( $\pi$ -kyseliny) jsou obvykle nitroaromáty a mají díky zápornému mezomernímu efektu tendenci naopak elektron přijímat. Mimo  $\pi$ - $\pi$  interakcí se na chirálním rozpoznávání dále podílejí také vodíkové vazby a dipólové interakce.<sup>17</sup>

## 3.5. Hodnocení HPLC chromatogramu

### 3.5.1. Kvalitativní analýza

Pro kvalitativní analýzu, tedy identifikaci látky, lze v HPLC použít více způsobů. Jedním z přístupů je využití retenčních dat – retenčního času nebo retenčního objemu. Reprodukovatelnost těchto dat však závisí na složení mobilní fáze, použité stacionární fázi a pracovní teplotě. Tato metoda tudíž není ideální, protože i malé změny chromatografických podmínek mohou mít na retenci znatelný vliv a vést k nesprávnému výsledku.<sup>6,10</sup>

Identifikaci látek je tak možné provést zejména za pomoci specifických metod, jako je hmotnostní spektrometrie podávající informace o molekulové hmotnosti a o strukturně specifických fragmentech, nebo nukleární magnetická

rezonance (NMR), díky níž je možné zjistit molekulární strukturu zkoumané látky. Částečnou kvalitativní informaci lze také získat pomocí PDA detektoru a to porovnáním spektra analytu se spektry standardních látek nebo s vytvořenými knihovnamí spekter.<sup>6</sup>

### 3.5.2. Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní hodnocení léčiv pomocí HPLC je používáno několik přístupů, všechny ale mají relativní charakter, protože neznámá koncentrace se stanovuje porovnáním získaných hodnot se standardem. Základem těchto metod je vždy vztah mezi naměřenou plochou nebo výškou chromatografického píku a množstvím eluované látky. Sledovat výšku píku připadá v úvahu pouze u úzkých a symetrických píků a této možnosti se využívá minimálně. Mnohem častěji se pro stanovení používá plocha píku získaná integrací pomocí chromatografického softwaru.<sup>6</sup>

#### 3.5.2.1. Metoda vnějšího standardu

Nejjednodušším stanovením obsahu je metoda vnějšího standardu. Spočívá v přímém porovnání ploch píků vzorku ( $A_x$ ) a standardu ( $A_s$ ) o známé koncentraci ( $c_s$ ). Pro výpočet poslouží jednoduchý vzorec:

$$c_x = \frac{A_x}{A_s} \cdot c_s$$

Platí však, že koncentrace standardu a vzorku by měly být řádově stejné a v obou případech se nastříkuje stejný objem roztoku.<sup>6,10</sup>

#### 3.5.2.2. Kalibrační postup

Označuje se také jako metoda kalibrační křivky nebo metoda absolutní kalibrace. Podstatou je sestavení kalibrační křivky za pomoci série standardů o známé, ale různé koncentraci  $c_s$ . Doporučuje se připravit 5–7 různých koncentrací a u každého provést 2–3 nástríky. Závislost plochy nebo výšky píku ( $X$ ) na koncentraci



analyzované látky ( $c$ ) se poté vyjádří jako kalibrační funkce  $c = f(X)$  a výpočet neznámé koncentrace vzorku se provede podle rovnice kalibrační přímky:

$$x_i = a + b \cdot c_i$$

v níž  $x_i$  značí hodnotu plochy nebo výšky píku pro koncentraci  $c_i$ ,  $a$  je posunutí na ose  $y$  a  $b$  je směrnice přímky.<sup>6</sup>

### 3.5.2.3. Metoda vnitřního standardu

Při této metodě se k roztoku vzorku přidá roztok tzv. vnitřního standardu (IS, internal standard). To je látka, která není obsažena ve vzorku, neinteraguje s analytem a její pík je dobře oddělen. Také by měla mít podobnou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti jako analyt a eluovat se v jeho blízkosti.<sup>11</sup>

Stejně množství roztoku IS o známé koncentraci je přidáno jak k roztoku vzorku, tak k roztoku standardu o známé koncentraci  $c_s$ . Hodnotí se poměr ploch píků v nástřiku analytu  $A_i$  s vnitřním standardem  $A_{IS,i}$  a poměr ploch ve vzorku standardu  $A_s$  s jeho vnitřním standardem  $A_{IS,s}$ . Koncentrace vzorku  $c_x$  se poté vypočte podle vztahu:

$$c_x = \frac{A_i/A_{IS,i}}{A_s/A_{IS,s}} \cdot c_s$$

Metoda vnitřního standardu nachází často uplatnění v případech, kdy samotné analýze předchází úprava vzorku. Vnitřní standard a analyt jsou totiž při pracovním postupu ovlivněny stejně, proto tato metoda poskytuje přesnější výsledky než při použití vnějšího standardu. Někdy se spolu s metodou IS zároveň využívá také kalibrační postup.<sup>6,10</sup>

### 3.5.2.4. Metoda normalizace

Při použití metody normalizace se hodnotí plochy (nebo výšky) všech píků a množství jednotlivých složek se vyjádří jako jejich relativní zastoupení ve směsi podle rovnice:

$$c_x = \frac{A_x \cdot CRF_x}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot CRF_i}$$

Výsledkem je bezrozměrné číslo vyjadřující procentuální zastoupení analytů ve směsi. *CRF* v rovnici značí hmotnostní korekční odezvosý faktor (correction response factor), který je nutno zavést vzhledem k různě silné odezvě jednotlivých složek směsi v detektoru. Někdy je místo *CRF* používán korekční faktor *RMR* (relative molar response, relativní molární odezva).

Pro tuto metodu postačuje jeden nástřik vzorku, jehož objem nemusí být znám. Podmínkou je, že všechny složky směsi musí být hodnotitelné – musí se eluovat, poskytovat odezvu v detektoru a jejich píky musí být rozdělené. Metoda normalizace nachází uplatnění například při stanovení čistoty farmaceutických substancí, která se vyjadřuje v procentech vzhledem k účinné látce.<sup>6,10</sup>

### 3.5.2.5. Metoda přidavku standardu

Spočívá v přidání známého množství standardu analyzované látky ke vzorku. Při prvním nástřiku se dávkuje přesné množství vzorku, při dalším nástřiku pak přesné množství vzorku se známým přidavkem standardu daného analytu. Plochy nebo výšky píků se poté vyhodnotí a porovnají. Tato metoda se používá především při analýze složitějších vzorků, kdy chceme stanovit pouze jednu nebo několik málo složek.

Metoda přidavku standardu má více variant. Jednou z nich je rozdělení roztoku vzorku na dvě stejné části, kdy k jedné z nich je přidán standard o dané koncentraci. Následně jsou oba roztoky doplněny do stejného celkového objemu a analyzovány.

Další variantou je například metoda více přidavků standardu, kdy se k roztoku vzorku přidává rostoucí množství standardu tak, aby výsledné koncentrace byly násobkem předpokládané koncentrace analytu v původním vzorku. Z naměřených hodnot se poté sestaví závislost měřené plochy píků na koncentraci, která je popsána rovnicí. Pro výpočet neznámé koncentrace se tedy nakonec dosadí odezva vzorku do rovnice této závislosti.<sup>6,10</sup>

### 3.6. Validace analytické metody

Validace metody je proces, který ve svém důsledku poskytuje důkaz, že zvolená analytická metoda je pro daný účel vhodná a bude trvale poskytovat spolehlivá data.<sup>20</sup> Pro správnou validaci je důležitý výběr vhodných validačních parametrů; některé z nich budou popsány v následujícím textu.

#### 3.6.1. Přesnost

Přesnost (precision) určuje míru shody mezi jednotlivými, vzájemně nezávislými výsledky analýzy provedené s jedním homogenním vzorkem. Míra přesnosti se vyjadřuje zpravidla jako směrodatná odchylka výsledků analýzy a většinou se hodnotí na šesti samostatně připravených vzorcích. Pokud se stanovuje přesnost na více koncentračních hladinách, použijí se od každé koncentrace tři vzorky, ze kterých se směrodatná odchylka vypočte. Pokud není přesnost závislá na koncentraci, lze vypočíst směrodatnou odchylku ze všech koncentračních hladin dohromady.<sup>6,17,21</sup>

Podle podmínek opakování metody rozlišujeme tři úrovně přesnosti:

**Opakovatelnost** – přesnost metody, pokud se opakuje na stejném přístroji, se stejnými činidly a je prováděna jedním pracovníkem.<sup>2</sup>

**Mezilehlá přesnost** – přesnost, pokud je metoda opakována ve stejné laboratoři s jedním homogenním vzorkem, ale na jiném přístroji, s jinými činidly v jiný den a jiným pracovníkem.<sup>2</sup>

**Reprodukovatelnost** – přesnost, kdy se měření provádí za stejných podmínek jako u mezilehlé přesnosti, ale v jiné laboratoři.<sup>2</sup>

#### 3.6.2. Správnost

Správnost (accuracy) vystihuje odchylku naměřeného výsledku od skutečné koncentrace látky ve vzorku. Dá se vyjádřit jako výtěžnost (recovery), což je poměr naměřené hodnoty ke skutečné nebo referenční hodnotě vyjádřený v procentech.

Prakticky se dá zjistit například srovnáním hodnoceného vzorku s modelovým vzorkem (placebem). Modelový vzorek by měl obsahovat všechny složky jako hodnocený vzorek, avšak bez analyzované látky, s přídatkem přesně daného množství standardu. Pokud nelze placebo připravit, může být dalším způsobem známý přídatek standardní látky ke vzorku; maximálně však 50 % oproti předpokládanému množství. Závislost odezvy na koncentraci musí být v této oblasti lineární.<sup>2,6,17</sup>

Přesnost i správnost můžeme hodnotit v rámci jedné série analýz (*within-run*), nebo mezi různými sériemi analýz (*between run*).<sup>22</sup>

### 3.6.3. Linearita

Udává schopnost metody poskytnout výsledky přímo úměrné koncentraci analytu v daném koncentračním rozmezí. Lineární závislost se určuje vyhodnocením vzorků z nejméně pěti koncentračních hladin a vyjadřuje se vztahem

$$y = a + bx$$

kde  $y$  je závislá veličina (signál),  $x$  je nezávislá proměnná (koncentrace),  $a$  je posunutí na ose  $y$  a  $b$  je směrnice kalibrační přímky. Těsnost vzájemné závislosti proměnných popisuje korelační koeficient  $R$ , jehož hodnota by se ideálně měla blížit jedné – většinou platí podmínka, že  $R > 0,9990$ .<sup>2,6</sup>

### 3.6.4. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, limit of detection, detekční limit) je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, pro kterou je signál statisticky odlišný od šumu. Většinou se vyjadřuje jako koncentrace, při které má poměr S/N (poměr signálu vůči šumu základní linie) hodnotu 3.

Mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification, kvantifikační limit) je nejnižší koncentrace, při které je analyzovaná látka stanovitelná s definovanou přesností, zpravidla s relativní směrodatnou odchylkou do 10%. Dá se vyjádřit jako koncentrace, při které má poměr S/N hodnotu 10.<sup>2,6</sup>

### 3.6.5. Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti chromatografického systému (SST, system suitability test) je důležitá součást validace HPLC metod. Jde o soubor podmínek, jejichž splnění by mělo zaručovat účinnost a spolehlivost validované metody pro daný systém. Je proveden na začátku každého měření, při každé jeho změně nebo při podezření na chybně fungující přístroj. Parametry jsou voleny vždy podle konkrétní metody a zároveň tak, aby pokryly všechny příčiny, které by mohly mít na validitu vliv. Těmi může být například správná funkce dávkovače, chromatografické kolony, nebo detektoru. Pro kapalinovou chromatografii se používají parametry jako opakovatelnost, rozlišení, selektivita, faktor symetrie a faktor chvostování píku, počet teoretických pater nebo retenční faktor.<sup>2,6,17</sup>

## 3.7. Úprava biologických vzorků

Biologické vzorky jako je krev, plasma, sérum nebo moč jsou velmi komplexní a většinou nemohou být dávkovány do chromatografického systému přímo. Samotné analýze tak musí předcházet jejich úprava. Mezi základní techniky úpravy biologických vzorků řadíme deproteinaci (protein precipitation, PPT), extrakci kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE) a extrakci na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE)

### 3.7.1. Deproteinace

Deproteinace je jednoduchá a rychlá technika využívající přídavek precipitačního činidla k vysrážení proteinů z roztoku, nejčastěji z krevní plasmy. Poté je vzorek centrifugován a čistý supernatant se použije k další analýze. Precipitantem by měla být kapalina mísitelná s vodou – používají se organická rozpouštědla (acetonitril, aceton, methanol), silné kyseliny (10% trichloroctová kyselina, 6% chloristá kyselina), nebo koncentrované roztoky solí. Množství vysrážených proteinů roste s navyšujícím se poměrem precipitačního činidla, ale zároveň s tím dochází také k naředění vzorku. Kromě proteinů tato metoda nedokáže odstranit ostatní nežádoucí komponenty matrice.<sup>23</sup>

### 3.7.2. LLE

Liquid-liquid extrakce (LLE, extrakce kapalina-kapalina) je založena na distribuci analytu mezi vodnou a organickou fází. Tento děj popisuje rozdělovací (distribuční) koeficient  $K_D$ :

$$K_D = \frac{A_{\text{organická f.}}}{A_{\text{vodná f.}}}$$

kde  $A$  je koncentrace látky v jednotlivých fázích. Tato metoda je ideální pro málo polární látky, které ve vodném roztoku nedisociují. V případě kyselin a zásad je proto potřeba nejprve upravit pH na požadovanou hodnotu k potlačení jejich ionizace. K vodnému roztoku je poté přidáno organické rozpouštědlo, které je s vodnou fází nemísitelné a zároveň se v něm extrahovaná látka dobře rozpouští. Zkumavka se následně 1–10 minut protřepává, přičemž dochází k přechodu analytu z vodné fáze do organické podle jeho rozdělovacího poměru. Nakonec se roztok centrifuguje a odebere se organická fáze. Organické rozpouštědlo pak může být odpařeno, vzorek rozpuštěn v mobilní fázi nebo v jiném roztoku vhodném pro HPLC a dávkován do chromatografického systému.<sup>11,23</sup>

### 3.7.3. SPE

Extrakce na pevné fázi (SPE, solid-phase extraction) využívá krátké extrakční kolony ve tvaru injekčních stříkaček naplněné sorbentem, které fungují na podobném principu jako HPLC. Sorbentem často bývá reverzní stacionární fáze, jako je C<sub>18</sub>-silikagel nebo materiál na bázi polymeru. Na rozdíl od HPLC jsou však jeho částice větší (okolo 40 μm) a nepracuje se za vysokých tlaků.<sup>11</sup>

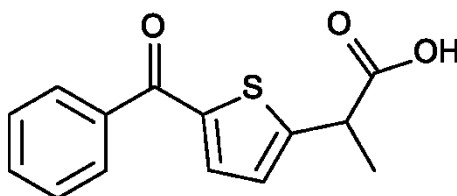
Prvním krokem extrakce je kondicionace, kdy je kolona promyta nejdříve polárním organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril) k aktivaci funkčních skupin sorbentu a následně vodným roztokem k vymytí nadbytku tohoto rozpouštědla. Druhou fází je nanesení roztoku vzorku, který poté postupuje sorbentem. Analyty jsou přitom na stacionární fázi zachyceny, kdežto ostatní složky matrice prochází bez zadržení. V třetím kroku jsou pak vhodným rozpouštědlem vymyty zbylé balastní látky. Posledním krokem je eluce, při které se systém promyje

malým množstvím roztoku, díky kterému dojde k rozrušení vazby analytu na sorbent. Získá se eluát s výtěžností, která se často blíží 100 %.<sup>11,23</sup>

#### **3.7.4. SPME**

Mikroextrakce tuhou fází (SPME, solid-phase microextraction) je moderní metoda na principu sorpce analytu na pevnou stacionární fázi, která je nanášena na tenkém vlákně. Extrakce probíhá ve dvou krocích. Nejprve je do vzorku ponořeno vlákno, na jehož povrch se podle rozdělovacího koeficientu sorbuje analyt. Po ustálení rovnováhy se vlákno vyjme a analyty jsou v druhé fázi desorbovány a dávkovány do chromatografického systému. Jako stacionární fáze se používají polymery (např. polydimethylsiloxan, polyakrylát) nebo směs polymeru s pevným sorbentem (např. s divinylbenzenem). SPME nevyžaduje žádná rozpouštědla, je jednoduchá, vysoce citlivá a bývá často spojována s kapalinovou i plynovou chromatografií.<sup>23,24</sup>

### 3.8. Kyselina tiaprofenová



Obrázek 5: strukturní vzorec kyseliny tiaprofenové

**Lékopisný název:** Acidum tiaprofenicum

**Chemický název:** kyselina (2*RS*)-2-(5-benzoylthiofen-2-yl) propanová<sup>25</sup>

**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>S

**Molekulová hmotnost:** 260,31 g/mol

**Vlastnosti:** Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v acetonu, v 96% ethanolu a v dichlormethanu.<sup>25</sup> Teplota tání je 96 °C.<sup>26</sup>

Kyselina tiaprofenová je nesteroidní protizánětlivé léčivo patřící do skupiny derivátů kyseliny arylpropionové. Ve své molekule obsahuje jeden asymetrický uhlíkový atom, je tedy opticky aktivní. V léčivých přípravcích se vyskytuje ve formě racemátu. Na českém trhu je obsažena v jediném léčivém přípravku – Surgam Léčiva 300 mg tbl.<sup>26,27</sup>

**ATC klasifikace:** M01AE11 – Kyselina tiaprofenová

**Indikace:** Akutní i chronická revmatická kloubní onemocnění: revmatoidní artritida, osteoartróza, ankylozující spondylartritida (Bechtěrevova nemoc). Dále také všechny typy mimokloubního revmatismu, pooperační záněty a bolestivé stavy, bolesti zad a bolestivá poranění pohybového ústrojí.<sup>28</sup>

**Dávkování:** U dospělých je obvyklá dávka 300 mg dvakrát denně.<sup>29</sup>

**Mechanismus účinku:** Inhibuje syntézu prostaglandinů inhibicí cyklooxygenázy a redukuje jejich aktivitu. Pravděpodobně tlumí aktivitu i jiných lokálních mediátorů



zánětu. Díky tomu působí silně antiflogisticky, analgeticky, antipyreticky a má též reverzibilní antiagregační účinek na trombocyty.<sup>28</sup>

**Farmakologické vlastnosti:** Biologická dostupnost po perorálním podání činí 90 %. Kyselina tiaprofenová se rychle vstřebává a maximální koncentrace v plasmě dosahuje asi za 1 hodinu při podání na lačno a asi za 2 hodiny při podání s jídlem. Difunduje do všech tkání včetně synoviální tekutiny, kde dosahuje maximální koncentrace za 4 hodiny od podání. Biologický poločas je 1,5–1,7 hodiny, ve stáří se může prodloužit až na 2,5 hodiny. Z 10 % podléhá metabolizaci v játrech (oxidaci nebo redukcí) na dva neaktivní metabolity. 60 % kyseliny tiaprofenové a jejích metabolitů je vylučováno ve formě konjugovaných glukuronidů ledvinami, zbylých 40 % je vyloučeno žlučí do stolice.<sup>28,29</sup>

Co se týče farmakodynamiky jednotlivých enantiomerů, předpokládá se, že aktivní je především S-enantiomer, podobně jako tomu je u ostatních NSAIDs ze skupiny arylpropionových kyselin. Farmakokinetikou jednotlivých enantiomerů se zabývalo několik studií, závěr však není jednoznačný. Některé výsledky sice naznačují určitou míru stereoselektivní distribuce v organismu, protože ve sledovaných tkáních byla nalezena vyšší koncentrace S-enantiomeru oproti R-formě. Tento rozdíl však nebyl dostatečně statisticky významný.<sup>30,31</sup>

Je známo, že většina 2-arylpropionových kyselin prochází v organismu chirální konverzí a jejich R-izomer je zpravidla přeměňován na aktivní S-formu. Kyselina tiaprofenová však tvoří v této skupině látek výjimku a chirální konverze se u ní ve významné míře neobjevuje.<sup>32</sup>

**Nežádoucí účinky, toxicita:** Podobně jako ostatní nesteroidní antiflogistika může kyselina tiaprofenová způsobovat gastrointestinální potíže, kdy k nečastějším projevům patří bolest v nadbříšku, nauzea, zvracení aj. V závažnějších případech může být také příčinou gastrointestinálního krvácení, ulcerací a perforací. Stejně tak se u kyseliny tiaprofenové vyskytuje i nefropatie s projevy jako je retence tekutin a vznik edémů. Mezi další nežádoucí účinky tohoto léčiva se řadí bolesti hlavy, únava a závratě, vzácněji pak hypersenzitivita a kožní reakce.<sup>28</sup>

### 3.8.1. Studie zabývající se HPLC analýzou kyseliny tiaprofenové

Následuje přehled prací, které se týkají HPLC analýzy kyseliny tiaprofenové, se zaměřením na chromatografické podmínky.

V roce 1995 porovnávali A. Van Overbeke, W. Baeyens a C. Dewaele separaci enantiomerů některých 2-arylpropionových kyselin. Byly srovnávány dvě kolony: experimentální kolona Tollylcelulose EXP B101 od společnosti Bio-Rad RSL a kolona Chiralcel OJ od společnosti Diacel, obě na bázi tris(4-methylbenzoátu) celulózy. Průtok mobilní fáze činil 1 ml/min a detekce probíhala při 230 a 254 nm. Kyselina tiaprofenová byla nanášena na kolonu Chiralcel OJ za použití mobilní fáze z n-hexanu, 2-propanolu a kyseliny octové 0,5 % 80 : 20 : 0,05 (v/v), přičemž enantiomery se eluovaly s rozlišením 0,65. Dále byla provedena separace na koloně Tollylcelulose pomocí mobilní fáze methanol : chloristanový pufr 0,1 M, pH 2 v poměru 60 : 40, avšak rozlišení enantiomerů bylo malé ( $R=0,38$ ). Proto byly připraveny deriváty všech analyzovaných kyselin (estery a aminy) a testovány na obou kolonách v normálním módu a na koloně Tollylcelulose navíc v reverzním módu za použití stejných mobilních fází jako při prvních analýzách. Za těchto podmínek byly všechny deriváty kyseliny tiaprofenové snadno separovány, přičemž lepší výsledky poskytovala kolona Chiralcel OJ, na které největšího rozlišení ( $R=3,78$ ) dosáhl benzylester kyseliny tiaprofenové.<sup>33</sup>

V roce 1996 publikovali A. Van Overbeke, W. Baeyens, H. Oda a H. Y. Aboul-Enein práci zabývající se enantiospecifickou HPLC separací některých 2-arylpropionových kyselin, barbiturátů a benzodiazepinů. Analýza probíhala na chirální koloně Chiralcel OJ-R na bázi celulózy, derivatizované 4-methylbenzoátem, a látky byly detekovány při 230 a 254 nm. Zkoušeny byly celkem tři různé mobilní fáze. První se skládala z acetonitrilu a chloristanového pufru (0,5 M, pH 2) v poměru 35 : 65 a ze zkoušených fází poskytovala pro kyselinu tiaprofenovou nejlepší rozlišení ( $R=1,35$ ). Druhou mobilní fází byla směs acetonitrilu, methanolu a chloristanového pufru (0,5 M, pH 2) v poměru 35 : 35 : 30, kde rozlišení dosáhlo hodnoty 1,13. Poslední testovanou mobilní fází byla směs methanolu s chloristanovým pufrem (0,5 M), kdy však separace enantiomerů kyseliny tiaprofenové nebyla úspěšná.<sup>34</sup>

V roce 2000 vypracovali J. Sochor, J. Klimeš a další metodu pro extrakci kyseliny tiaprofenové z králičí krve pomocí liquid-liquid extrakce (LLE) a solid-liquid extrakce (SLE). Ke vzorkům krve byl nejprve přidán vnitřní standard diklofenak a krev byla hemolyzována. Při LLE byl jako extrakční rozpouštědlo použit dichlormethan a vzorek byl po vysušení rozpuštěn v mobilní fázi. SLE probíhala na silikagelové C-18 extrakční koloně, která byla po nanesení vzorku proplachována 10 ml vody, poté vysušena ve vakuu a analyty byly eluovány 5 ml dichlormethanu. Eluát byl následně vysušen a zbylý extrakt byl rozpuštěn v mobilní fázi. Takto získané roztoky byly analyzovány na skleněné koloně se stacionární fází Separon SGX C-18 za použití mobilní fáze složené ze směsi vody a methanolu 70 : 30 (v/v) okyselené na pH 3,1. Při UV detekci byla použita vlnová délka 313 nm.<sup>35</sup>

