

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy



**SEPARÁCIA ENANTIOMÉROV LIEČIV A ICH  
METABOLITOV CHROMATOGRFICKÝMI  
METÓDAMI II**

Bakalárska práca

Natália Verešpejová

Vedúci bakalárskej práce: Prof. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

V Hradci Králové 2019

**Prehlásenie autora:**

„Čestne vyhlasujem, že som túto bakalársku prácu spracovala samostatne na základe získaných teoretických vedomostí a že všetku použitú literatúru a ďalšie pramene som v bakalárskej práci citovala.“

V Hradci Králové,

Natália Verešpejová

## **Pod'akovanie**

Ďakujem všetkým, ktorý mi pri tvorbe a spracovávaní tejto bakalárskej práce pomáhali. Predovšetkým ďakujem svojmu školiteľovi Prof. PharmDr. Milanovi Nobilisovi, CSc. za jeho cenné rady, trpezlivosť a ochotu, ktorú mi v priebehu spracovávania bakalárskej práce venoval.

## Abstrakt

Tramadol je centrálné pôsobiace opioidné analgetikum, ktoré je v pečeni pomocou enzýmu CYP2D6 premenené na účinnú látku *O*-demetyltramadol, zodpovednú za vznik opioidnej analgérie. V terapii je užívaný ako racemát. Chovanie každého enantioméru je odlišné: (-)-tramadol inhibuje spätné vychytávanie noradrenalínu a (+)-tramadol, ktorý je terapeuticky účinnejší inhibuje spätné vychytávanie serotonínu. Je indikovaný k liečbe slabej, až stredne silnej bolesti.

Táto práca sa zaoberá možnosťami stanovenia liečiva tramadol a jeho hlavného metabolitu v plazme pomocou chromatografických metód, ktoré v súčasnosti patria medzi moderné a progresívne separačné metódy. S využitím chirálnej HPLC analýzy s rôznymi typmi detekcie bolo liečivo stanovené s vysokou citlivosťou a selektivitou. Jednotlivé publikácie poskytujú farmakokinetické dáta tramadolu a jeho metabolitu po orálnom podaní jednorazovej dávky liečiva zdravým dobrovoľníkom. Stanovenia sa líšia chromatografickými podmienkami, spôsobom úpravy vzoriek, použitými chemikáliami a hlavne celkovým časom analýzy. Výsledky sú uvedené a porovnané v súhrnnej tabuľke.

## **Abstract**

Tramadol is centrally acting opioid analgesic drug. It is converted in liver by the enzyme CYP2D6 into active substance *O*-desmethyltramadol, responsible for analgesia. In clinical practise it is used as racemate. Each enantiomer displays different properties: (-)-tramadol inhibits noradrenaline reuptake and (+)-tramadol, which is therapeutically more effective, inhibits serotonin reuptake. It is indicated for the treatment of mild to moderate pain.

This Bachelor's thesis deals with possibilities of determination of drug tramadol and its main metabolite in plasma by chromatographic separation methods, which are currently modern and progressive. Using chiral HPLC analysis with different types of detection, the drug was determined with high sensitivity and selectivity. Individual publications provide pharmacokinetic data of tramadol and its metabolite after oral administration of a single dose of drug to healthy volunteers. The determinations differ by chromatographic conditions, sample preparation, chemicals used and mainly total time of analysis. The results are stated and compared in the summary table.

## Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cieľ práce .....	9
3	Teoretická časť .....	10
3.1	Analgetiká .....	10
3.1.1	Opioidné analgetiká .....	10
3.2	Tramadol .....	12
3.2.1	Štruktúra a mechanizmus účinku .....	12
3.2.2	Farmakokinetické vlastnosti .....	13
3.2.3	Kontraindikácie .....	14
3.2.4	Klinické použitie .....	14
3.3	Chiralita .....	15
3.3.1	Základné pojmy súvisiace s chiralitou .....	15
3.4	Chromatografia .....	17
3.4.1	Základné chromatografické pojmy .....	17
3.4.2	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) .....	18
3.4.3	Inštrumentácia v HPLC .....	19
3.4.4	Vybrané detektory v HPLC .....	22
3.4.5	Chirálna separácia v HPLC .....	25
4	Analytická časť .....	30
4.1	Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC s fluorescenčnou detekciou ...	30
4.1.1	Príprava vzoriek .....	30
4.1.2	Chromatografické podmienky .....	31
4.1.3	Výsledky .....	31
4.2	Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC-DAD .....	35
4.2.1	Príprava vzoriek .....	35
4.2.2	Chromatografické podmienky .....	35
4.2.3	Výsledky .....	36
4.2.4	Stanovenie tramadolu pomocou HPLC-DAD s online úpravou vzoriek pomocou MIP v monolitckej kolóne .....	37
4.2.5	Spojenie monolitckej kolóny s HPLC systémom .....	37
4.2.6	Chromatografické podmienky .....	38
4.2.7	Postup extrakcie vzoriek ľudskej plazmy a moču .....	38
4.2.8	Výsledky .....	39
4.3	Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC s hmotnostnou detekciou .....	40

4.3.1	Príprava vzorky .....	40
4.3.2	Chromatografické podmienky .....	41
4.3.3	Výsledky .....	41
4.4	Zhrnutie .....	42
5	Diskusie .....	44
6	Záver .....	47
7	Zoznam skratiek .....	48
8	Zoznam obrázkov .....	50
9	Zoznam tabuliek .....	50
10	Zoznam citovanej literatúry .....	51

# 1 Úvod

Liečivo tramadol je stredne silné opioidné analgetikum, ktoré bolo prvý krát syntetizované v roku 1962. Vo svojej molekule obsahuje dve chirálne centrá, vďaka ktorým vznikajú štyri stereoizoméry. Tramadol je podávaný vo forme racemickej zmesi. Po perorálnej aplikácii podlieha metabolizmu v pečeni, po ktorom vznikajú konjugované a nekonjugované metabolity. Vzniká hlavný metabolit *O*-demetyltramadol, ktorý je zároveň zodpovedný za vznik opioidnej analgérie. Tramadol spolu s jeho hlavným metabolitom je preukázateľný v krvi.

Keďže ide o chirálnu zlúčeninu stanovenie pomocou achirálnych analytických metód nie je uskutočniteľné. Chirálna chromatografia umožňuje rozlíšenie jednotlivých optických izomérov, ktoré sa odlišujú biologickým aj farmakologickým účinkom. V tejto práci sú spracované stanovenia tramadolu chirálnymi HPLC metódami s rôznymi spôsobmi detekcie.



## **2 Cieľ práce**

Hlavným cieľom práce bolo nájsť a usporiadať informácie o liečive tramadol, popísať jeho štruktúru, metabolizmus a mechanizmus účinku. Následne spracovať chromatografické metódy a možnosti stanovenia liečiva a jeho hlavného metabolitu pomocou týchto metód.

## 3 Teoretická časť

### 3.1 Analgetiká

Medzi analgetiká patria látky, ktoré tlmia vnímanie bolesti a vedú k pocitu bez bolesti, tj. k analgézi. Pomenovanie je odvodené z gréckeho *an* (bez) a *algia* (bolesť). Ide o látky symptomatické, teda také, ktoré neodstraňujú vlastnú príčinu bolesti. Podľa typu účinku ich delíme do dvoch veľkých skupín na:

- a) neopioidné - analgetiká antipyretika a nesteroidné antireumatika,
- b) opioidné - analgetiká anodyna.

Pre opioidné analgetiká sa užíva ďalšie rozdelenie na silné (morfín) a slabé (tramadol, kodeín). Dôležité je rozlíšenie pojmov opioid a opiát. Termín opioid sa používa pri liekoch, ktoré sa viažu na všetky tri skupiny opioidných receptorov a termín opiát sa vzťahuje na látky získané z ópia (morfín, kodeín). Opioidy podliehajú predpisom o manipulácii s omamnými a psychotropnými látkami. [1] [2]

#### 3.1.1 Opioidné analgetiká

Vnímanie bolesti je možné znížiť pomocou niekoľkých spôsobov. Používaná je celková anestézia, ktorá vyradí celý centrálny nervový systém (CNS), alebo lokálna anestézia, ktorá preruší vedenie bolestivého podnetu v aferentnom vlákne a tým bráni vnímaniu bolesti priamo a iba v mieste aplikácie. Analgetiká opioidné pôsobia hlavne v CNS, kde dochádza k prevodu a obmene bolestivých impulzov. Hovoríme o mieche, thalame, hypothalame, retikulárnej formácii a mozgovej kôre. Tieto miesta sú bohaté zásobené neurónmi s endogénnymi opioidnými peptidmi. Tie vznikajú z rozdielnych prekursorov v nervovom tkanive a v tele pôsobia ako neuromodulátory, ktoré modifikujú účinok iných neurotransmitérov v CNS. Dochádza k zmene elektrických vlastností cieľových vlastností a tým je obmedzená ich excitácia. Vďaka tejto modulácii môžu opioidné peptidy okrem iných funkcií aj indukovať úľavu od bolesti a eufóriu. Radíme sem enkefalíny, endorfíny a dynorfíny. Vyskytujú sa aj mimo CNS spolu s inými očakávanými neurotransmitermi peptidovej aj nepeptidovej povahy. Spolu s peptidmi sa na týchto miestach vyskytujú špecifické receptory, na ktoré sa viažu nielen endogénne peptidy, ale aj exogénne podávané opioidné analgetiká. Analgetiká anodyna už v malých dávkach znižujú vnímanie bolesti, bez výrazného ovplyvnenia iných funkcií nervového systému a tým sa líšia od celkových anestetík, ktoré spôsobujú silnejší útlm CNS s reverzibilným potlačením vedomia. [1] [3] [4]

### 3.1.1.1 Receptory pre opioidy

Farmakologicky rozoznávame 3 typy opioidných receptorov:  $\mu$  (mí),  $\kappa$  (kappa) a  $\delta$  (delta). Delenie je založené na behaviorálnom a neurofyziologickom pozorovaní. Prvý dôkaz o ich existencii a úlohe pri bolesti a analgézii bol poskytnutý v roku 1976 u modelu chronického zranenia. Receptory boli pomenované po prototypoch liečiv použitých v prvých štúdiách. Mí receptor pre morfin a kappa receptor pre ketazocyn(e) Počas farmakologickej analýzy opioidných peptidov na semenovodoch laboratórnej myši bol objavený tretí typ receptorov, delta receptory (od vas deferens). Stav analgézie súvisí s aktiváciou mí a kappa receptorov. Všetky typy týchto receptorov sú prítomné na zakončeniach, kde ich pôsobením dochádza k zníženiu uvoľňovania acetylcholínu, GABA, noradrenalínu, ale aj excitačných neurotransmitérov, alebo substancie P. Tvar a väzbové miesta týchto receptorov sú odvodené zo štruktúr používaných silných analgetík, prírodných aj syntetických. Morfin spolu s jeho derivátmi vytvárajú s receptormi 3 typy väzieb: van der Walsové sily, vodíkové mostíky a iónové väzby. Opioidné receptory sa vo vysokých koncentráciách nachádzajú na nervových spojeniach dráhy bolesti. Sú tiež prítomné v limbickom systéme a ich ovplyvnenie v tejto oblasti vedie k zníženému vnímaniu bolestivých podnetov. Pomocou tohto mechanizmu môže byť podmienený aj euforizačný účinok opiátov. Účasť receptorov pre opioidy je preukázaná pri sprostredkovaní antitusických účinkoch, ale aj niektorých nežiadúcich účinkoch ako nauzea, alebo zvracanie. Látky ovplyvňujúce receptory podľa afinity k ich podtypom a podľa vnútornej aktivity receptorov delíme do štyroch skupín. [1] [5]