Smet, Staelens a další optimalizovali v roce 2001 chirální separaci některých 2-arylpropionových kyselin včetně kyseliny tiaprofenové na avidinové koloně Bioptic AV-1. Byl zkoumán vliv parametrů metody (pH mobilní fáze, koncentrace organického modifikátoru a koncentrace pufru) na rozlišení enantiomerů a čas analýzy. Jako mobilní fáze byla zvolena kombinace  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufru a acetonitrilu v různých poměrech, s různými hodnotami pH a koncentracemi pufru. Detekce probíhala prostřednictvím PDA detektoru při 254 nm, průtok činil 0,8 ml/min a kolona byla udržována při teplotě 30 °C.<sup>36</sup>

Aboul-Enein v roce 2003 publikoval práci týkající se chirální separace některých nesteroidních antiflogistik včetně kyseliny tiaprofenové na tartardiamidové koloně Kromasil CHI-DMB. Jako nejlepší mobilní fáze se pro zkoušené látky ukázala směs *n*-hexanu a *tert*-butylmethyletheru s malým přídavkem kyseliny octové. V případě kyseliny tiaprofenové bylo nejlepším dosaženým výsledkem částečné rozdělení enantiomerů, kdy nejvyššího rozlišení ( $R_s = 0,86$ ) bylo dosaženo při poměru složek mobilní fáze 75 : 25 : 0,1 (v/v/v).<sup>37</sup>

V roce 2008 publikoval Ghanem spolu s dalšími autory metodu pro přímé monitorování kinetického dělení enantiomerů kyseliny tiaprofenové za katalytického působení lipázy. Byla použita organická rozpouštědla, která nejsou pro HPLC zcela standardní (*tert*-butylmethylether, toluen, ethylacetát, dichlormethan,

tetrahydrofuran). Ta sloužila jednak pro snazší rozpuštění kyseliny tiaprofenové, ale i jako eluent pro enantioseparaci. V prvním kroku byl racemát kyseliny tiaprofenové esterifikován *n*-butanolem za katalytického působení enzymu lipázy. V druhém kroku byl vzniklý butylester hydrolyzován za přispění lipázy zpět na kyselinu tiaprofenovou. Pro sledování průběhu těchto reakcí byly vyvinuty chromatografické podmínky, které umožňují dokonalou a přímou separaci jak enantiomerů kyseliny tiaprofenové, tak enantiomerů jejího butylesteru. Byla použita kolona založená na principu 3,5-dimethylfenylkarbamátu celulózy Chiralpak IB (4,6 mm × 250 mm ID, silikagel o velikosti částic 5 μm), což je imobilizovaná verze Chiralcel OD umožňující použití širšího spektra eluentů, včetně výše zmíněných nestandardních rozpouštědel. Jako mobilní fáze se nejlépe osvědčila směs *n*-hexanu, *tert*-butylmethyletheru, propan-2-olu a trifluoroctové kyseliny v poměru 90 : 10 : 1 : 0,2 (v/v/v/v). Průtok byl 1 ml/min, teplota 24 °C a UV detekce probíhala při vlnové délce 300 nm.<sup>38</sup>

V roce 2009 se Chayeh a další zabývali degradací kyseliny tiaprofenové ve třech různých prostředích a kinetiku tohoto procesu monitorovali pomocí HPLC. Rozklad byl sledován v kyselém prostředí kyseliny chlorovodíkové, v zásaditém prostředí hydroxidu sodného a v prostředí 30% peroxidu vodíku. Analýza vzorků probíhala na oktadecylsilylované chromatografické koloně SUPELCOSIL TM LC-18-DB za použití mobilní fáze o složení 1% kyselina octová : acetonitril v poměru 60 : 40 (v/v) s přídatkem 0,05M oktylsulfátu sodného, pH 4,5. Vlnová délka pro detekci byla nastavena na 254 nm.<sup>39</sup>

V roce 2010 publikovali Sultana, Arayne a Shahzad metodu pro stanovení ceftriaxonu v přítomnosti nesteroidních protizánětlivých léčiv v lidském séru za použití reverzní HPLC, přičemž mezi tato NSAIDs patřila i kyselina tiaprofenová. Stanovení probíhalo na oktadecylsilylované koloně Purospher Star (5 μm, 250 × 4,6 mm) a jako nejlepší mobilní fáze byla vybrána směs methanol : voda : acetonitril v poměru 80 : 15 : 5 (v/v/v) o pH 2,8. Průtok činil 1 ml/min a UV detekce probíhala při 270 nm.<sup>40</sup>

V roce 2012 prezentoval Nawaz metodu pro simultánní stanovení některých nesteroidních antiflogistik v lidském séru a farmaceutických přípravcích pomocí

RP-HPLC. Bylo analyzováno celkem šest nesteroidních antiflogistik, mezi které se řadila i kyselina tiaprofenová. Jako vnitřní standard byl zvolen ibuprofen a stanovení probíhalo na koloně Mediterranea C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  0,46 mm). Mobilní fázi byla směs methanol : acetonitril : voda v poměru 60 : 20 : 20 (v/v/v), pH bylo upraveno na 3,35 kyselinou fosforečnou. Analyty byly detekovány pomocí UV při vlnové délce 265 nm. Linearita stanovení těchto nesteroidních antiflogistik byla pozorována v koncentračním rozmezí 0,25–50  $\mu$ g/ml.<sup>41</sup>

Geryk, Kalíková, Vozka a další v roce 2014 představili práci hodnotící enantioselektivní potenciál CSP na bázi imobilizovaných polysacharidů v reverzním módu HPLC. Na čtyřech kolonách bylo zkoušeno 30 látek, převážně léčiv, včetně kyseliny tiaprofenové. Použité kolony byly CHIRALPAK IA – tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát amylozy, CHIRALPAK IB – tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát celulózy, CHIRALPAK IC – tris(3,5-dichlorfenyl)karbamát celulózy a CHIRALPAK ID – tris(3-chlorfenyl)karbamát amylozy, všechny o rozměrech 250 mm  $\times$  4,6 mm. Obecně se při analýze profenů nejvíce osvědčily kolony Chiralpak IA a ID na bázi amylozy za použití mobilní fáze sestávající z methanolu a okyselené vodné složky. Pro většinu profenů se tak podařilo najít chromatografické podmínky, kdy docházelo k dělení enantiomerů na základní linii. Pro kyselinu tiaprofenovou byla jako optimální vybrána kombinace kolony CHIRALPAK IA a mobilní fáze se složením methanol : vodný roztok kyseliny octové o pH 2,10 v poměru 80 : 20 (v/v), nebo kolona CHIRALPAK ID s mobilní fází stejného složení, pouze v poměru 70:30 (v/v). Průtok činil vždy 1 ml/min, teplota byla nastavena na 25 °C a UV detekce probíhala při vlnové délce 254 nm.<sup>42</sup>

Kalíková, Geryk a další poté v roce 2015 publikovali práci porovnávající separační účinnost amylozových kolon Chiralpak AD-RH a Chiralpak IA (obě 250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) v reverzním módu HPLC. Hlavní rozdíl mezi těmito kolonami spočívá ve způsobu nanesení chirálního selektoru na silikagel. Zatímco Chiralpak AD-RH je potažena amylozou, která je na silikagel pouze fyzikálně ukotvená, na imobilizovanou kolonu Chiralpak IA je amyloza navázána kovalentně. Pro porovnání těchto kolon bylo vybráno 37 analytů, z toho 8 profenů zahrnujících také kyselinu

tiaprofenovou. Větší enantioseparační potenciál u kyseliny tiaprofenové a dalších profenů vykazovala kolona Chiralpak AD-RH, kdy bylo u kyseliny tiaprofenové dosaženo rozlišení 1,35 a 1,51 při použití mobilní fáze z kyseliny octové o pH 2,10 a acetonitrilu v poměru 60 : 40 (v/v), respektive 70 : 30 (v/v).<sup>43</sup>

V roce 2017 publikovali Malátková, Skarka, Musilová a Wsól práci zabývající se studiem redukčního metabolismu kyseliny tiaprofenové v lidských játrech a také její redukcí pomocí rekombinantních karbonyl-redukujících enzymů. Pro HPLC analýzu byla zvolena kolona Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 × 50 mm, 1,8 μm) temperovaná na teplotu 30 °C a mobilní fáze složená z 10 mM octanu amonného a methanolu v poměru 13 : 7 (v/v) o průtoku 0,65 ml/min. UV detekce byla provedena při 314 nm pro kyselinu tiaprofenovou a při 254 nm pro její redukovanou formu.<sup>30</sup>

## 4. Experimentální část

### 4.1. Přístroje, materiál a chemikálie

#### 4.1.1. Přístroje

Kapalinový chromatograf Prominence, Shimadzu, Japonsko

Degasser: DGU-20A3

Čerpadlo: LC-20AD

Autosampler: SIL-20AC

Kolonový prostor: CBM-20A

Detektor: SPD-M20A

Řídící jednotka: CTO-20AC

Software: LC Solution, Shimadzu

Analytické váhy Kern ALS 220-4N, Německo

Acidimetr 333 Druopta, Česká Republika

Třepačka Kavalier, Sklářny Kavalier a.s., Česká Republika

Centrifuga CL31R Multispeed, Trigon-plus, Česká Republika

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovenská Republika

#### 4.1.2. Chemikálie

Acetonitril, Sigma-Aldrich, Německo

Methanol, Sigma-Aldrich, Německo

Triethylamin, Fluka, Německo

n-Hexan, Sigma-Aldrich, Německo

2-Propanol, Scharlau, Německo

Kyselina octová, 99 %, Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká Republika

Diethylether, Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká Republika

Dichlormethan, Merck, Německo

Kyselina fosforečná, Lachema, n.p., Brno, Česká Republika

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká Republika

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká Republika

$\text{NaClO}_4$ , Sigma-Aldrich, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

#### **4.1.3. Standardy**

Kyselina tiaprofenová, Sigma-Aldrich, Německo

Naproxen, Sigma-Aldrich, Německo

Tribuzon, Sigma-Aldrich, Německo

Kebuzon, Sigma-Aldrich, Německo

Piroxikam, Sigma-Aldrich, Německo

Omeprazol, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina meklofenamová, Sigma-Aldrich, Německo

Nebumeton, Sigma-Aldrich, Německo

Allopurinol, Sigma-Aldrich, Německo

Nimesulid, Sigma-Aldrich, Německo

Chloramfenikol, Galenická laboratoř Ostrava, Česká Republika

Acetanilid, Sigma-Aldrich, Německo

Fenacetin, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina niiflumová, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina acetylsalicylová, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká Republika

Kyselina salicylová, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina benzoová, Penta s.r.o., Česká Republika

Methylparaben, Sigma-Aldrich, Německo

Propylparaben, Sigma-Aldrich, Německo

Ethylparaben, Sigma-Aldrich, Německo

Butylparaben, Sigma-Aldrich, Německo

#### **4.1.4. Chromatografické kolony**

LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck

LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck

LiChroCART® 250-4 ChiraDex® (5 µm), Merck

Chiralcel OD-R, 250 × 4,6 mm, (10 µm), Daicel chemical industries



#### **4.1.5. Pomůcky**

Laboratorní sklo, lžičky a kopistky, pipety, mikropipety, filtrační papír, plastové zkumavky s uzávěrem, vialky pro HPLC

#### **4.1.6. Biologický materiál**

Lidská plasma, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Česká Republika

## 4.2. Chromatografické podmínky pro HPLC analýzu kyseliny tiaprofenové

### Příprava zásobního roztoku kyseliny tiaprofenové o koncentraci $10^{-4}$ mmol/l:

Na analytických vahách bylo naváženo 26,0 mg kyseliny tiaprofenové a rozpuštěno v 100,0 ml metanolu. Z tohoto roztoku byl odebrán 1,0 ml a v odměrné baňce zředěn metanolem na 10,0 ml.

### Příprava pufru pro mobilní fázi

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufr o koncentraci 0,01 mol/l byl připraven navážením 1,361 g čisté substance, jejím rozpuštěním v čištěné vodě pro HPLC a doplněním do objemu 1000 ml v odměrné baňce. Následně byl roztok zfiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Pufr byl poté okyselen kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu, aby byla potlačena ionizace kyseliny tiaprofenové ve vodném roztoku. Mobilní fáze byla připravena smísením pufru a organické složky v uvedeném poměru.