- a) Agonisti - sú charakteristický afinitou ku všetkým trom receptorom aj s vnútornou aktivitou. Predstaviteľmi sú morfin, tramadol, alebo fentanyl.
- b) Parciálny agonisti - pre nich je typická vysoká afinita k  $\mu$  receptrou a nižšia vnútorná aktivita. Napr. buprenorfin.
- c) Agonisti – antagonisti - chovajú aktivitu k  $\delta$  a  $\kappa$  receptoru. Vnútornú aktivitu vykazujú iba k receptoru  $\delta$ .
- d) Antagonisti - s afinitou ku receptorom  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\delta$ , ale bez vnútornej aktivity. Do tejto skupiny zaradujeme naloxon. [1] [6]

### 3.1.1.2 Nežiadúce účinky

Opiáty vyvolávajú množstvo vedľajších nežiadúcich účinkov, ktoré sú väčšinou vyvolané pôsobením na špecifické opioidné receptory. Patria sem hlavne útlmy dýchacieho centra, zvracanie, zápcha nauzea, závrate, zhoršenie nálady, svrbenie, sucho

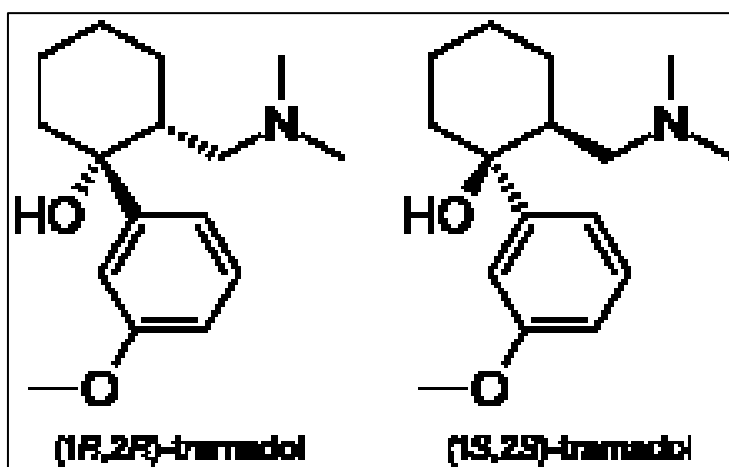
v ústach, bolesti brucha, poruchy trávenia, ospalosť a bolesti hlavy. K zosilneniu vnímania bolesti môže dôjsť po vyprchaní účinku liečiva. Opatrnosť je nevyhnutná hlavne u pacientov so zníženou respiračnou rezervou a u anesteziovaných pacientov, kde opioidy vyvolávajú astmatické záchvaty. Možný je aj výskyt alergických reakcií. [1] [6]

## 3.2 Tramadol

Liečivo tramadol bolo prvýkrát syntetizované pomocou Grignardovej reakcie v roku 1962 nemeckou firmou Grünenth GmbH špecializovanú na liečbu bolesti. Liek bol v Nemecku testovaný 15 rokov, než mohol byť v roku 1977 uvedený na zahraničný trh pod názvom Tramal. V roku 1955 bol schválený americkým úradom pre potraviny a liečivá (FDA, Food and Drug Administration). [7] [8] [9]

### 3.2.1 Štruktúra a mechanizmus účinku

Tramadol( $\pm$ )-*trans*-2-[(dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyfenyl)-cyklohexanol je centrálne pôsobiace, stredne silné opioidné analgetikum, ktorého analgetické, ale aj nežiadúce účinky sú podobné opioidom. Ide o syntetický analóg morfinu. Účinnosť je uvádzaná medzi 1/10 až 1/6 účinku morfinu. Je to jeden z derivátov 3-fenylpropylamínu, ktorý vzniká otvorením piperidinového cyklu. Súčasťou spojovacieho reťazca medzi aromatickou časťou molekuly a zásaditým dusíkom je u tramadolu cyklohexánový substituovaný kruh. Ten je príčinou existencie optických a geometrických izomérov. Vo svojej molekule obsahuje dve chirálne centrá, ktoré umožňujú vznik štyrom stereoizomérom: (1R,2R), (1S,2S), (1R,2S) a (1S,2R). V terapii existuje ako racemická zmes *trans* izoméru s dôležitými rozdielmi v aktivite, väzbe a metabolizme, ktoré súvisia s prítomnosťou dvoch izomérov. [8] [9] [10]



Obr. 1 Vzorec R a S racemátu tramadolu.

Prevzaté z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Tramadol#/media/File:Tramadol\\_as\\_a\\_racemic\\_mixture.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Tramadol#/media/File:Tramadol_as_a_racemic_mixture.svg)

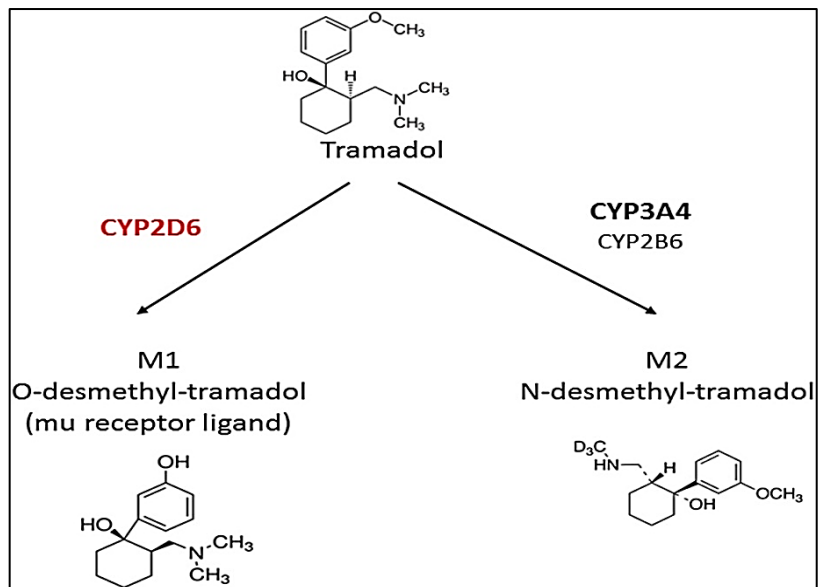
Napriek tomu, že mechanizmus účinku nie je úplne jasný, z pokusov je zrejmé, že sa uplatňujú najmenej dva komplementárne mechanizmy. Prvým je väzba materskej látky a *O*-demetylovaného metabolitu (M1, ODT) na  $\mu$  opioidné receptory, ku ktorým vykazuje vyššiu aktivitu oproti zostávajúcim dvom receptorom. Druhým neopiooidným mechanizmom je slabá inhibícia spätného vychytávania norepinefrínu a serotonínu, vďaka ktorej dochádza k aktivácii descendentných inhibičných dráh. Aktivita je výsledkom nízkej väzbovej afinity materskej zlúčeniny a vysokej afinity väzby *O*-demetylovaného metabolitu na opioidné  $\mu$  receptory. [11] [12]

### 3.2.2 Farmakokinetické vlastnosti

Tramadol je aplikovaný vo forme racemickej zmesi. Obe formy spolu s metabolitom M1 sú v krvi preukázateľné. Napriek rýchlemu vstrebávaniu po perorálnom podaní je jeho absorpcia pomalšia a biologický polčas dlhší, ako u paracetamolu. Racemický tramadol sa po perorálnej aplikácii vstrebáva veľmi rýchlo a takmer úplne. Biologická dostupnosť jednotlivej dávky je približne 75 % a po opakovanom podávaní dosahuje až 90 %. Kombináciou s paracetamolom je jeho absorpcia v tenkom čreve rýchlejšia a skoro kompletná. Podanie prípravku súčasne s jedlom neovplyvňuje maximálnu plazmatickú koncentráciu ani absorpciu. Má vysokú tkanivovú aktivitu a na proteíny plazmy sa viaže približne 20 % podobne ako paracetamol. *First-pass* efekt je maximálne 30 % po perorálnom podaní. [13]

Tramadol po perorálnom podaní podlieha extenzívnemu metabolizmu v pečeni. U človeka dochádza k vzniku 12 konjugovaných a 11 nekonjugovaných metabolitov. Približne 30 % dávky je vylúčené močom v nezmenenom stave a 60 % sa vylučuje vo forme metabolitov. Dochádza k *O*-demetylácii katalyzátorom je enzým CYP2D6) na M1 metabolity a *N*-demetylácii (katalyzátorom a enzým CYP3A) na metabolity M2. (viz obr. 2) *O*-demetyláciou v pečeni vzniká *O*-demetyltramadol (ODT), ktorý je zároveň najefektívnejším metabolitom a je zodpovedný za vznik opioidnej analgézie. Následne vznikajú tri sekundárne metabolity: *N,N*-didemetyltramadol, *N,N,O*-tridemetyl-tramadol a *N,O*-demetyltramadol. Všetky metabolity sú nakoniec konjugované s kyselinou glukurónovou a sulfátom pred ich vylúčením močou. [9] [12] [14]

Eliminačný polčas metabolitu M1 je 7 hodín. Jeho plazmatická koncentrácia je niekoľkonásobne nižšia ako koncentrácia tramadolu a ich podiel na klinickom účinku sa ani po opakovanom podávaní nemení. [13]



Obr. 2 Hlavné metabolity tramadolu.

Prevzaté z: [https://www.frontiersin.org/files/Articles/331866/fphar-09-00148-HTML/image\\_m/fphar-09-00148-g001.jpg](https://www.frontiersin.org/files/Articles/331866/fphar-09-00148-HTML/image_m/fphar-09-00148-g001.jpg)

### 3.2.3 Kontraindikácie

Užívanie tramadolu sa nedoporučuje ľuďom s deficitom CYP2D6 enzýmu, ktorý fyziologicky tvorí 2 % z cytochrómu P450. Je to označenie pre veľkú skupinu enzýmov, ktoré vo svojej molekule obsahujú hem. CYP2D6 je popisovaný hlavne v pečeni, mozgu a v nízkej koncentrácii aj v pľúcach. Jeho genetický polymorfizmus, inhibícia a indukcia môže ovplyvniť farmakokinetiku materského liečiva aj jeho účinného metabolitu. Rizikovou skupinou sú pacienti s ochoreniami pečene, alebo obličiek, keďže ide o miesta kde prebieha metabolizmus a eliminácia liečiva. [15] [16]

Na optimalizáciu kontroly bolesti a minimalizáciu vedľajších nežiadúcich účinkov sú opioidy kombinované s neopioidnými analgetikami, ktoré pôsobia odlišným mechanizmom a preto poskytujú aditívny, alebo synergický účinok. Kombinácia tramadolu s acetaminofénom poskytuje rýchly a dlhotrvajúci analgetický efekt pri chronických bolestiach chrbta, ktorý je výsledkom synergetickej aktivity oboch liečiv. [9]

### 3.2.4 Klinické použitie

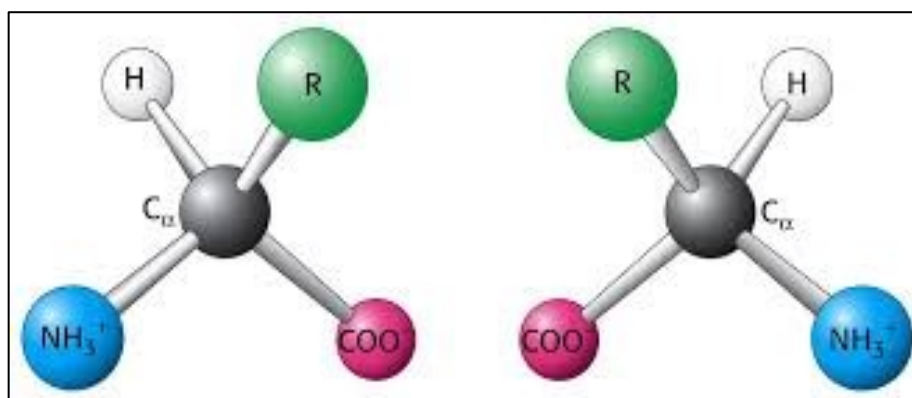
Je indikovaný k liečbe slabej až stredne silnej bolesti, akútnej, aj chronickej. Užíva sa u stavov pooperačných, rakoviny, ako dentálna liečba a proti bolestiam svalov. U pacientov s osteoartritídou sa pridáva ako adjuvant k NSAID (nesteroidné protizápalové látky) terapii. Zdokumentovaná bola tiež liečba úzkosti a depresie. [9] [16]

Hlavnou výhodou je nízke riziko vzniku závislosti, dobrá biologická dostupnosť

po perorálnej aplikácii a vysoký počet liekových foriem. Podáva sa vo forme kvapiek, tabliet, čapíkov, toboliek a tiež injekčného roztoku. U tramadolu nedochádza v útlmu dýchacieho centra a nespôsobuje zápchu. Pri chronickom podávaní tramadolu vzniká stav imunitnej tolerancie, na rozdiel od ostatných opioidov, kde je možné zlepšenie funkcie imunitného systému. Analgetický účinok môžeme zvýšiť kombináciou s paracetamolom. [16]

### 3.3 Chiralita

Chiralita je geometrická vlastnosť tuhého predmetu (alebo priestorové usporiadanie atómov), ktorý je na svojom zrkadlovom obraze neprekrývateľný. Takýto objekt nemá žiadne prvky symetrie. Nie je symetrický v zrkadlovej rovine, v strede inverzie ani na rotačne-reflexnej ose. Príkladom chirálnych zlúčenín sú aminokyseliny. Ak je objekt na svojom zrkadlovom obraze prekrývateľný, je popisovaný ako achirálny. [17] [18]



Obr. 3 Všeobecný vzorec aminokyselín.

Prevzaté z:

<https://is.muni.cz/el/1411/podzim2013/BLLC0111p/um/Aminokyseliny.pdf>

#### 3.3.1 Základné pojmy súvisiace s chiralitou

Látky s rovnakým zložením, ale odlišnými vlastnosťami sa nazývajú izoméry. Látky (molekuly) so zhodným sumárnym a konštitučným vzorcom, ktoré sa líšia priestorovým usporiadaním na jednom, alebo viacerých stereogénnych (chirálnych) centrách sú nazývané stereoizoméry. Existujú dve dôležité triedy stereoizomérov: enantioméry a diastereoizoméry. Enantioméry sa vyskytujú vždy v pároch, ktoré majú pri symetrických podmienkach rovnaké chemické a fyzikálne vlastnosti. Enantioméry stáčajú rovinu polarizovaného svetla, ktoré prechádza vzorkou. Ak je rovina stáčaná

v smere hodinových ručičiek je enantiomér označený ako (+) a ak je stáčaná v proti smere hodinových ručičiek označujeme ho (-). Absolútna konfigurácia v priestore je na chirálnych centrách označovaná ako *R* (rectus-pravý) a *S* (sinister-ľavý). Diastereoizoméry sú stereoizoméry, ktoré si nie sú zrkadlovými obrazmi. Ide o zlúčeniny s dvoma centrami chiralít, ktoré sa líšia iba v jednom z nich. Sú to látky s rozdielnymi chemickými vlastnosťami a preto je možná ich separácia za achirálných podmienok. Všeobecne platí, že zlúčenina, ktorá má vo svojej molekule  $n$  počet centier chiralít, môže existovať v  $2^n$  priestorových izoméroch. Tiež platí, že má  $2^{n-1}$  možných párov enantiomérov a racemátov. Ak máme látku s dvoma chirálnymi centrami, vytvárajú štyri diastereoizoméry, dve dvojice racemátov a dve dvojice enantiomérov. Chirálné látky existujú vo dvoch enantiomérnych formách. Ak táto látka obsahuje ekvimolárne množstvo enantiomérnych molekúl, potom ju nazývame racemát. Racemát spolu s oboma enantiomérmi sú chirálne látky. Ak chceme hovoriť iba o samostatných enantioméroch, lepšie je používať termín chirálne neracemické zlúčeniny. [17] [19] [20]



### 3.4 Chromatografia

Chromatografia patrí do širokej škály fyzikálne-chemických metód, ktoré slúžia k oddeľovaniu a analýze komplexných zlúčenín. Ide o proces, pri ktorom sa analyzovaná látka nesená kvapalinou, alebo plynom rozdeľuje na jednotlivé zložky v dôsledku rozdielnej distribúcie počas prúdenia cez stacionárnu (kvapalnú, alebo pevnú) fázu. Slovo chromatografia je doslovne preložené z gréckych koreňov *Chroma* a *Graphein*. Znamená farbu a kreslenie. Prvým objaviteľom bol ruský botanik Michail Tswett, ktorému sa v roku 1903 podarilo vytvoriť farebnú separáciu rastlinných pigmentov pomocou sklenenej trubice s práškovým uhličitanom vápenatým. Napriek tomu, že už farba nezohráva hlavnú úlohu, jej princípy sa nezmenili a vyvinula sa natoľko, že je dnes nenahraditeľným laboratórnym nástrojom na identifikáciu a separáciu zlúčenín a tvorí podstatnú časť inštrumentálnej analytickej chémie. [21]

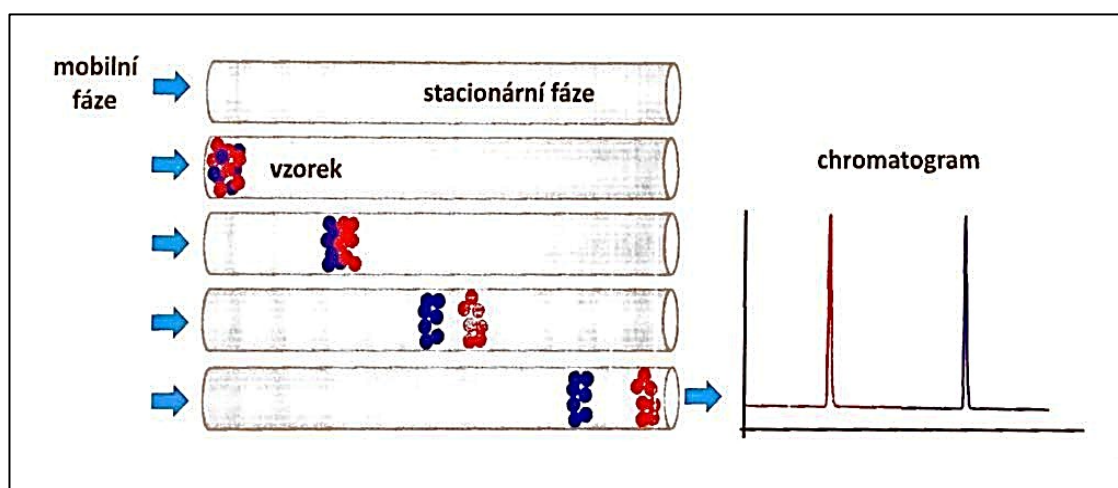
#### 3.4.1 Základné chromatografické pojmy

Chromatografia, alebo chromatografické metódy patria medzi metódy separačné. Sú založené na rozdielnom delení minimálne dvoch látok v zmesi medzi dve rôzne a navzájom nemiešateľné fázy. Stacionárnu, teda nepohyblivú a mobilnú, pohyblivú. Podľa skupenstva mobilnej fázy máme základné rozdelenie chromatografie na kvapalinovú (LC) a plynnú (GC). V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina, ktorej tok je hybnou silou systému. Stacionárna fáza je tvorená veľmi malými časticami pevnej fázy, alebo môže ísť o tenký film kvapaliny nanosený na kapiláre. Kvôli jednoduchosti je pre stacionárnu fázu zavedený termín sorbent. Sorbent má schopnosť zadržiavať jednotlivé zložky v analyzovanej zmesi zatiaľ čo mobilná fáza ich vymýva (eluje) v smere toku kvapaliny rôznou rýchlosťou, čím dôjde k ich oddeleniu. Delenie látok závisí aj na brzdiacej sile so selektívnym pôsobením: jedna z látok je brzdená viac, iná menej. Počas chromatografického procesu opakovane dochádza k ustáľovaniu dynamickej rovnováhy delených látok medzi sorpciou na stacionárnej fáze a desorpciou do mobilnej fázy. V ideálnom prípade sa systém môže blížiť tejto rovnováhe. Distribúciu jednotlivých zložiek medzi tieto dve fázy popisujeme distribučnou konštantou. Čím je jej hodnota vyššia, tým dlhšie sú zadržiavané molekuly látky na stacionárnej fáze. S rastúcou hodnotou distribučnej konštanty sa zväčšuje aj retencia molekúl, čo vedie k pomalšiemu pohybu chromatografickým systémom. [22] [23]

$$K_D = \frac{(C_i)_s}{(C_i)_m} = \frac{(n)_s \cdot V_m}{(n)_m \cdot V_s}$$

$(C_i)_s$  = koncentrácia analytu v stacionárnej fázy,  $(c_i)_m$  = koncentrácia analytu v mobilnej fázy,  $V_m$  = objem mobilnej fázy,  $V_s$  = objem stacionárnej fázy. [22] [24]

Separácia zložiek zmesi je ovplyvnená nielen stacionárnou, ale aj mobilnou fázou použitím isokratickej (mobilná fáza o konštantnom zložení), alebo grandientovej elúcie (zloženie sa mení v prospech silnejšej elučnej zložky). Po výstupe analytov z kolóny je meraný signál vystupujúci z detektoru prevádzaný do podoby chromatogra-fického záznamu tzv. chromatogramu. Chromatogram je charakteristický píkmi. V ideálnom prípade ide o krivky gaussovského tvaru. [22] [23]



Obr. 4 Separácia zmesi v chromatografickom systéme.

Prevzaté z: Nováková, L. et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Europrint a.s., 2013. 1 11 ISBN 978-80-260-4243-3.