#### 4.2.1. Výběr stacionární a mobilní fáze

**Kolona LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), teplota 22 °C, průtoková rychlost 1 ml/min, objem nástřiku 50  $\mu\text{l}$**

methanol : čištěná voda pro HPLC, pH 3,2	50:50 (v/v)
acetonitril : čištěná voda pro HPLC, pH 3,3	50:50 (v/v)
acetonitril : čištěná voda pro HPLC, pH 3,3	40:60 (v/v)
acetonitril : vodný roztok octanu amonného 0,01 mol/l, pH 6,9	50:50 (v/v)
acetonitril : vodný roztok octanu amonného 0,01 mol/l, pH 6,9	40:60 (v/v)
acetonitril : vodný roztok $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0,01 mol/l, pH 6,45	50:50 (v/v)
acetonitril : vodný roztok $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0,01 mol/l, pH 6,45	30:70 (v/v)
acetonitril : vodný roztok $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,01 mol/l, pH 4,5	40:60 (v/v)

**Kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) teplota 22 °C,  
průtoková rychlost 1 ml/min, objem nástřiku 50 µl**

acetonitril : vodný roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,16	30:70 (v/v)
acetonitril : vodný roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,00	35:65 (v/v)
acetonitril : vodný roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,14	40:60 (v/v)

#### **4.2.2. Výběr vnitřního standardu**

Při výběru vnitřního standardu bylo testováno několik sloučenin. Bylo vždy naváženo přibližně 2,5 mg substance, která byla následně rozpuštěna v 50,0 ml methanolu. Výsledné koncentrace připravených vzorků se pohybovaly od 34 do 70 µg/ml. Byly zkoušeny tyto sloučeniny:

Tribuzon  
Kebuzon  
Piroxikam  
Omeprazol  
Kyselina meklofenamová  
Nabumeton  
Allopurinol  
Nimesulid  
Chloramfenikol  
Acetanilid  
Fenacetin  
Kyselina niflumová  
Kyselina acetylsalicylová  
Naproxen  
Kyselina salicylová  
Kyselina benzoová  
Methylparaben  
Propylparaben  
Ethylparaben  
Butylparaben

Vzorky byly analyzovány na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použití mobilní fáze acetonitril : vodný roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/l, 40:60 (v/v) o pH 3 a s průtokem 1 ml/min.

#### **4.2.3. Ověření linearity**

10,8 mg kyseliny tiaprofenové bylo rozpuštěno v 10,0 ml methanolu, čímž vznikl zásobní roztok o koncentraci 1,08 mg/ml.

5,1 mg naproxenu bylo rozpuštěno v 50,0 ml methanolu, čímž vznikl zásobní roztok o koncentraci 102 µg/ml naproxenu.

Do pěti odměrných baněk o objemu 5,0 ml bylo pipetováno 50µl, 100µl, 150µl, 200µl a 250 µl výše popsaného zásobního roztoku kyseliny. Do všech odměrných baněk byly poté přidány 2,0 ml zásobního roztoku naproxenu a objem byl doplněn do 5,0 ml methanolem. Vznikla tak řada pěti roztoků s koncentracemi 10,8; 21,6; 32,4; 43,2 a 54,0 µg/ml kyseliny tiaprofenové a s konstantní koncentrací naproxenu 40,8 µg/ml.

Tyto roztoky byly poté analyzovány na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použití mobilní fáze acetonitril : vodný roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/l, 40:60 (v/v) o pH 3 a s průtokem 1 ml/min.

#### **4.2.4. Vypracování podmínek pro separaci enantiomerů**

Při hledání vhodných podmínek pro separaci enantiomerů kyseliny tiaprofenové byla zkoušena analýza v reverzním i v normálním módu. Byly testovány různé chirální stacionární fáze a mobilní fáze s různým složením a poměrem složek.

### ❖ Enantioseparace v reverzním módu

Pro analýzu byl použit zásobní roztok kyseliny tiaprofenové  $10^{-4}$  mmol/l.

#### ▪ *Chiralcel OD-R, 250 × 4,6 mm, (10 μm)*

##### ○ *průtok 0,5 ml/min:*

acetonitril : vodný roztok NaClO <sub>4</sub> 1 mol/l, pH 3,12	50:50 (v/v)
acetonitril : vodný roztok NaClO <sub>4</sub> 1 mol/l, pH 3,12	60:40 (v/v)
acetonitril : vodný roztok NaClO <sub>4</sub> 1 mol/l, pH 3,12	50:50 (v/v)
methanol : vodný roztok NaClO <sub>4</sub> 1 mol/l, pH 3,12	50:50 (v/v)
acetonitril : vodný roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,08	50:50 (v/v)

#### ▪ *LiChroCART® 250-4 ChiraDex® (5 μm)*

##### ○ *průtok 0,6 ml/min:*

methanol : triethylamin 1%, okyselený k. octovou na pH 4,02      50:50 (v/v)

##### ○ *průtok 0,8 ml/min:*

methanol : triethylamin 1%, okyselený k. octovou na pH 4,02      50:50 (v/v)  
acetonitril : vodný roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,48      50:50 (v/v)

### ❖ Enantioseparace v normálním módu

Pro analýzu byl použit zásobní roztok kyseliny tiaprofenové o koncentraci 200 μg/ml. Ten byl připraven rozpuštěním 20,0 mg substance v 10,0 ml methanolu, následně byl z tohoto roztoku odebrán 1 ml a zředěn methanolem na 10,0 ml.

#### ▪ *LiChroCART 250-4 ChiraDex*

##### ○ *průtok 0,8 ml/min:*

*n*-hexan : propan-2-ol      90 : 10 (v/v)  
*n* -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %      94 : 6 : 0,1 (v/v)

▪ **Chiralcel OD-R, 250 × 4,6 mm, (10 μm)**

○ **průtok 0,5 ml/min:**

<i>n</i> -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %	94 : 6 : 0,1 (v/v)
<i>n</i> -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %	97 : 3 : 0,1 (v/v)
<i>n</i> -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %	90 : 10 : 0,1 (v/v)

○ **průtok 0,8 ml/min:**

<i>n</i> -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %	94 : 6 : 0,1 (v/v)
--	--------------------

○ **průtok 1,0 ml/min:**

<i>n</i> -hexan : propan-2-ol : kyselina octová 99 %	94 : 6 : 0,1 (v/v)
--	--------------------

#### **4.2.5. Analýza v biologickém materiálu**

##### **Příprava zásobních roztoků**

Zásobní roztok kyseliny tiaprofenové o koncentraci 500 μg/ml byl připraven rozpuštěním 5,0 mg této substance v 10,0 ml methanolu. Obdobně byl připraven i zásobní roztok naproxenu o koncentraci 500 μg/ml.

Zásobní roztok kyseliny tiaprofenové o koncentraci 200 μg/ml byl připraven rozpuštěním 2,0 mg čisté látky v 10,0 ml methanolu. Stejně byl připraven také zásobní roztok naproxenu 200 μg/ml.

##### **Deproteinace**

Do zkumavky bylo odměřeno 0,5 ml lidské plasmy, k níž bylo pomocí mikropipety přidáno 50,0 μl zásobního roztoku kyseliny tiaprofenové o koncentraci 500 μg/ml a 50,0 μl zásobního roztoku naproxenu o koncentraci 500 μg/ml. Poté byly přidány 2,0 ml methanolu, který sloužil jako precipitační činidlo. Souběžně byly podobným způsobem ve zkumavkách připraveny dva kontrolní vzorky, první složený z 0,5 ml lidské plasmy a 2,0 ml methanolu; druhý vzorek obsahoval 0,5 ml čištěné vody a 2,0 ml methanolu. Tyto tři zkumavky byly deset minut intenzivně protřepávány na třepačce a následně byly na 10 minut centrifugovány při 5000

otáčkách za minutu. Do čistých zkumavek byla poté pipetou odebrána čirá vrstva methanolu, která byla plynným dusíkem odpařena do sucha. Extrakt byl v téže zkumavce rozpuštěn ve 2,0 ml roztoku o složení acetonitril :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 mol/l, pH 3,2; 50:50 (v/v). Tento vzorek byl poté analyzován pomocí HPLC na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), za použití mobilní fáze acetonitril :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01M 40:60, pH 3,2 o průtoku 1 ml/min. Výtěžnost byla vypočtena na základě porovnání se standardem obsahujícím kyselinu tiaprofenovou a naproxen v koncentracích 25  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Liquid-liquid extrakce (LLE)**

Do zkumavky bylo odměřeno 0,5 ml lidské plasmy, ke které bylo pomocí mikropipety přidáno 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku kyseliny tiaprofenové 500  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku naproxenu 500  $\mu\text{g/ml}$ . Poté byl vzorek okyselen přidáním 0,5 ml 10% kyseliny chlorovodíkové (HCl) z důvodu potlačení ionizace analyzovaných látek. Obdobně byl v druhé zkumavce připraven kontrolní blankový vzorek o složení 0,5 ml lidské plasmy s 0,5 ml 10% HCl a ve třetí zkumavce vzorek složený z 0,5 ml čišťené vody s 0,5 ml 10% HCl. Do všech tří zkumavek byly následně přidány 2,0 ml organického rozpouštědla, které tvořil diethylether nebo dichlormethan. Vzorky byly po dobu 10 minut intenzivně protřepávány na třepačce, poté byly na 10 minut vloženy do centrifugy a odstředovány při 5000 otáčkách za minutu. Organické vrstvy obsahující extrakt byly přeneseny do čistých zkumavek a vysušeny plynným dusíkem. Extrakty byly poté rozpuštěny ve 2,0 ml roztoku o složení acetonitril : vodný roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 mol/l, pH 3,2; 50:50 (v/v). Takto vzniklé vzorky byly analyzovány na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) za použití mobilní fáze acetonitril :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01M 40:60, pH 3,2 o průtoku 1 ml/min. Výtěžnost byla vypočtena na základě porovnání se standardem obsahujícím kyselinu tiaprofenovou a naproxen v koncentracích 25  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Ověření linearity v plasmě**

Pro sestavení kalibrační závislosti v plasmě byla připravena série pěti vzorků s naproxenem jako vnitřním standardem o konstantní koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$  a s kyselinou tiaprofenovou o koncentracích 10,0; 15,0; 25,0; 35,0 a 50,0  $\mu\text{g/ml}$ . Do

pěti zkumavek bylo nejprve napipetováno 0,5 ml plasmy a okyseleno 0,5 ml 10% HCl. Poté bylo do zkumavek přidáno 250  $\mu$ l zásobního roztoku naproxenu o koncentraci 200  $\mu$ g/ml a k němu 100, 150, 250, 350, respektive 500  $\mu$ l zásobního roztoku kyseliny tiaprofenové 200  $\mu$ g/ml. Ke všem vzorkům byly přidány 2,0 ml diethyletheru jako extrakčního rozpouštědla. Analogicky bylo připraveno také pět kontrolních vzorků za použití 0,5 ml čištěné vody namísto lidské plasmy. Poté byly vzorky extrahovány dle postupu pro LLE a analyzovány pomocí HPLC na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M 40:60, pH 3,3 o průtoku 1 ml/min.

### **Roztok pro stanovení detekčního a kvantifikačního limitu**

Byl připraven roztok kyseliny tiaprofenové v koncentraci 0,4  $\mu$ g/ml naředěním 10  $\mu$ l zásobního roztoku standardu 200  $\mu$ g/ml do 5 ml methanolu. Tento roztok byl dále ředěn metanolem na koncentrace 0,2  $\mu$ g/ml, 0,18  $\mu$ g/ml a 0,16  $\mu$ g/ml. Vzorky byly analyzovány na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu$ m) za použití mobilní fáze acetonitril : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M 40:60, pH 3,2 o průtoku 1 ml/min. Výsledky posloužily k výpočtu limitu detekce a limitu kvantifikace.