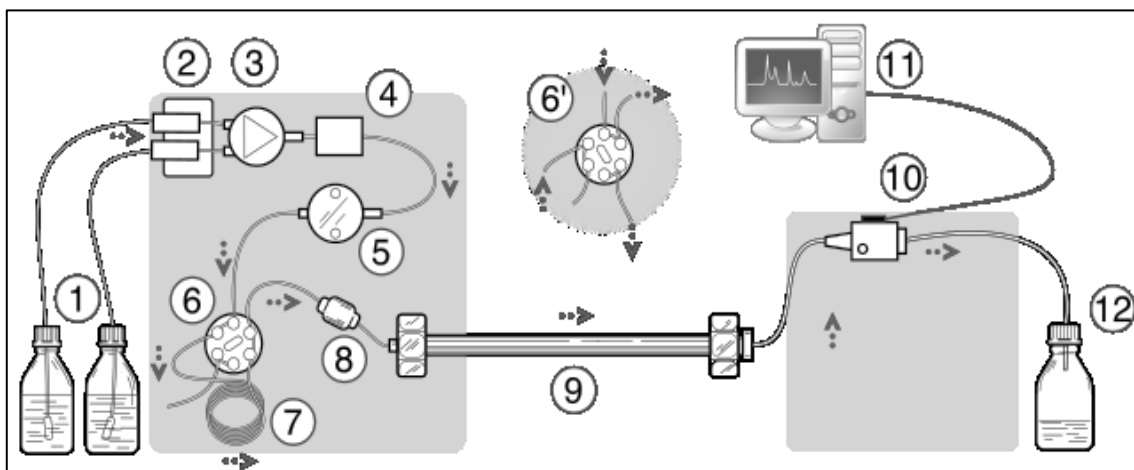
Najčastejším a najuniverzálnejším usporiadaním kvapalinovej chromatografie je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC, *High performance liquid chromatography*). [23]

### 3.4.2 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Ide o univerzálnu techniku využívanú nielen k separácii, ale aj identifikácii a kvantitatívnej analýze. V tomto prípade usporiadania systému je kvapalina pomocou čerpadla privádzaná za vysokého tlaku, na rozdiel od klasickej kvapalinovej chromatografie, kde mobilná fáza preteká kolónou samospádom. Častice sú menšie a rovnomerne distribuované, čím je separačná účinnosť vyššia a účinná plocha väčšia. U HPLC je nevyhnutná prepracovaná inštrumentácia. [23]

### 3.4.3 Inštrumentácia v HPLC

Inštrumentácia, na ktorej sa vykonáva chromatografické meranie sa nazýva chromatograf. Kvapalinový chromatograf sa skladá zo zásobníkov mobilnej fázy (1), odplynovača mobilnej fázy (2), gradientového ventilu (3), zmiešavača mobilnej fázy (4), vysokotlakovej pumpy (5), šesťcestného ventilu (6, 6'), dávkovacej slučky (7), predkolóny (8), separačnej kolóny (9), detektoru (10), počítača (11) a nádoby na odpad (12) (viz obr. 4).



Obr. 5 Schéma systému HPLC.

Prevzaté z: [https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance\\_liquid\\_chromatography#/media/File:HPLC\\_apparatus.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography#/media/File:HPLC_apparatus.svg)

Systém HPLC môže mať niekoľko obmien, pomocou pridania, alebo odobratia niektorých komponentov. U izokraticej elúcie je mobilná fáza vedená rovno do vysokotlakového čerpadla. Pri gradientovej elúcii sú prúdy mobilnej fázy privádzané z dvoch, alebo aj viacerých zásobníkov a miešané v zmiešavači, ktorý je zaradený ešte pred vysokotlakovým čerpadlom. Mobilná fáza je ďalej vedená cez dávkovacie zariadenie do chromatografickej separačnej kolóny, ktorá je spojená priamo s detektorom, za ktorým môže byť zaradený zberač jednotlivých frakcií. [22]

#### 3.4.3.1 Zásobníky mobilnej fázy

Zásobníky sú súčasťou transportu mobilnej fázy spolu s odplynovačom, čerpadlom a zmiešavačom. Sú to väčšinou sklenené nádoby, ktoré majú uzáver s otvorom pre kapiláry. Koniec kapiláry, ktorý je ponorený do mobilnej fázy je pokrytý fritou, ktorá bráni prieniku pevných častíc do systému. Frity sú vyrábané z nerezovej ocele, alebo keramického materiálu a tiež slúžia ako závažie, aby kapilára siahala až na dno zásobníka. Dobré uzavretie je nutné, z dôvodu možného odtekania kvapaliny a zároveň, aby jej pary neunikali do okolia. Dôležité je aj zabránenie kontaminácie kvapaliny z vonkajšieho

prostredia (mikroorganizmy, prach). V zásobníkoch sú zároveň umiestnené špeciálne filtre na zachytenie rozptýlených tuhých častíc pred vstupom do HPLC systému. Spoje zásobníka sú vyrobené najčastejšie z nerezovej ocele, alebo teflónu. [23]

### 3.4.3.2 Odplynenie mobilnej fázy

Odplyňovač tzv. degasser slúži k odplyneniu mobilnej fázy. Odplynenie mobilnej fázy je nutné hlavne kvôli zmene tlaku pri výstupe kvapaliny z kolóny. V tomto mieste môže dochádzať k uvoľňovaniu bubliniek rozpustených plynov. Až 70 % problémov v chromatografickom systéme súvisí s mobilnou fázou. Pomocou odplynenia mobilnej fázy eliminujeme niekoľko problémov:

- a) nestabilitu základnej línie (*baseline*),
- b) nestabilitu čerpadiel,
- c) zlú opakovateľnosť dávkovania vzorky,
- d) zníženú citlivosť detekcie.

V súčasnosti sú používané dva princípy odplynenia. Najúčinnjším je prebublávanie pomocou hélia v zásobníkoch mobilnej fázy, kam prichádza priamo z tlakovej fľaše cez redukčný ventil, alebo vákuum. Vzhľadom na cenu hélia sa dáva prednosť druhému spôsobu, ktorý je oveľa rýchlejší. Ide o vákuový degasser, kde kvapalina prechádza cez polopriepustnú membránu kapiláry. Steny tejto kapiláry, ktorá je umiestnená vo vákuovej komore, prepúšťajú iba plyny. Kontinuálny prechod plynu cez stenu membrány zabezpečuje rozdiel tlakov vo vnútri kapiláry a v jej okolí. Zapojenie degassera v HPLC je v takom poradí, aby mobilná fáza prešla najprv ním a až potom pumpou. [22]

### 3.4.3.3 Vysokotlakové čerpadlá

Základnou a najdôležitejšou funkciou čerpadla, alebo tiež pumpy je zabezpečenie stabilného prietoku mobilnej fázy, pri požadovanom tlaku. Vysokotlakové čerpadlá sú rozdelené do dvoch skupín podľa princípu, na ktorom pracujú. Oba typy vytláčajú kvapalinu zo zásobníka piestom, alebo membránou. Pracujú pri konštantnom tlaku, alebo konštantnom objemovom prietoku. Hlavným rozdielom je spôsob, akým sa dosiahne pohyb piestu. Pri konštantnom objemovom prietoku sa využíva mechanický pohon a u konštantného tlaku, tlak plynu, alebo hydraulické kvapaliny. Na čerpadlá sú kladené vysoké nároky, aby výsledky ktoré poskytujú, boli čo najpresnejšie. [25]

#### **3.4.3.4 Dávkovanie vzorky**

Dávkovanie je v súčasnosti realizované použitím manuálneho slučkového dávkovača, ktorý funguje pomocou prepínacích ventilov a automatického dávkovača (autosampleru). V laboratóriách, kde sa spracováva veľké množstvo vzoriek je automatizácia dávkovacieho procesu základom. Autosampler umožňuje nástrek vzoriek bez prítomnosti operátora. Materiál, z ktorého je vyrobený, by mal byť odolný voči vysokým tlakom a chemicky inertný. V zásobníku vzoriek, ktorý je s automatickým dávkovačom spojený, sú umiestnené mikronádobky (vialky). Sú to sklenené, alebo plastové nádobky s objemom najčastejšie 2 ml a s viečkom obsahujúcim septum. Vialky sú v zásobníku umiestnené na očíslovaných pozíciách, vďaka čomu je možné automatické dávkovanie pomocou analytického softwaru. Základom autosampleru je vstrekovací viaccestný ventil. [26] [27]

#### **3.4.3.5 Kolóna**

Kolóna je časť systému, v ktorej dochádza k samotnej separácii jednotlivých zložiek zmesi. Každá kolóna pozostáva z dvoch častí: telo kolóny a 2 koncovky. Telo je rovná trubica s hladkým vnútorným povrchom. Funkciou koncovky je distribúcia mobilnej fázy a analytu rovnomerne celým prierezom a zaistenie tesnosti v oblasti vysokých tlakov používaných v HPLC. Priestor kolóny, ktorý je počas analýzy temperovaný tvorí stacionárna fáza. Na povrchu sa nachádza kovový plášť, ktorý zabezpečuje stabilitu stacionárnej fázy. Zároveň jeho vnútorný povrch musí byť hladký, chemicky inertný (odolný voči chemickému pôsobeniu mobilnej fázy) a musí odolávať vysokým tlakom, aj keď pracovný tlak na kolóne môže byť nižší. Kolóna je zakončená ochranným krúžkom a koncovou hlavicou, v ktorej je navrtaný vstup pre kapiláru. Kapiláry sa používajú k spojeniu kolóny s dávkovačom a s detektorom. Najčastejšie sú vyrobené z kovu, alebo polyetheretherketónu (PEEK). Spôsob distribúcie mobilnej fázy s analytom ovplyvňuje nielen účinnosť, ale aj rozlíšenie. [28]

#### **3.4.3.6 Detekčné systémy**

Po výstupe rozdelených zložiek analyzovanej vzorky z kolóny sú tieto zložky vedené do detektoru, ktorý je umiestnený za chromatografickou kolónou. Detektor zaznamenáva rozdiel signálu pri prechode čistej mobilnej fázy a prechode mobilnej fázy s analytom. Rozlišujeme detektory hmotnostné a koncentračné. Hmotnostné detektory zaznamenávajú zmenu hmotnostného toku separovanej zložky vzorky v mobilnej fáze. Koncentračné detektory reagujú na zmenu hmotnostnej koncentrácie zložky

analyzovanej vzorky v mobilnej fáze, nezávisle na rýchlosti jej prívodu do detektoru. Ďalej detektory delíme na deštrukčné a nedeštrukčné. V deštrukčných detektoroch dochádza k ireverzibilnej zmene detekovaného komponentu, zatiaľ čo v nedeštrukčných nedochádza k jeho chemickej zmene. Detektory v HPLC by mali spĺňať niekoľko vlastností:

- a) univerzálnosť (odozva pre všetky analyty),
- b) vysoká citlivosť, špecifickosť a lineárnosť,
- c) nedeštruktívnosť,
- d) ľahké použitie a spoľahlivosť,
- e) signál nezávislý na zmene teploty, prietoku a zložení mobilnej fázy. [0]

Všetky uvedené vlastnosti nemá a nemôže mať žiadny detektor. Najviac používané HPLC detektory však majú väčšinu z týchto vlastností. Najnáročnejšia je hlavne kombinácia univerzálnosti a špecifickosti. [22] [27]

### 3.4.4 Vybrané detektory v HPLC

Existujú štyri možnosti používané na detekciu v HPLC: detekcia univerzálnych vlastností, špecifických vlastností, zmeny mobilnej fázy a spojené techniky. Ich využitie v praxi nie je rovnomerné. Do začiatku 20. storočia jednoznačne prevažovala technika UV-VIS detekcie, ale dnes dochádza k výraznému nárastu detekcie pomocou hmotnostnej spektrometrie, na úkor nie len UV-VIS, ale aj fluorescenčnej detekcie. [29]

#### 3.4.4.1 Spektrofotometrické detektory

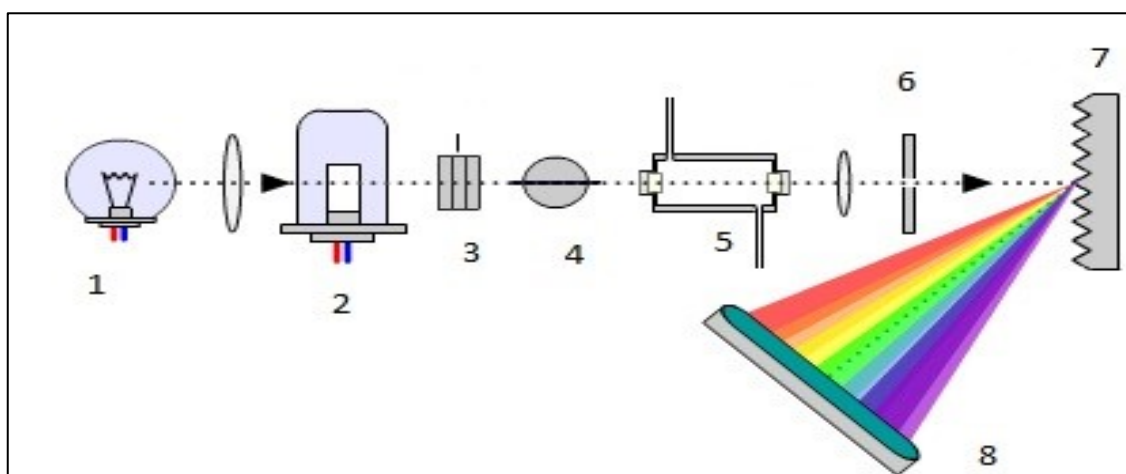
Spektrofotometrické, alebo UV-VIS detektory sú dnes najpoužívanejšími detektormi, keďže vysoký počet zlúčenín vykazuje absorpciu svetla v ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Ide o oblasť vlnových dĺžok od 190 do 800 nm. Kvantitatívne vyhodnocovanie je možné vďaka Lambert-Beerovmu zákonu:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon * b * c$$

A je veľkosť absorpcie vyjadrená ako absorbancia,  $I_0$  intenzita dopadajúceho a  $I$  intenzita prepusteného svetla.  $\epsilon$  je molárny absorpčný koeficient, ktorý je pre každú látku charakteristický,  $b$  vyjadruje dĺžku cely detektoru v cm a  $c$  je molárna koncentrácia absorbujúcej zložky. K zmene absorbancie dochádza pri zmene koncentrácie látok vo vzorke. Platnosť zákona je obmedzená, keďže zákon nezahŕňa vplyvy teploty, rozpúšťadla, ani vlnovej dĺžky. Na zabezpečenie správnej činnosti spektrofotometrických

detektorov je základom samotná cela detektoru. Optika cely smeruje paprsky svetla do stredu cely, kde je index lomu najmenší. Šírka cely zaistuje, aby sa využilo čo najviac energie, ktorá je nasmerovaná z detektoru do fotodetektoru. UV-VIS detektory sú rozdelené na štyri typy podľa ich konštrukčného usporiadania. Detektory s fixnou vlnovou dĺžkou, s meniacou vlnovou dĺžkou, s programovateľnou vlnovou dĺžkou a detektory s diódovým poľom. UV-VIS detektory s fixnou vlnovou dĺžkou používajú ako zdroj nízkotlakovú rtuťovú výbojku, sú jednoduché a lacné, najčastejšie s vlnovou dĺžkou 253,7 nm. Detektory s meniacou vlnovou dĺžkou obsahujú iba dopredu dané vlnové dĺžky. Vlnovú dĺžku je možné nastaviť u detektorov s programovateľnou vlnovou dĺžkou, najčastejšie od 190 do 700 nm. Meranie je uskutočniteľné pri dvoch až štyroch vlnových dĺžkach súčasne a vlnové dĺžky sa môžu meniť aj počas analýzy. [29] [30]

Detektory s diódovým poľom (DAD, PDA) snímajú celé spektrum bez prerušenia chromatografickej separácie v reálnom čase. Dráha svetla je podobná ako pri detektore s meniacou vlnovou dĺžkou, ale najprv prechádza mernou celou detektoru a až následne dopadá na holografickú mriežku, kde je spektrálne rozkladané. Na diódové pole dopadá tok žiarenia o určitej vlnovej dĺžke zoslabený absorpciou v cele detektora.



Obr. 6 Schéma PDA.

(1,2) zdroje žiarenia, (3) šošovka, (4) filter, (5) prietoková cela detektoru, (6) optická štrbina, (7) holografická mriežka, (8) diódové pole

Prevzaté z: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>

Každá z fotodiód je spojená s kondenzátorom, ktorý je dopredu nabitý na určitú hodnotu. Po dopade žiarenia na fotodiódu vzniká fotoelektrický prúd, ktorý kondenzátor vybíja. Vznikajúci fotoelektrický prúd je priamoúmerný intenzite dopadajúceho žiarenia. V ďalšom kroku dochádza k nabitíu jednotlivých kondenzátorov a meria sa prúd

potrebný na ich opätovné nabitie. Postupne sú zaznamenávané hodnoty absorpcie pri každej vlnovej dĺžke v každom okamihu. Spektrálne rozlíšenie závisí na počte diód v poli. Počet diód je 512, alebo 1024. PDA detektory sú schopné detekcie látok pri akejkol'vek vlnovej dĺžke, umožňujú porovnanie spektra s knižnicou spektier a vypočítavajú čistotu pík. [29] [30] [31]

#### **3.4.4.2 Fluorescenčné detektory**

Fluorescenčné detektory merajú sekundárne, emisné žiarenie, ktoré je uvoľňované látkou po absorpcii primárneho, excitačného elektromagnetického žiarenia. Absorpciou elektromagnetického žiarenia prechádzajú molekuly látok zo základného elektrónového stavu do excitovaného stavu. Čas trvania fotoluminiscencie je  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekundy. Detektory sú veľmi citlivé k prirodzene fluorescenčným zlúčeninám, ale aj k takým, ktoré sú derivatizáciou upravené, aby fluoreskovali. Zdrojom žiarenia sú rtuťové, alebo xenónové výbojky. Použitím monochromátora, ktorý sa nachádza medzi zdrojom svetla a celou detektoru, je možné nastavenie vlnovej dĺžky excitovaného aj emitovaného žiarenia. Tieto vlnové dĺžky možno programovať v priebehu elúcie pre dosiahnutie maximálnej citlivosti u separovaných látok. Fluorescenčné detektory sú vhodné na detekciu analytov s veľmi nízkymi koncentráciami, keďže sú niekoľkonásobne citlivejšie ako UV-VIS detektory. [29]

#### **3.4.4.3 Hmotnostné spektrometre**

Hmotnostné spektrometre (MS) patria v HPLC do skupiny spojených techník. Okrem údajov z chromatogramu poskytujú spektrálne údaje o identite látok. Sú vysoko špecifické a v súčasnosti patria medzi štandardné detektory pre bioanalytické aplikácie, potravinovú analýzu, alebo výskum a vývoj nových liekových štruktúr. Proces identifikácie a kvantifikácie látok prebieha v troch krokoch. Najprv dochádza k ionizácii vzorky, pri ktorej sú neutrálne molekuly prevedené na ióny v iónovom zdroji. Potom nasleduje rozdelenie iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja a k ich urýchleniu v analyzátoch. Posledným, tretím krokom je detekcia iónov a zosilnenie signálu v detektore. Ďalšími časťami prístroja sú vákuový systém, sonda na zavádzanie vzoriek, iónová optika a počítač so sofistikovaným softwarom pre zber a spracovávanie dát. [27] [32]

Ionizovať analyty môžeme širokým spektrom ionizačných techník, keďže žiadna z nich nie je univerzálna. Výber techniky závisí na tepelnej stabilite, molekulovej hmotnosti, polarite a prchavosti látok. Rozlišujeme mäkké a tvrdé ionizačné techniky. U mäkkých ionizačných techník vznikajú protónované, alebo deprotónované molekuly



a tak nedochádza k rozsiahlej fragmentácii ako u techník tvrdých. Najpoužívanejšie mäkké ionizačné techniky spojené s HPLC sú ionizácie za atmosferického tlaku (*atmospheric pressure ionization*, API) a zahŕňajú ionizáciu elektrosprejom (*electrospray ionization*, ESI), fotoionizáciu za atmosferického tlaku (*atmospheric pressure photoionization*, APPI) a chemickú ionizáciu za atmosferického tlaku (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Používaná je aj ionizácia desorpciou laserom za účasti matrice (*matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI). Spekrá získané pomocou mäkkej ionizačnej techniky nie je možné porovnávať s knižnicou spektier, pretože neexistuje. Knižnica existuje iba pre elektrónovú ionizáciu (EI), ktorá parí medzi tvrdé ionizačné techniky. Pri EI sa uvoľňuje valenčný elektrón, vzniká kationový radikál a následne dochádza k rozsiahlej fragmentácii v dôsledku pôsobenia na elektromagnetické polia. Podmienkou pre EI je prchavosť látok a preto je využívaná s plynovou chromatografiu (GC). [32]

K rozdeleniu iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja a následnému urýchleniu a fokusácii dochádza v hmotnostnom analyzátore. Je umiestnený pred detektorom a za iónovým zdrojom. Hmotnostné analyzátory fungujú podľa piatich základných princípov:

- a) zakrivenie dráhy letu v elektrickom, alebo magnetickom poli,
- b) rôzna doba letu iónov v oblasti bez poľa,
- c) rôzna absorpcia energie pri cykloidálnom pohybe iónov v kombinovanom elektrickom a magnetickom poli,
- d) rôzna stabilita oscilácie iónov v kombinácii jednosmerného a vysokofrekvenčného striedavého napätia,
- e) rozdelenie iónov na základe rôznej frekvencie harmonických oscilácií.