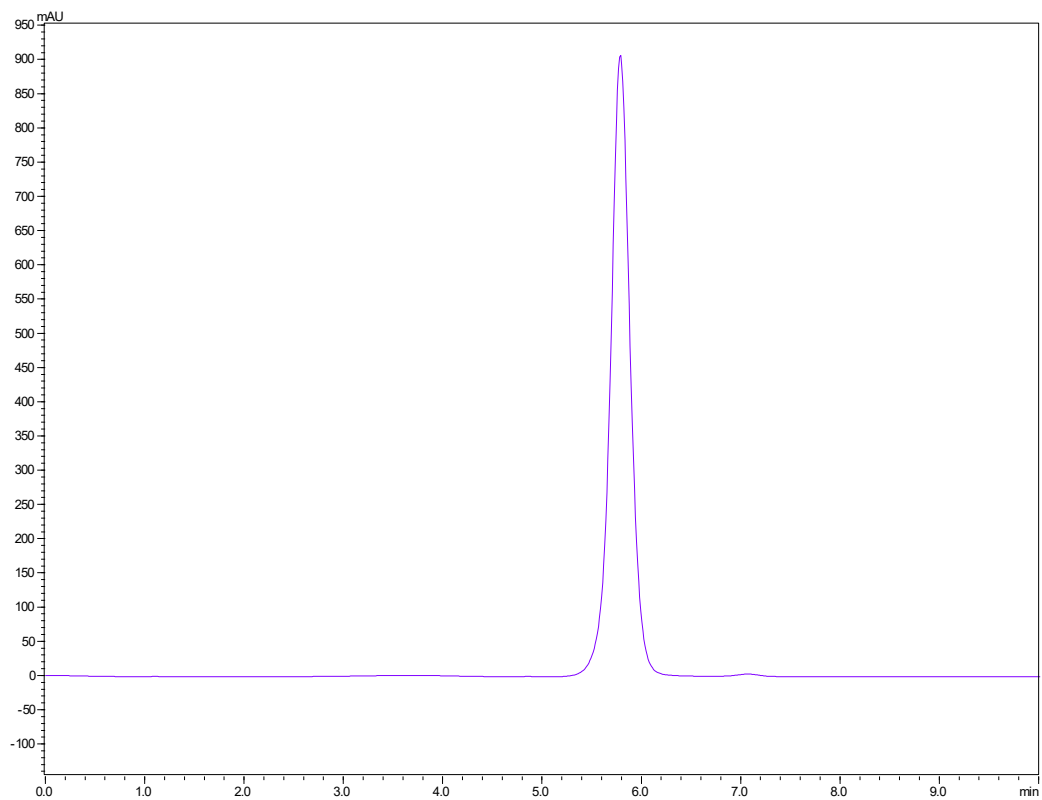
## 4.3. Výsledky a diskuze

### 4.3.1. Výběr chromatografických podmínek pro HPLC analýzu kyseliny tiaprofenové

#### 4.3.1.1. Výběr stacionární a mobilní fáze

Při hledání chromatografických podmínek pro analýzu kyseliny tiaprofenové bylo nejprve nutné nalézt vhodnou stacionární a mobilní fázi. Byly zkoušeny dvě chromatografické kolony: kolona LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) a kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), přičemž na druhé zmíněné koloně bylo dosaženo lepších výsledků.

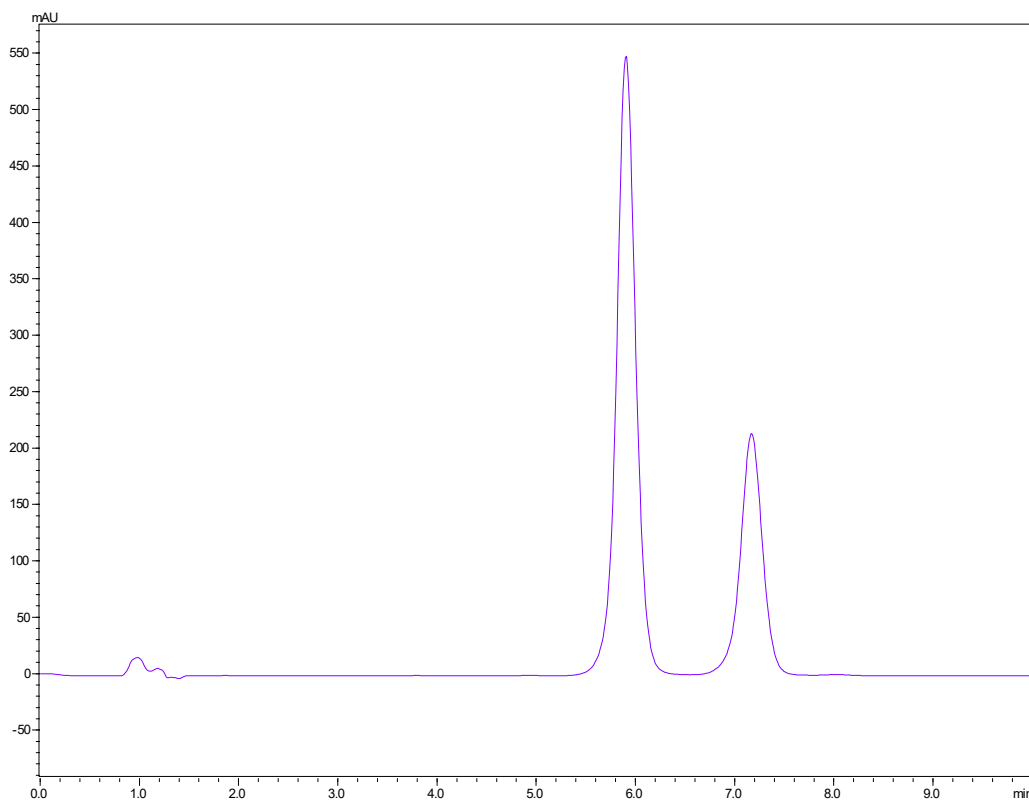
Při výběru mobilní fáze byly zkoušeny směsi obsahující vodnou složku a organické rozpouštědlo v různém poměru. Vodnou část tvořila nejprve voda čištěná reverzní osmózou a poté roztoky různých pufrů o koncentraci 0,01 mol/l. Osvědčilo se upravit pH vodné složky přibližně na hodnotu 3 kvůli potlačení disociace kyseliny tiaprofenové. Z organických rozpouštědel byl vyzkoušen methanol a acetonitril. Jako vhodná mobilní fáze se nakonec ukázala směs acetonitrilu a vodného roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 mol/l o pH 3,00 v poměru 40 : 60 (v/v). Teplota byla nastavena na 22 °C, průtok činil 1 ml/min a na kolonu bylo nastříkováno 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku kyseliny tiaprofenové o koncentraci  $10^{-4}$  mmol/l. Při těchto podmínkách bylo dosaženo optimální eluce s retenčním časem 5,78 minut.



Obrázek 6: Chromatogram analýzy standardu kyseliny tiaprofenové  $10^{-4}$  mol/l, kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu$ m), mobilní fáze acetonitril :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 mol/l, 40:60 (v/v), pH 3,00

#### 4.3.1.2. Výběr vnitřního standardu

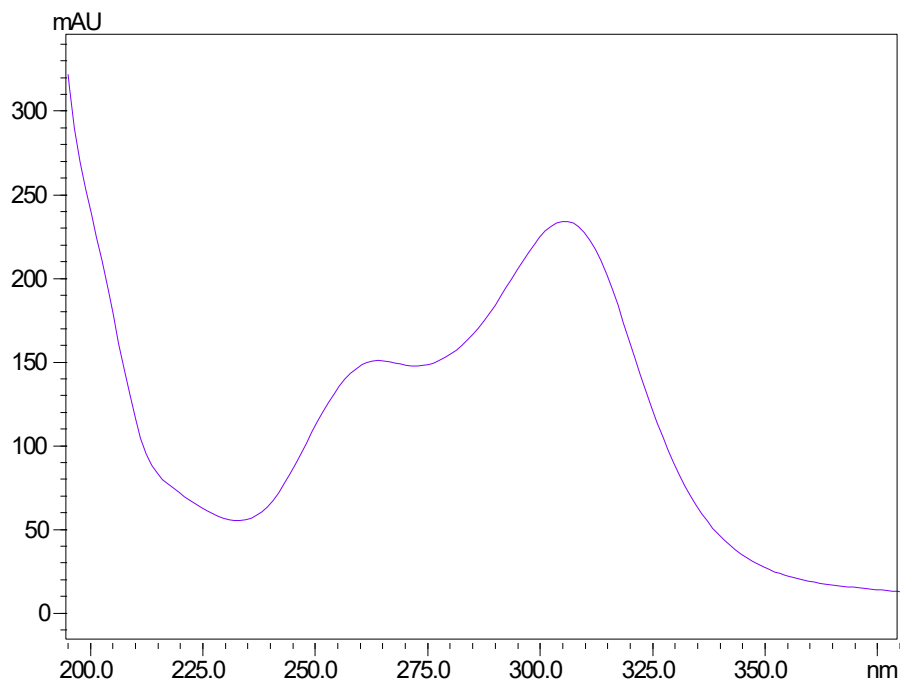
Výběr vnitřního standardu probíhal jednotlivým testováním různých sloučenin za použití chromatografických podmínek uvedených na straně 57. Bylo nutné vybrat sloučeninu, která se bude eluovat v blízkosti kyseliny tiaprofenové, avšak s dostatečným rozlišením na základní linii, aby nedocházelo ke vzájemnému překrývání píků. Píky by také měly být dostatečně ostré a symetrické a zároveň by analýza měla probíhat v co nejkratším čase. Jako nejvhodnější vnitřní standard byl ze všech zkoušených látek vybrán naproxen, který se za daných chromatografických podmínek eluoval v čase 7,17 minut.



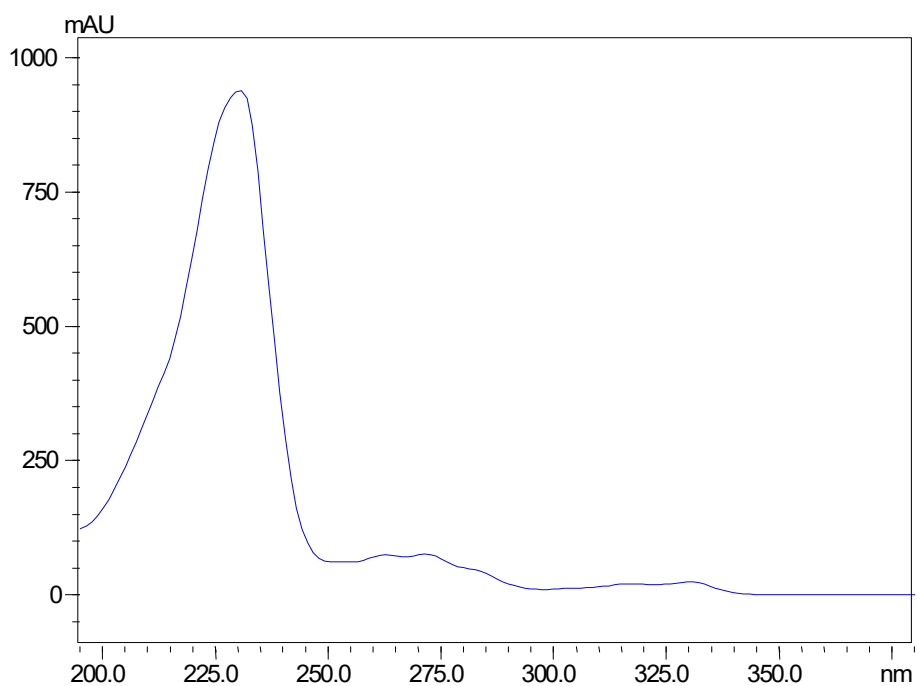
Obrázek 7: chromatogram separace kyseliny tiaprofenové a naproxenu za použití chromatografických podmínek uvedených na straně 57.