Hmotnostný spektrometer je jediný detektor, ktorý potvrdzuje identitu analytov na základe molekulovej hmotnosti a štruktúrne špecifických fragmentov. Spojenie separačných techník so špecifickým detektorom je metódou prvej voľby. [22]

### 3.4.5 Chirálna separácia v HPLC

Separácia enantiomérov pomocou HPLC nie je na bežných stacionárnych fázach možná. Na jej uskutočnenie je nutné použitie chirálneho selektoru za podmienok chirálnej chromatografie. Na separáciu enantiomérov sú používané dva postupy. Prvým je nepriama chirálna separácia, kde vznikajú diastereoizoméry po chemickej reakcii páru enantiomérov s opticky čistým derivatizačným (chirálnym) činidlom. Následne prebieha

separácia vzniknutých diastereoizomérov v achirálnom prostredí. Výhodou tohto postupu je možnosť použitia konvenčných chromatografických kolón a dobrá selektivita diastereoizomérov. Pri druhom postupe vzniká dočasný diastereoizomérny komplex, ktorý sa vytvorí medzi chirálnou stacionárnou fázou (CSP), alebo chirálnym selektorom v mobilnej fáze a enantiomérom počas chromatografickej separácie. Ku vzniku krátkodobého diastereoizoméreného komplexu sú využívané vodíkové väzby,  $\pi$ - $\pi$  interakcie, interakcie dipól-dipól, hydrofóbne interakcie, komplexy a stérické efekty. K rozlíšeniu dvoch enantiomérov sú nevyhnutné minimálne tri súčasne pôsobiace interakcie medzi analytom a chirálnou stacionárnou fázou. Tento proces sa nazýva chirálna separácia. CSP vzniká po kovalentnom naviazaní chirálneho selektoru na achirálny nosič (väčšinou sikilagel) v kolóne. Chirálny selektory sú podľa pôvodu rozdelené do niekoľkých skupín. Prírodné, semisyntetické a syntetické. Selektory prírodného pôvodu sú málo selektívne, preto sú viac využívané selektory semisyntetické a syntetické. V súčasnosti je v HPLC priama chirálna separácia na CSP najrozšírenejším spôsobom. Existuje niekoľko hlavných typov chirálnych stacionárných fáz. Najčastejšie používané sú polysacharidové a proteínové. Na separáciu chirálnych liečiv v HPLC sa využívajú CSP na základe polysacharidov, CSP s makrocyclickými antibiotikami, cyklodextríny a ich deriváty a CSP s naviazanými bielkovinami. [33]

#### **3.4.5.1 CSP na báze makrocyclických antibiotík**

CSP zo skupiny makrocyclických antibiotík majú niekoľko stereogénnych centier a funkčných skupín, ktoré im umožňujú interakciu s chirálnymi molekulami. U týchto CSP existuje vysoká pravdepodobnosť vzniku diastereoizomérnych komplexov s analytom a teda vysoká pravdepodobnosť, že dôjde k chirálnej separácii. Makrocyclické antibiotiká sa delia na ansamycíny a glykopeptidy, ktoré sa radia medzi najúspešnejšie chirálne selektory. Antibiotiká sú kovalentne viazané na silikagel (štyri a viac väzieb). Sú tvorené makrocyclickým kruhom a peptidovým reťazcom s rôznym počtom étericky viazaných cukrových jednotiek. Medzi komerčne dostupné CSP patria napr. vankomycin (Chirobiotic V), ktorý má 18 chirálnych centier, teikoplanin (Chirobiotic T), ktorý obsahuje 23 chirálnych centier a Ristocetin A (Chirobiotic R). Tieto CSP sú veľmi selektívne a ich selektivita je ovplyvnená hlavne zložením mobilnej fázy, pH, teplotou a organickým modifikátorom. [34]

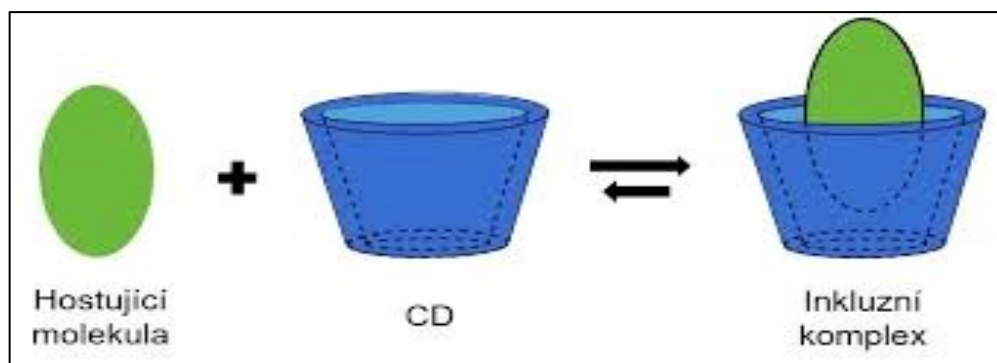
### 3.4.5.2 Polysacharidové CSPs

Prírodné polysacharidy ako amyulóza a celulóza sú opticky aktívne látky vďaka ich asymetrickej štruktúre a preto sa môžu uplatniť ako CSP v kvapalinovej chromatografii pri chirálnych separáciách enantiomérov. Amyulóza je polymér tvorený 500 - 20000 D-(+) glukózovými jednotkami spojenými  $\alpha$ -1,4-glykozidickou väzbou. Celulóza je polymér, ktorý je tvorený 200 - 14000 D-(+) glukózovými jednotkami spojenými  $\beta$ -1,4-glykozidickou väzbou. Nesubstituovaná celulóza aj amyulóza sa neosvedčili ako chirálne selektory kvôli ich nízkej selektivitě a problémom s manipuláciou. Z tohto dôvodu sa ako chirálne selektory uplatňujú ich chemické deriváty. Derivované polysacharidy sú na nosič (silikagel) kovalentne naviazané, alebo iba nanosené pomocou procesu nazývaného coating. Kovalentne naviazané derivované polysacharidy sú odolnejšie voči tlaku, teplote a použitej mobilnej fáze, ale ich enantioselektivita je v porovnaní s nanesenými derivovanými polysacharidmi nižšia. Je to dané obmedzenou stereošpecifickou konfiguráciou imobilizovaných derivovaných polysacharidov v priebehu ich kovalentného naviazania na povrch nosiča pomocou hydroxylovej skupiny polysacharidu. Mechanizmus separácie môže ovplyvniť aj molekulová hmotnosť a polydisperzia polysacharidu. Polysacharidy sú najčastejšie derivované triestermi a trikarbamátmi. V súčasnosti existuje množstvo polysacharidových CSPs, ktoré patria medzi najpoužívanejšie stacionárne fázy. [33]

### 3.4.5.3 Cyklodextríny a ich deriváty

Cyklodextríny (CD) sú cyklické oligosacharidy, ktoré boli prvýkrát izolované v roku 1891 ako degradačný produkt škrobu. Vznikajú nešpecifickou enzymatickou hydrolyzou pôsobením cyklodextrín-glykosyltransferázy. Pozostávajú zo šiestich ( $\alpha$ -cyklodextríny), siedmich ( $\beta$ -cyklodextríny), alebo ôsmich ( $\gamma$ -cyklodextrín) glukopyranózových jednotiek. Všetky jednotky sú viazané  $\alpha$  (1,4) glykozidickou väzbou. Geometrické usporiadanie glukopyranózových jednotiek vytvára dutý kužeľ (kavitu) o rôznej veľkosti. Vonkajší, širší okraj kavity obsahuje sekundárne hydroxylové skupiny a užší okraj je obklopený primárnymi hydroxylmi. Z tohto dôvodu je vonkajšok hydrofilný, zatiaľ čo vnútorný okraj ma lipofilný charakter. Vďaka tomu môžu nepolárne molekuly ľahko vniknúť (inkludovať) do vnútra kruhu CD a polárne interagujú s primárnymi hydroxylmi na povrchu. Vznikajú tzv. inklúzne komplexy. K tomuto javu dochádza najčastejšie vo vode, alebo v zmesi vody a iného polárneho rozpúšťadla. Inklúzne komplexy sú charakterizované konštantami stability, ktoré sú zodpovedné za

retenciu jednotlivých analytov (stabilizácia vodíkovými väzbami, van der Waalsovými, alebo disperznými silami).



Obr. 7 Schéma tvorby inklúzneho komplexu.

Prevzaté z:

[https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/22116/Nanocasticove\\_senzorove\\_systemy\\_-\\_Michael\\_Kalat%2C\\_DP%2C\\_TUL\\_2017.pdf?sequence=1](https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/22116/Nanocasticove_senzorove_systemy_-_Michael_Kalat%2C_DP%2C_TUL_2017.pdf?sequence=1)

Chemickou modifikáciou je možné cielene meniť fyzikálne-chemické vlastnosti cyklodextrínov. Vznikajú deriváty s lepšou rozpustnosťou vo vode aj v organických rozpúšťadlách. Derivatizácia prebieha cez hydroxylové skupiny, pri ktorej vznikajú étery, estery, alebo karbamáty. Samotný cyklodextrín je kovalentne viazaný na povrch silikagelu. Chirálnu separáciu na CD je možné realizovať vo všetkých troch chromatografických módoch (normálny, reverzný a polárno-organický mód). [35] [36]

#### 3.4.5.4 Glykoproteínové CSPs

Glykoproteíny sú vysokomolekulárne komplexy proteínu, ktoré sa skladajú z reťazca L-aminokyselín spojených peptidovou väzbou. Aminokyseliny sú chirálne látky a preto majú schopnosť diskriminovať chirálne molekuly. Glykoproteínové chirálne selektory sú imobilizované na silikagel. Nevýhodou týchto stacionárnych fáz je nízka kapacita, tlakový limit kolóny a obmedzené pH mobilnej fázy v rozmedzí 4 - 7. Výhodami glykoproteínových CSPs sú unikátne enantioselektívne vlastnosti k širokému spektru látok a dobrá kompatibilita s vodnými mobilnými fázami. Medzi komerčne dostupné kolóny patrí kolóna s  $\alpha$ 1-kyslým glykoproteínom (AGP). Je to stabilný proteín so širokým rozmedzím teplôt a pH, u ktorého nedochádza k denaturácii v organických rozpúšťadlách. Ďalšiu CSP tvorí trypsínový inhibítor ovomukoid (OVM), ktorý sa získava z vaječných bielkov. Hovädzí sérový albumín (BSA), guľovitý proteín obsahujúci 581 aminokyselín stabilizovaný 17 disulfidickými mostíkmi, je ďalšou používanou glykoproteínovou CSP. [22]

#### **3.4.5.5 Crown-éterové CSPs**

Prvá zmienka o crown-éteroch pochádza z roku 1967. Ide o syntetické, makrocyclické polyétery obsahujúce etylénoxidový mostík (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-). Podobne ako cyklodextríny aj crown-étery vytvárajú kavitu, ktorých veľkosť určuje počet etylénoxidových mostíkov. Chirálny crown-éter vznikajú pri začlenení chirálnej molekuly do štruktúry crown-éteru. [22]

#### **3.4.5.6 Aplikácia chirálnej chromatografie**

Uplatnenie chirálnej chromatografie je v odvetviach, kde je nutné rozlíšenie jednotlivých optických izomérov látok, ktoré sa líšia svojím farmakologickým, alebo biologickým účinkom. Jeden z optických izomérov je zväčša aktívna forma s požadovaným účinkom. Druhý izomér môže byť menej aktívny, neaktívny, alebo s nežiadúcimi účinkami. Poskytuje rozlíšenie enantiomérov z rôznych tried spolu s vysokou senzitivitou a dobrou linearitou moderných detektorov, vďaka čomu reprezentuje ideálny nástroj na získanie enantiošpecifických dát. [35]

## 4 Analytická časť

Achirálné HPLC analytické metódy sú rutinne používané v bioekvivalenčných aj farmakokinetických štúdiách, zatiaľ čo pre stanovenie enantioméneho pomeru tramadolu a jeho metabolitov sú nevyhnutné chirálne HPLC metódy. Prvé analytické metódy pre tramadol a jeho metabolity v biologických vzorkách zahŕňali plynovú chromatografiu so selektívnou dusíkovou detekciou, alebo hmotnostnou detekciou. Popísané boli aj HPLC metódy s ultrafialovou, fluorescenčnou, elektrochemickou a hmotnostnou detekciou. Keďže molekula tramadolu obsahuje benzénový kruh, HPLC analýza v plazme pomocou UV detekcie nepatrí medzi najčastejšie, kvôli nižšej citlivosti a selektívnosti. [37]

Z vybraných publikovaných článkov sú popísané najpoužívanejšie a najvhodnejšie HPLC metódy stanovenia tramadolu a jeho hlavných metabolitov.