### 4.3.1.3. Výběr vlnové délky

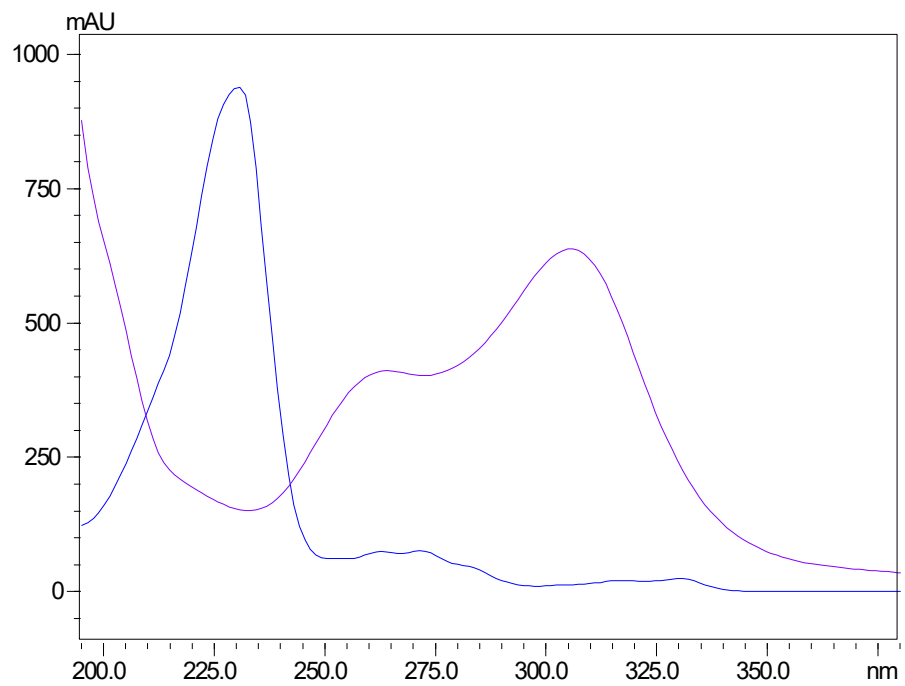
Vhodná vlnová délka pro detekci kyseliny tiaprofenové a naproxenu byla zvolena na základě změření a porovnání absorpčních spekter těchto dvou látek v rozsahu 195–380 nm. Jako optimální byla vybrána hodnota 263 nm.



Obrázek 8: Absorpční spektrum kyseliny tiaprofenové.



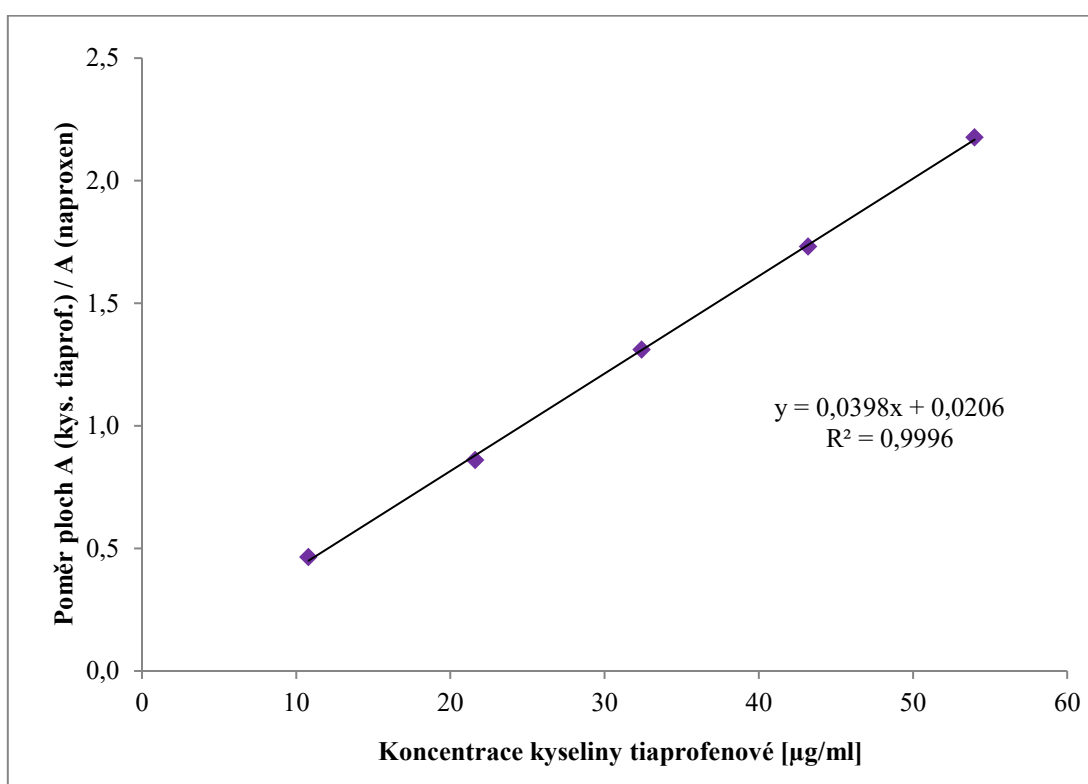
Obrázek 9: Absorpční spektrum naproxenu.



*Obrázek 10: Porovnání absorpčních spekter kyseliny tiaprofenové a naproxenu.*

#### 4.3.1.4. Ověření linearity

Jakmile byly vybrány chromatografické podmínky, bylo třeba ověřit, zda tato metoda poskytuje v daném koncentračním rozmezí lineární odezvu. Byla proto připravena série vzorků se standardem kyseliny tiaprofenové o koncentraci 10,8-54,0  $\mu\text{g/ml}$  a se standardem naproxenu o koncentraci 40,8  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorky byly analyzovány a z výsledků byla následně sestavena kalibrační závislost poměru ploch pík ( $A_{TA}/A_N$ ) na koncentraci kyseliny tiaprofenové v roztoku. Byla také vypočtena rovnice kalibrační přímky a koeficient determinace  $R^2$ , který nabyl hodnoty 0,9996.

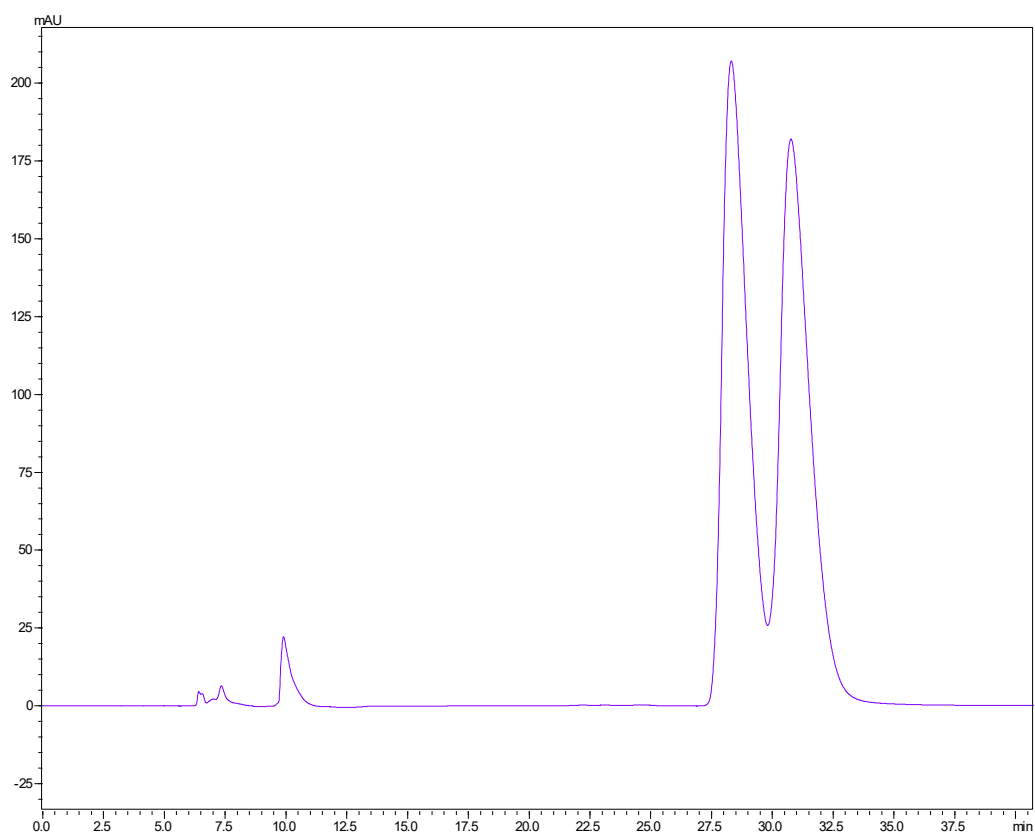


Obrázek 11: Graf závislosti poměru ploch pík standardu kyseliny tiaprofenové a naproxenu ( $A_{TA}/A_N$ ) na koncentraci kyseliny tiaprofenové. Použité chromatografické podmínky uvedeny na straně 57.

### 4.3.2. Vypracování podmínek pro separaci enantiomerů kyseliny tiaprofenové pomocí HPLC

#### 4.3.2.1. Výběr stacionární a mobilní fáze

Pro separaci enantiomerů kyseliny tiaprofenové byly vyzkoušeny dvě chirální kolony: Chiralcel OD-R, 0,46 cm × 25 cm (10 μm) od společnosti Daicel na bázi tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) celulózy a LiChroCART® 250-4 ChiraDex® (5 μm) od společnosti Merck s kovalentně vázaným β-cyklodextrinem. Na obou kolonách byly zkoušeny různé mobilní fáze uvedené v kapitole 4.2.4 s různou průtokovou rychlostí. Pro analýzu byla nakonec vybrána celulózová kolona Chiralcel OD-R, 250 × 4,6 mm, (10 μm). Na základě poznatků z literatury byla zvolena mobilní fáze složená z *n*-hexanu a propan-2-olu s přidavkem kyseliny octové.



Obrázek 12: Chromatografický záznam separace enantiomerů kyseliny tiaprofenové na koloně Chiralcel OD-R 250 × 4,6 mm, mobilní fáze *n*-hexan : propan-2-ol : kyselina octová v poměru 94 : 6 : 0,1; průtok 0,5 ml/min.

Nejlepšího dělení enantiomerů bylo dosaženo při poměru složek *n*-hexan : propan-2-ol : kyselina octová 94 : 6 : 0,1 (v/v/v) a průtoku 0,5 ml/min. Při vyšším průtoku (0,8 a 1,0 ml/min) docházelo sice ke zkrácení retenčních časů, ale zároveň k horší separaci enantiomerů. Zvýšením poměru polárního modifikátoru (propan-2-olu) na 10 % objemu při zachování průtoku 0,5 ml/min došlo sice také k rychlejší eluci, opět ale vedlo ke snížení rozlišení mezi enantiomery. Rozlišení a retenční časy při různých podmínkách jsou uvedeny v tabulkách č.

Tabulka 1 a Tabulka 2.

*Tabulka 1: Porovnání rozlišení a retenčních časů enantiomerů kyseliny tiaprofenové v závislosti na průtoku mobilní fáze. Poměr složek n-hexan : propan-2-ol : kyselina octová byl 94 : 6 : 0,1 (v/v/v).*

průtok mobilní fáze [ml/min]	rozlišení (R)	retenční časy ( $t_R$ ) enantiomerů [min]	
0,5	1,17	28,28	30,72
0,8	0,64	20,63	22,11
1	0,42	14,94	16,03

*Tabulka 2: Porovnání rozlišení a retenčních časů enantiomerů kyseliny tiaprofenové v závislosti na poměru složek mobilní fáze při konstantním průtoku 0,5 ml/min.*

poměr <i>n</i> -hexan:propan-2-ol	rozlišení (R)	retenční časy ( $t_R$ ) enantiomerů [min]	
94:6	1,17	28,28	30,72
90:10	0,81	20,31	21,68



### 4.3.3. Analýza v biologickém materiálu

Pro analýzu kyseliny tiaprofenové v lidské plasmě bylo potřeba nejprve vzorek upravit, aby ho bylo možné dávkovat do chromatografického systému. Byly zkoušeny dvě metody úpravy vzorku – deproteinace a extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE).

Při deproteinaci byl jako precipitační činidlo pro vysrážení bílkovin použit methanol. Výtěžnost této metody byla v průměru 59,5 %.

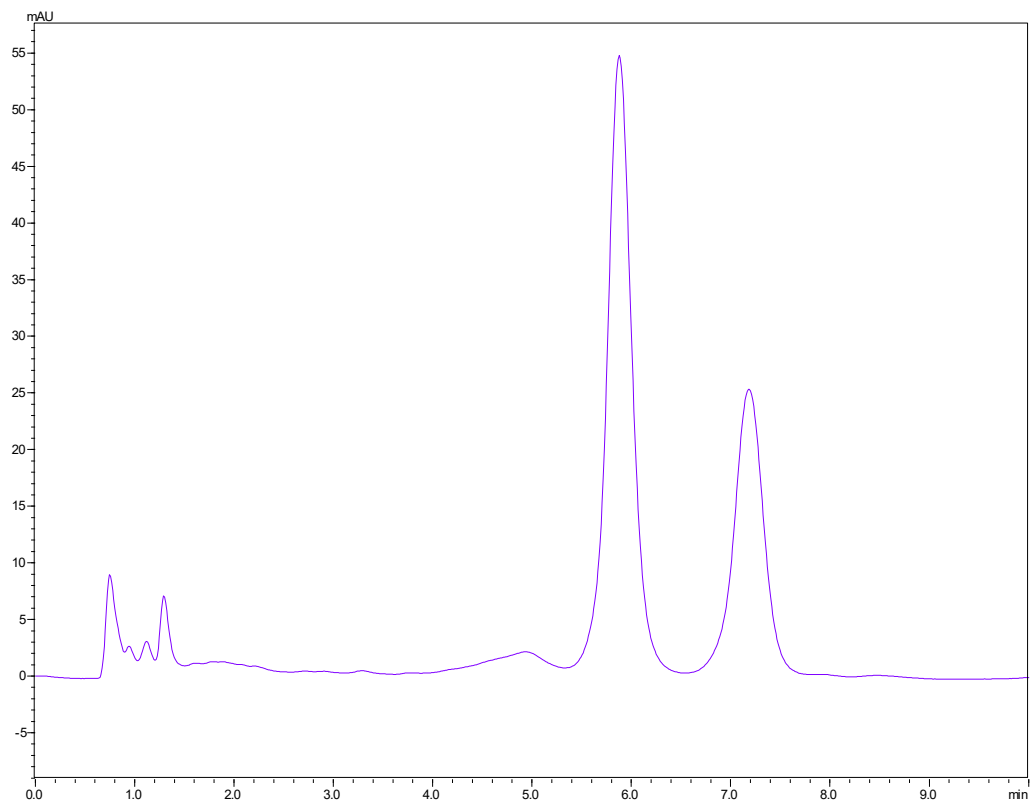
Při liquid-liquid extrakci byl jako extrakční činidlo vybrán diethylether. Výtěžnost zde byla vyšší než u deproteinace, činila v průměru 98,9 %.

Analýza probíhala na koloně LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použití mobilní fáze o složení acetonitril : vodný roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 mol/l, pH 3,0; v poměru 40 : 60 (v/v).

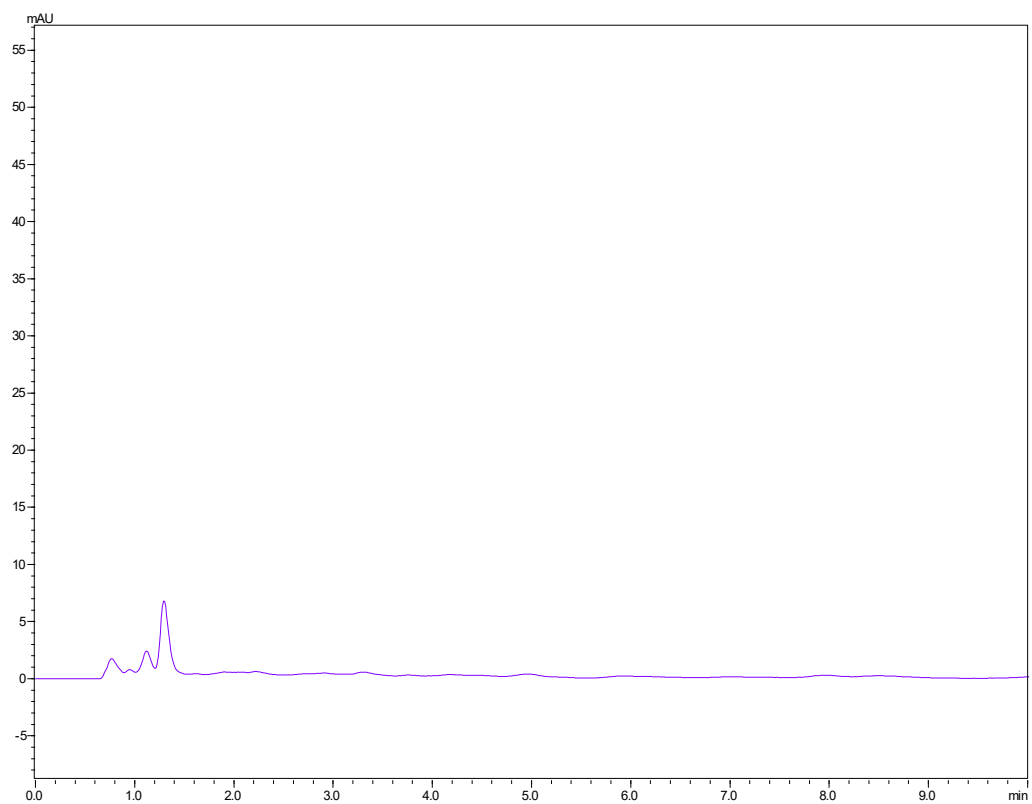
*Tabulka 3: Porovnání hodnot výtěžnosti při extrakci metodou deproteinace a metodou liquid-liquid extrakce.*

deproteinace			LLE pomocí diethyletheru				
1.	2.	<b>průměr</b>	1.	2.	3.	4.	<b>průměr</b>
62,5 %	56,5 %	<b>59,5 %</b>	87,8 %	119,3 %	109,8 %	78,9 %	<b>98,9 %</b>

Jako součást analýzy byl také připraven kontrolní vzorek obsahující pouze extrakt z čisté plasmy. U chromatogramů na str. 66 je patrné, že žádná složka plasmy neinterferovala s píky analyzovaných látek.



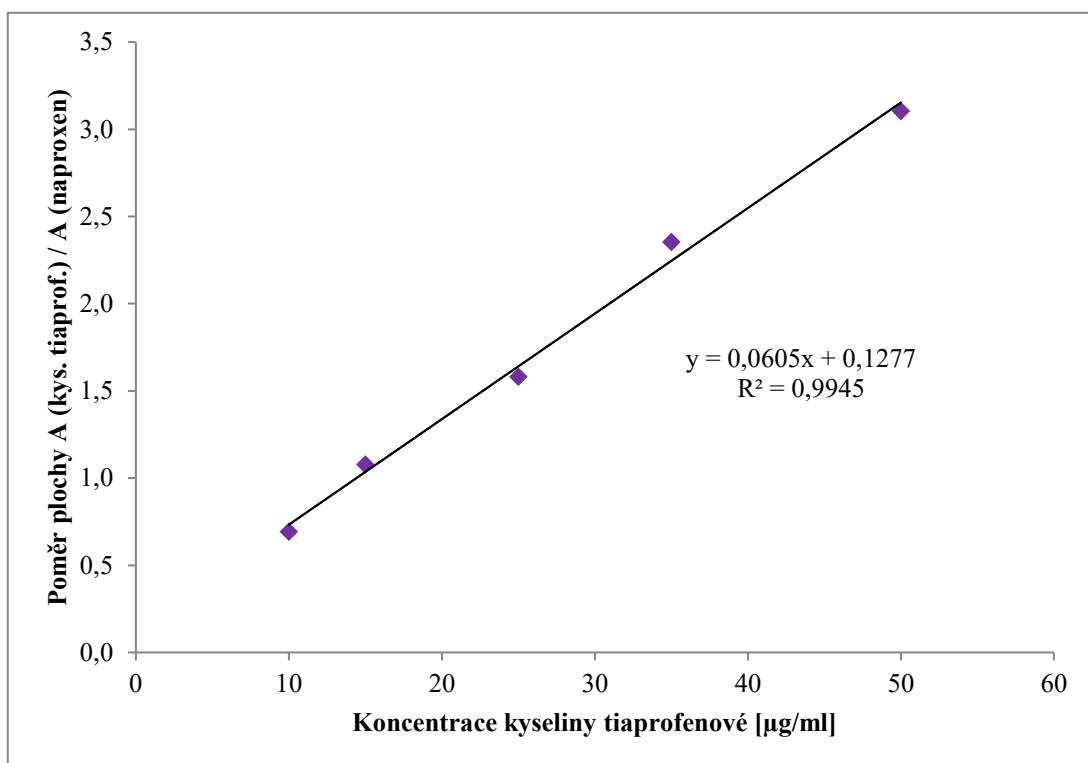
Obrázek 13: Chromatografický záznam kyseliny tiaprofenové a naproxenu po extrakci z plasmy metodou LLE. Chromatografické podmínky uvedeny na str. 65.



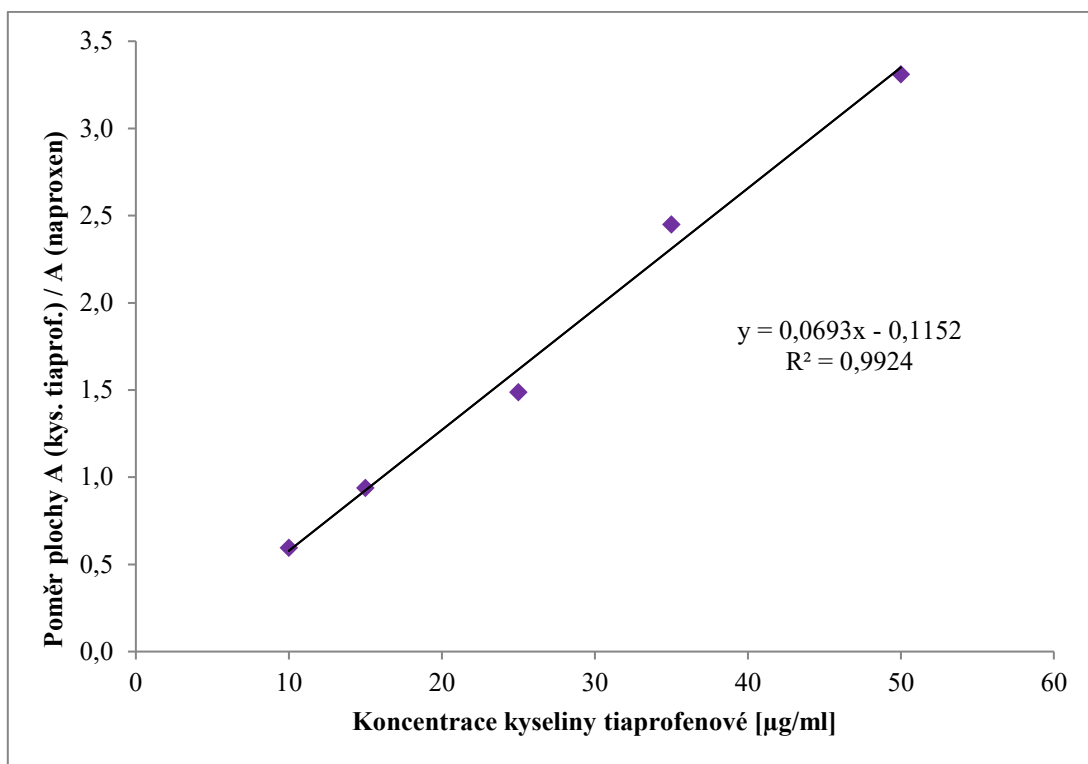
Obrázek 14: Chromatografický záznam po extrakci čisté plasmy metodou LLE. Chromatografické podmínky uvedeny na str. 65.

### 4.3.3.1. Ověření linearity v plasmě

Pro metodu liquid-liquid extrakce z plasmy bylo provedeno ověření linearity. Z výsledků byla sestrojena kalibrační křivka a vypočten koeficient determinace  $R^2$ . Pro porovnání byl tento postup proveden také s čištěnou vodou namísto plasmy.



Obrázek 15: Graf závislosti poměru ploch piků kyseliny tiaprofenové a naproxenu ( $A_{TA}/A_N$ ) na koncentraci kyseliny tiaprofenové po liquid-liquid extrakci z plasmy. Použité chromatografické podmínky uvedeny na straně 65.



Obrázek 16: Graf závislosti poměru ploch píků kyseliny tiaprofenové a naproxenu ( $A_{TA}/A_N$ ) na koncentraci kyseliny tiaprofenové po liquid-liquid extrakci z vody. Použité chromatografické podmínky uvedeny na straně 65.

Tabulka 4: Hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ).

koncentrace k. tiaprofenové [ $\mu\text{g/ml}$ ]	poměr signálu k šumu (S/N)	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
0,180	2,72715736	0,198	0,660

Tabulka 5: Opakovatelnost nástřiku na třech koncentračních úrovních po extrakci z plasmu vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka.