### 4.1 Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC s fluorescenčnou detekciou

Štúdium bolo schválené etickou komisiou a vykonané podľa aktuálnych národných a medzinárodných predpisov, pokynov a odporúčaní. Do štúdií bolo zahrnutých 10-24 dobrovoľníkov, mužov aj žien vo veku od 20 do 29 rokov. Každý z dobrovoľníkov dostal jednorazovú dávku 100 mg (dve tablety Tramadolu, alebo Tramalu po 50 mg), podanú orálne spolu s 200 ml vody. Súčasťou diéty bolo obmedzenie užívania alkoholu, kofeínu, tukov a zákaz fajčenia. Po dvoch týždňoch bola podaná druhá dávka za rovnakých podmienok. Vzorky krvi, boli odobrané z kubitálnej žily do striekačky s heparínom v nasledujúcich intervaloch: 10, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 720 a 1440 min (0-24 hod.). Plazma bola získaná centrifugáciou a ihneď oddelená a uskladnená pri -20°C, než bude analyzovaná. Podľa stabilných štúdií vydrží tramadol a jeho hlavný metabolit ODT v plazme bez rozkladu pri -60 °C najmenej 49 dní. [38] [39]

#### 4.1.1 Príprava vzoriek

Po rozmrazení plazmy boli zakalené vzorky centrifugované. Ku 0,5 ml (1 ml) ľudskej plazmy v sklenenej skúmavke so zábrusovou zátkou bol pridaný vnútorný štandard (IS- internal standard). Ako vnútorné štandardy boli použité diMeSA (*N, N*- dimetylsulfanilamid) (2002), cis-tramadol (2005), fluconazol (2015), alebo sotalol (2008, 2016). Následne sa pridalo extrakčné médium a celý obsah skúmavky sa premiešal na vortexe 1 minútu a jemne ešte ďalších 30 minút. Po ďalšej centrifugácii boli skúmavky uložené v mraziacom boxe (-60 °C na 30 min, alebo -20 °C na 6 hodín), až kým spodná,

vodná vrstva nezamrzla. Organická vrstva obsahujúca analyty bola dekantovaná do novej čistej skúmavky a rozpúšťadlo bolo vyparené pomocou prúdu dusíka vo vodnom kúpeli (40°C). Suchý extrakt sa zriedil s mobilnou fázou, premiestnil sa do vialok autosampléru a alikvoty vzoriek sa nastriekli do kolóny chromatografického systému.[38] [39] [40] [41]

V jednotlivých štúdiách postupne dochádzalo k zmenám a vylepšovaniu analytických podmienok.

#### 4.1.2 Chromatografické podmienky

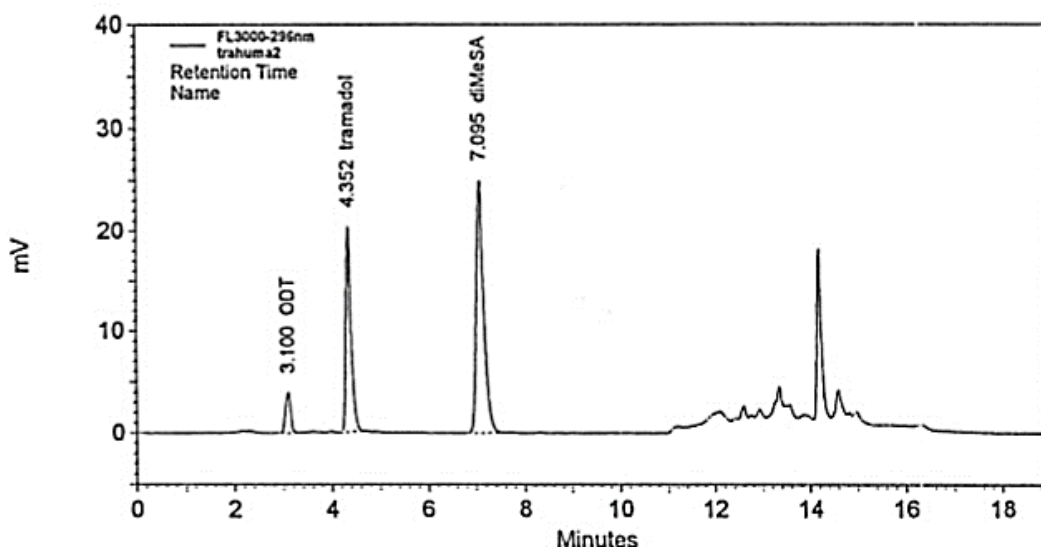
- Mobilná fáza: acetonitril: 0,01M fosfátový pufor = 3:7 [39]  
metanol: voda = 13:87 + kys. fosforečná (pH= 2,5) [43]  
acetonitril: kyselina mravčia 0,1 % = 80:20 [41]  
acetonitril: NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> (pH=4,0) = 25:75 [40]
- Prietok: 1-2 ml/min
- Kolóna: LiChroCART 250 x 4 mm [39]  
RP-18e 50 mm x 4,6 mm [43]  
Kromasil C18 150 mm x 4,6 mm, 5 μm [41]
- Fluorescenčný detektor: λ<sub>ex</sub>= 202 nm a λ<sub>em</sub>= 296 nm [39]  
λ<sub>ex</sub>= 200 nm a λ<sub>em</sub>= 300 nm [43]  
λ<sub>ex</sub>= 280 nm a λ<sub>em</sub>= 310 nm [41]
- Elúcia: izokratická
- Vstrekovaný objem: 20/100 μl
- Čas analýzy: 5-19 min

#### 4.1.3 Výsledky

Štúdie boli zamerané na vyvinutie metódy pre stanovenie koncentrácií tramadolu a jeho hlavného metabolitu ODT v ľudskej plazme. Stanovená bola HPLC s reverznou fázou a fluorescenčnou detekciou.

Dôležitý je výber vnútorného štandardu. Táto zlúčenina musí vlastniť podobnú štruktúru chromofóru (mala by vykazovať podobné spektrálne charakteristiky) a mala by mať podobnú polaritu (retenčný čas by mal byť dostatočne blízko stanovovanej zlúčenine a počas extrakcie by mala látka vykazovať podobné správanie). Na analýzu bol ako prvý vybraný verapamil, ktorý ale musel byť nahradený z dôvodu širokého a asymetrického píku terciárneho amínu a veľmi dlhého retenčného času ( $t_R = 24,8$  min). Následne bol ako IS použitý diMeSA (viz. obr. 8). Táto zlúčenina poskytuje vysoké a symetrické píky

v chromatografii s reverznou fázou, je dobre extrahovaná z rôznych biomatríc a poskytuje dobrú odpoveď pri UV aj fluorescenčnej detekcii. Lipofilita a teda aj retenčné časy v rôznych chromatografických systémoch závisia na povahe substituentov na amidovom a/alebo anilínovom dusíku. Retenčný čas diMeSA bol dostatočne blízko retenčnému času tramadolu. [39] [42]

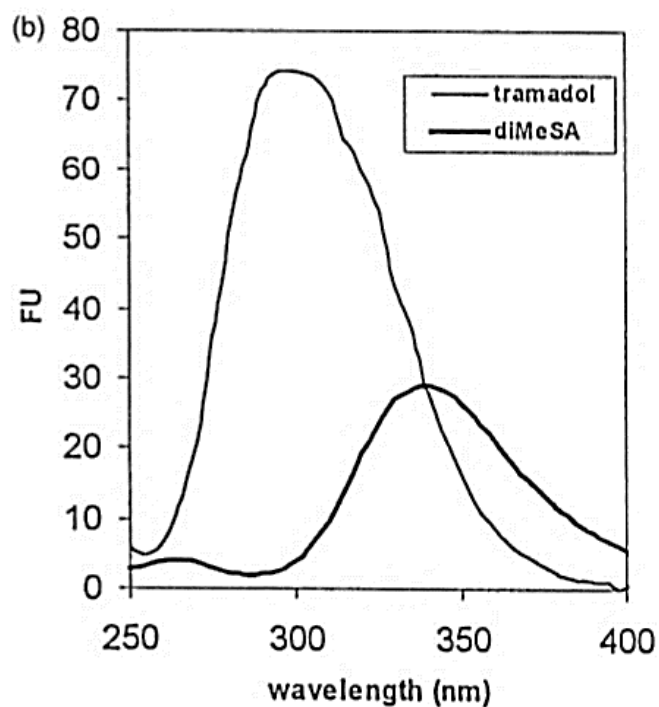


Obr. 8 Chromatogram ľudskej plazmy po orálnom podaní liečiva. ODT ( $t_R = 3,100$  min), Tramadol ( $t_R = 4,352$  min), diMeSA ( $t_R = 7,095$  min) Prevzaté z: NOBILIS, 2002. [39]

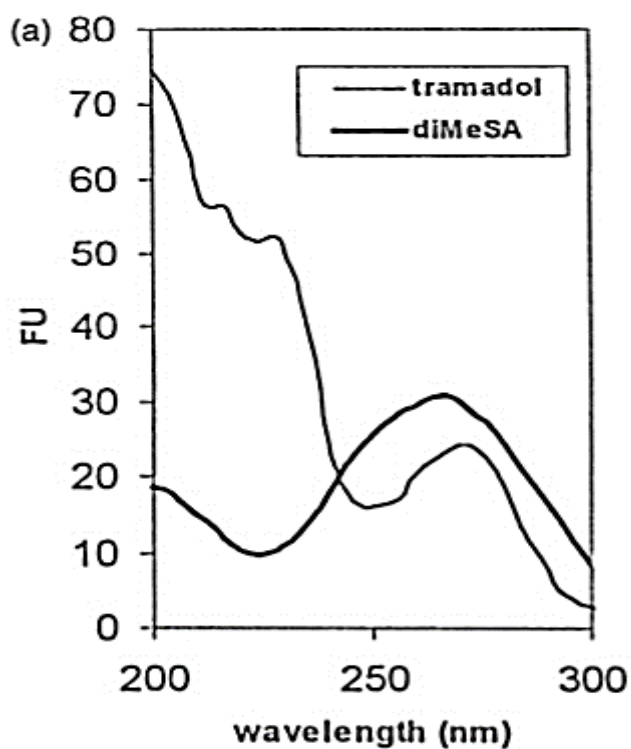
V chromatograme z extraktu krvnej plazmy sa pri retenčnom čase 40- 125 min objavilo niekoľko píkov balastných zlúčenín, ktoré môžu interferovať v ďalších analýzach vzoriek v rade. Na vyriešenie tohto problému boli navrhnuté dva spôsoby. Prvý je založený na reextrakcii z kvapaliny do kvapaliny základných analytov do kyslej vodnej vrstvy, ktorý nebol možný pretože IS (diMeSA) nie je bazický, a preto je pH závislá reextrakcia nevykonateľná. Z tohto dôvodu bol použitý druhý postup, pri ktorom je cieľom urýchlenie elúcie balastov z chromatografickej kolóny. Po každej analýze extraktu plazmy bolo aplikované premývanie pomocou 80% acetonitrilu. Celková chromatografická analýza trvala 19 min. [39] [40]

UV spektrá tramadolu a jeho metabolitov sú prakticky identické (maxima pri 210 a 275 nm), zatiaľ čo diMeSA vlastní odlišný typ chromofóru, ktorý absorbuje pri 265 nm. Fluorescenčná detekcia je oveľa citlivejšia než detekcia pomocou UV a preto umožňuje meranie nízkych koncentrácií analytu v plazme. Emisné maximum ODT je posunuté na 306 nm v porovnaní s tramadolom a NDT, kde obe látky majú 296 nm. Podľa excitačného a emisného fluorescenčného spektra bola vykonaná fluorescenčná detekcia pri  $\lambda_{ex}$  202 nm/  $\lambda_{em}$  296 nm pre tramadol a jeho metabolity a pri  $\lambda_{ex}$  264 nm/  $\lambda_{em}$  344 nm pre diMeSA.