	1.	2.	3.	4.	5.	průměr	SD	RSD
kyselina tiaprofenová 10 $\mu\text{g/ml}$	497754	490030	546128	551986	560261	529232	29304	5,54 %
naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	611180	605508	693049	649552	686537	649165	36528	5,63 %
kyselina tiaprofenová 25 $\mu\text{g/ml}$	543653	616344	622604	618812	614417	603166	29882	4,95 %
naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	411821	419403	422957	423226	419239	419329	4117	0,98 %
kyselina tiaprofenová 40 $\mu\text{g/ml}$	821123	817171	836984	807446	818131	820171	9578	1,17 %
naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	325742	330737	328762	329287	340515	331009	5024	1,52 %

Tabulka 6: Hodnoty výtěžnosti a relativní směrodatné odchylky (RSD) na třech koncentračních úrovních po extrakci z plasmy.

	poměr $A_{TA}/A_N$	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	výtěžnost	RSD
k. tiaprofenová 10 $\mu\text{g/ml}$ naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	0,814415	11,35	113,51 %	
	0,809287	11,27	112,66 %	
	0,788008	10,91	109,14 %	
	0,849795	11,94	119,35 %	
	0,816068	11,38	113,78 %	
průměr	0,815515	11,37	113,69 %	2,89 %
k. tiaprofenová 25 $\mu\text{g/ml}$ naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	1,390120	20,87	83,47 %	
	1,469575	22,18	88,72 %	
	1,472027	22,22	88,88 %	
	1,462131	22,06	88,23 %	
	1,465553	22,11	88,45 %	
průměr	1,451881	21,89	87,55 %	2,35 %
k. tiaprofenová 40 $\mu\text{g/ml}$ naproxen 25 $\mu\text{g/ml}$	2,520777	39,55	98,89 %	
	2,470758	38,73	96,82 %	
	2,545866	39,97	99,92 %	
	2,452104	38,42	96,05 %	
	2,402628	37,60	94,01 %	
průměr	2,478427	38,85	97,14 %	2,16 %

Získané výsledky vyhovují směrnici Evropské lékové agentury pro validaci bioanalytických metod. Podle ní by měla správnost (vyjádřená jako výtěžnost) nabývat hodnot  $\pm 15\%$  skutečné koncentrace a přesnost (vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka) by neměla překročit  $15\%$ .<sup>22</sup>

## 5. Závěr

V této diplomové práci byly vypracovány vhodné podmínky pro stanovení kyseliny tiaprofenové pomocí HPLC a pro její izolaci z plasmy metodou extrakce kapalina-kapalina. Z několika zkoušených kolon byla vybrána kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) od společnosti Merck. Jako vhodná mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril : vodný roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 mol/l o pH 3,00 v poměru 40 : 60 (v/v), při průtoku 1 ml/min a teplotě 22 °C. Na kolonu bylo nastříkováno 50  $\mu\text{l}$  vzorku a pro detekci byla použita vlnová délka 263 nm. Při těchto podmínkách se kyselina tiaprofenová eluovala v retenčním čase 5,8 minut. Jako optimální vnitřní standard byl vybrán naproxen s retenčním časem 7,2 minut.

Pro extrakci kyseliny tiaprofenové z plasmy byla vybrána metoda liquid-liquid extrakce s průměrnou výtěžností 98,9 %. Jako extrakční organické rozpouštědlo byl zvolen diethylether. Vzorky obsahující 0,5 ml plasmy a standard kyseliny tiaprofenové a naproxenu byly před extrakcí okyseleny pomocí 0,5 ml 10% kyseliny chlorovodíkové a následně 10 minut protřepávány s 2 ml diethyletheru. Po centrifugaci při 5000 otáčkách/min po dobu 10 minut byla odebrána organická vrstva a vysušena plynným dusíkem. Extrakt byl rozpuštěn ve zmíněné mobilní fázi o poměru složek 50 : 50 (v/v) a analyzován za výše uvedených chromatografických podmínek.

Dále byly nalezeny podmínky pro separaci enantiomerů kyseliny tiaprofenové, pro kterou byla zvolena kolona Chiralcel OD-R, 250  $\times$  4,6 mm, (10  $\mu\text{m}$ ) na bázi celulózy. Jako vhodná se ukázala mobilní fáze o složení *n*-hexan : propan-2-ol : kyselina octová v poměru 94 : 6 : 0,1 (v/v/v) při průtoku 0,5 ml/min a teplotě 22 °C. Za těchto podmínek byly retenční časy enantiomerů 28,3 a 30,7 minut a bylo dosaženo rozlišení 1,17.

## 6. Seznam použité literatury

1. KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4. nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
2. KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: NECLEUS HK, 2011. ISBN 978-80-260-8175-3.
3. MIKEŠ, Otakar. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL, 1980. Technický průvodce (SNTL).
4. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
5. CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL, 1984. Knižnice technických aktualit.
6. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: [s. n.], 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
7. HPLC Schema. In: *Max-Planck-Institut für Polymerforschung* [online]. München, c2003-2017 [cit. 2017-08-18]. Dostupné z: <http://www.mpip-mainz.mpg.de/3483799/HPLC>. Upraveno.
8. PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *High performance liquid chromatography*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1990. ISBN 80-7066-203-4.
9. *Český lékopis 2017*. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
10. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.



11. SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
12. DOUŠA, Michal. Monolitické HPLC kolony. *HPLC.CZ* [online]. c1999-2016 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm)
13. VOJTA, Jiří, Adéla MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, Martin FRANC, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy*. 2014, **108**(2), 127-134. ISSN 1213-7103.
14. Kapalinová chromatografie. In: *Univerzitní informační systém MENDELU: Elektronické studijní materiály* [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně [cit. 2017-08-19]. Dostupné z: [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=52970](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970)
15. Schematic illustration of DAD optical system. In: *Hitachi High-Technologies GLOBAL* [online]. Hitachi High-Technologies Corporation [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>
16. HARTL, Jiří a Karel PALÁT. *Farmaceutická chemie*. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4619-8.
17. DOHNAL, Jiří. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 978-80-7305-056-6.
18. Preparation of Supramolecular Complexes with Cyclodextrin. *HARADA GROUP., OSAKA UNIVERSITY* [online]. Toyonaka: Osaka University [cit. 2017-08-14]. Dostupné z: <http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/harada/eng/research/01.html>

19. DOUŠA, Michal. Chirální crownetherové selektory CSPs. In: *HPLC.CZ* [online]. c1999-2016 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/chiral/index.htm>
20. DOUŠA, Michal. Definice: Konfirmace – Kvalifikace – Validace. *HPLC.CZ* [online]. c1999-2016 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
21. DOUŠA, Michal. Přesnost metody. In: *HPLC.CZ* [online]. c1999-2016 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Validace/program\\_validace.htm#\\_3.1\\_Presnost\\_metody](http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.1_Presnost_metody)
22. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Guideline on bioanalytical method validation* [online]. London: European Medicines Agency, 2015 [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document\\_detail.jsp?webContentId=WC500109686%26mid=WC0b01ac058009a3dc](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500109686%26mid=WC0b01ac058009a3dc)
23. HANSEN, Steen a Stig PEDERSEN-BJERGAARD, ed. *Bioanalysis of Pharmaceuticals*. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 2015. ISBN 11-1871682-5.
24. SPME (Solid Phase Micro Extraction). In: *Labicom* [online]. Olomouc: LABICOM, c2017 [cit. 2017-08-22]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spme>
25. Acidum tiaprofenicum. *Český lékopis 2017*. 1. Praha: Grada, 2017, s. 1083-1085. ISBN 978-80-271-0500-7.
26. Tiaprofenic Acid. *PubChem Compound Database* [online]. Bethesda MD: U.S. National Library of Medicine [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tiaprofenic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tiaprofenic_acid)

27. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, c2010 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>
28. Souhrn údajů o přípravku: Surgam Léčiva 300 mg tablety. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, c2010, 2016 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0226695&tab=texts>
29. Tiaprofenic acid. *Drugbank* [online]. [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01600>
30. MALÁTKOVÁ, Petra, Adam SKARKA, Kateřina MUSILOVÁ a Vladimír WSÓL. Reductive metabolism of tiaprofenic acid by the human liver and recombinant carbonyl reducing enzymes. *Chem.-Biol. Interact.* 2017, **276**, 121-126. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.03.006. ISBN 10.1016/j.cbi.2017.03.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717303034>
31. DAVIES, Neal M. Clinical Pharmacokinetics of Tiaprofenic Acid and its Enantiomers. *Clin. Pharmacokinet.* 1996, **31**(5), 331 -347. DOI: 10.2165/00003088-199631050-00002. ISBN 10.2165/00003088-199631050-00002. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-199631050-00002>
32. SINGH, Nikhilesh N., Fakhreddin JAMALI, Franco M. PASUTTO, Anthony S. RUSSELL, Ronald T. COUTTS a Keith S. DRADER. Pharmacokinetics of the Enantiomers of Tiaprofenic Acid in Humans. *J. Pharm. Sci.* 1986, **75**(5), 439-442. DOI: 10.1002/jps.2600750503. ISBN 10.1002/jps.2600750503. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915471023>
33. VAN OVERBEKE, A., W. BAEYENS a C. DEWAELE. Comparative Study on the Enantiomeric Separation of Several Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Two Cellulose-Based Chiral Stationary Phases. *J. Liq. Chromatogr.* 1995, **18**(12), 2427–2443. DOI: 10.1080/10826079508013972. ISBN

10.1080/10826079508013972. Dostupné také z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079508013972>

34. VAN OVERBEKE, A., W. BAEYENS, H. ODA a H. Y. ABOUL-ENEIN. Direct enantiomeric HPLC separation of several 2-arylpropionic acids, barbituric acids and benzodiazepines on chiralcel OJ-R chiral stationary phase. *Chromatographia*. 1996, **43**(11-12), 599-606. DOI: 10.1007/BF02292974. ISSN 0009-5893. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02292974>

35. SOCHOR, J., J. KLIMEŠ, J. SEDLÁČEK, B. SOMOLÍKOVÁ a D. SLOVENČÍK. HPLC analysis of tiaprofenic acid in the samples of whole blood using L-L and S-L extractions. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2000, **23**(20), 3191-3201. DOI: 10.1081/JLC-100102378. ISSN 1082-6076. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-100102378>

36. SMET, Els, Ludo STAELENS, Yvan VANDER HEYDEN, Willy R.G. BAEYENS, Hassan Y. ABOUL-ENEIN, Guido VAN DER WEKEN a Ana M. GARCÍA-CAMPAÑA. Optimization of the chiral separation of some 2-arylpropionic acids on an avidin column by modeling a combined response. *Chirality*. 2001, **13**(9), 556-567. DOI: 10.1002/chir.1177. ISSN 08990042. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chir.1177>

37. ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Chiral separation of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on tartardiamide DMB chiral stationary phase by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2003, **26**(6-7), 521-524. DOI: 10.1002/jssc.200390070. ISSN 1615-9306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200390070>

38. GHANEM, Ashraf et al. Direct enantioselective HPLC monitoring of lipase-catalyzed kinetic resolution of tiaprofenic acid in nonstandard HPLC organic solvents. *Chirality*. 2008, **20**(8), 871-877. DOI: 10.1002/chir.20533. ISSN 08990042. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chir.20533>

39. CHAYEH, Rymguelmami, M. Ben SALAH a Chemli RACHID. Kinetic Study of Degradation of Tiaprofenic Acid by HPLC. *Asian J. Chem.* 2009, **21**(4), 3094-3098.
40. SULTANA, Najma, M. Saeed ARAYNE a Waseem SHAHZAD. Simultaneous Determination of Ceftriaxone Sodium and Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Pharmaceutical Formulations and Human Serum by RP-HPLC. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)*. 2010, **57**(6), 1278-1285. DOI: 10.1002/jccs.201000189. ISBN 10.1002/jccs.201000189. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jccs.201000189>
41. NAWAZ, Muhammad. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human serum by reversed phase high performance liquid chromatography. *Quím. Nova.* 2012, **35**(5), 939-943. DOI: 10.1590/S0100-40422012000500014. ISSN 0100-4042.
42. GERYK, Radim, Květa KALÍKOVÁ, Jiří VOZKA, Denisa PLECITÁ, Martin G. SCHMID a Eva TESAŘOVÁ. Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode. *J. Chromatogr. A.* 2014, **1363**, 155-161. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.040. ISBN 10.1016/j.chroma.2014.06.040. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314009649>
43. KALÍKOVÁ, Květa, Radim GERYK, Jiří VOZKA a Eva TESAŘOVÁ. Evaluation of differences between Chiralpak IA and Chiralpak AD-RH amylose-based chiral stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2015, **38**(5), 711-719. DOI: 10.1002/jssc.201401002. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201401002>