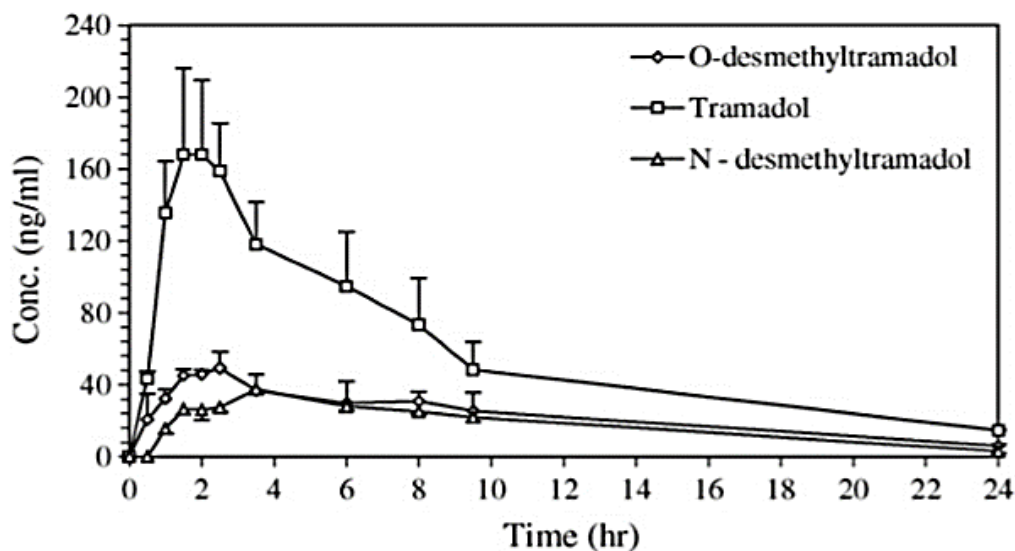
Obr. 10 Emisné spektrum tramadolu a diMeSA.  
 Merané pri excitačnej vlnovej dĺžke 202 nm pre tramadol a 264 nm diMeSA  
 Prevzaté z: NOBILIS, 2002. [39]



Obr. 9 Excitačné spektrum pre tramadol a diMeSA  
 Merané pri emisnej vlnovej dĺžke 296 nm pre tramadol a 344 nm pre diMeSA.  
 Prevzaté z: NOBILIS, 2002. [39]

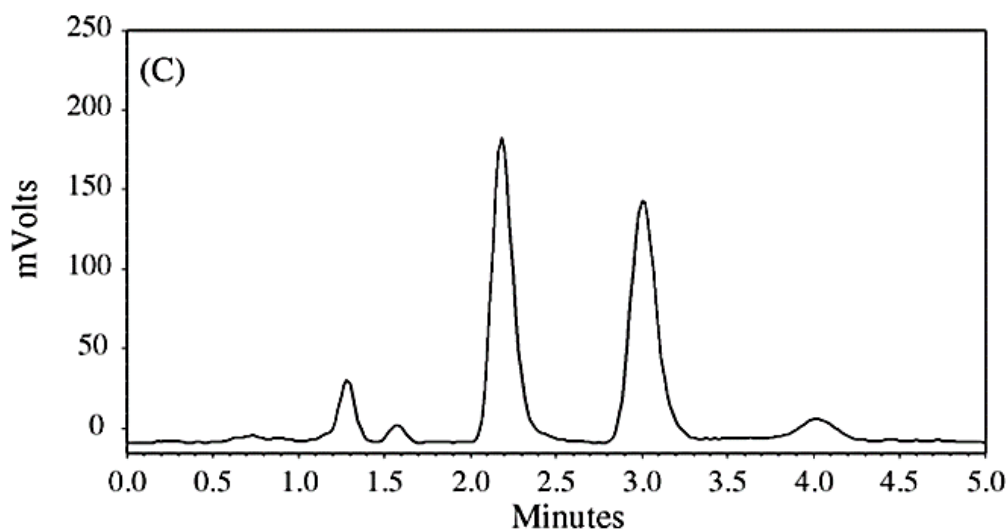
Návratnosť ODT, diMeSA a tramadolu bola 70, 89 a 86 %. Kalibračné krivky plazmy pre tramadol a jeho metabolity sú lineárne v rozsahu koncentrácií od 2,6 do 105 ng/ml. Koncentrácie nad 105 ng/ml vykazovali nelineárnu odozvu fluorescenčného detektoru a preto boli tieto vzorky plazmy nariadené. Citlivosť metódy bola daná hodnotami limitu kvantifikácie (LOQ – limit of quantification) a limitu detekcie (LOD – limit of detection). Hodnoty LOQ boli 10 ng tramadolu na ml plazmy a 9 ng ODT na ml plazmy a hodnoty LOD 1,5 ng tramadolu a 1,3 ng ODT/ml plazmy. [39]

Vyššie uvedená metóda poskytuje dobrú selektivnosť a citlivosť, ale vyžaduje dlhú premývaciu fázu z dôvodu pomalého prietoku a má rozdielne excitačné a emisné vlnové dĺžky pre tramadol, M1 a vnútorný štandard. Väčšina rutinných metód pre analýzu tramadolu nie je kratšia ako 15 min. Limitácia prietoku môže byť vyriešená pomocou monolitických kolón s dvojzložkovou štruktúrou, ktoré ponúkajú vyššiu porozitu oproti klasickým kolónam. Vďaka tomu je možné použitie vysokej prietokovej rýchlosti bez straty výkonu a obmedzení kvôli zvýšenému tlaku. Táto metóda poskytuje simultánne stanovenie tramadolu, M1 a M2. Tento analytický postup je založený na dvojestupňovej extrakcii a celkový čas je 4,5 min. [43] [44]



Obr. 11 Závislosť koncentrácie na čase tramadolu, M1 a M2 po podaní 100 mg tramadolu.

Prevzaté z: ROUINI, 2005. [43]



Obr. 12 Chromatogram plazmy dobrovoľníka 2,5 hod. po jednorazovom orálnom podaní 100 mg tramadolu.

Tramadol ( $t_R = 3,1$  min), M1 ( $t_R = 1,3$  min), M2 ( $t_R = 4,0$  min), cis-tramadol (IS) ( $t_R = 2,1$  min).

Prevzaté z: ROUINI, 2005. [43]

Hodnoty LOQ boli definované na 2,5 ng/ml pre tramadol, 1,25 ng/ml pre ODT a 5 ng/ml pre NDT. Absolútna návratnosť sa pohybovala v rozsahu od 74,4 do 80,8 %, 76,9 do 87,3 % a 85,5 až 95,5 % pre tramadol, M1 a M2. Táto HPLC metóda pre tramadol a jeho hlavné metabolity je vhodná nie len pre farmakokinetické štúdie, ale aj terapeutické monitorovanie liečiv. [43] [44]

## 4.2 Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC-DAD

Úspešne validovaná bola aj metóda na extrakciu a kvantifikáciu tramadolu a jeho metabolitu v autentických vzorkách ľudskej plazmy pomocou HPLC-DAD (diode array detector).

### 4.2.1 Príprava vzoriek

Ako vnútorný štandard bol použitý propranolol, ku ktorému bola pridaná plazma pacienta, extrakčné činidlo (MTBE- *tert.*-butylmetyl éter) a hydroxid amónny ako alkalické médium. Po zamiešaní a centrifugácii bola organická vrstva oddelená, premiestnená a vyparená do sucha. K suchým extraktom bola pridaná mobilná fáza, vzorka sa zvortexovala a bola nastrieknutá do HPLC systému. [45] [46]

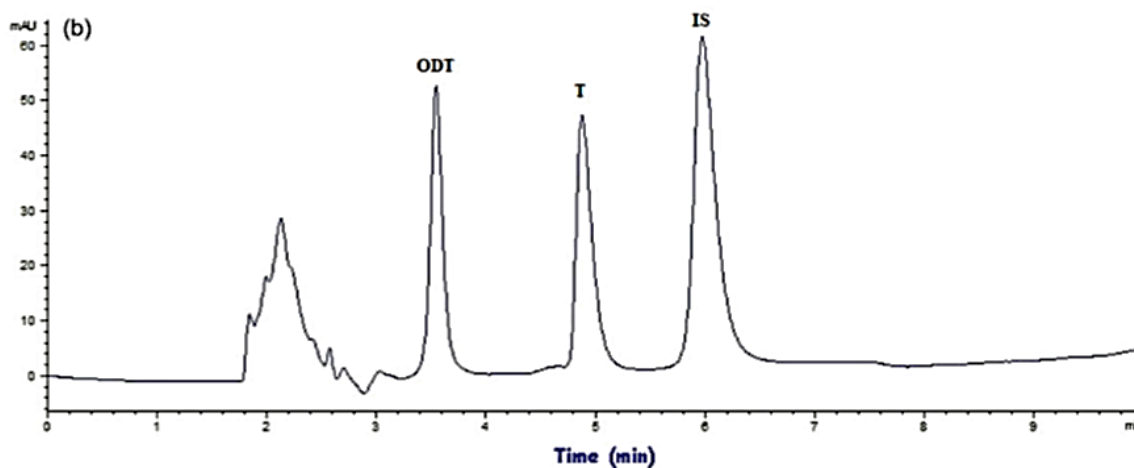
### 4.2.2 Chromatografické podmienky

- Mobilná fáza: acetonitril: 0,01M fosfátový pufoer= 50:50
- Kolóna: Zorbax SB-C8, 5  $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm

- Prietok: 1 ml/min
- Ultrafialová detekcia:  $\lambda = 200\text{-}800\text{ nm}$ , kvantifikácia pri  $\lambda = 218\text{ nm}$
- Elúcia: izokratická
- Vstrekovaný objem: 1 ml
- Čas analýzy: 10 min [45]

### 4.2.3 Výsledky

Na izoláciu tramadolu a ODT z plazmy bola testovaná priama extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE -liquid-liquid extraction), po ktorej nasledovala spätná extrakcia do kyseliny chlorovodíkovej s použitím rôznych organických rozpúšťadiel. Najväčší extrakčný výtťažok pre všetky analyty bol získaný použitím *tert.*-butylmetyl éteru. Pre UV detekciu bolo vybraných 218 nm, keďže vykazovali najlepšiu výšku píku pre oba analyty aj IS. Hodnoty pH mobilnej fázy sa pohybovali v rozmedzí 2- 7, pričom pH väčšie ako 6 predlžovalo celkový čas analýzy a vytváralo asymetrické píky. Pri pH= 3 sa retencia znížila, ale došlo k ovplyvneniu rozlíšenia a preto bolo pre mobilnú fázu vybrané pH= 5, ktoré poskytovalo najlepšiu výšku píkov s najmenším chvostnaténím. Získané retenčné časy boli pre tramadol, ODT a IS 3,42 min, 4,75 min a 6,00 min. Celkový čas analýzy bol 10 min. LOD a LOQ tramadolu a ODT boli 100 a 250 ng/ml. [45] [46]



Obr. 13 HPLC-DAD chromatogram ľudskej plazmy.  
Prevzaté z: Maha, 2013. [45]

#### **4.2.4 Stanovenie tramadolu pomocou HPLC-DAD s online úpravou vzoriek pomocou MIP v monolitckej kolóne**

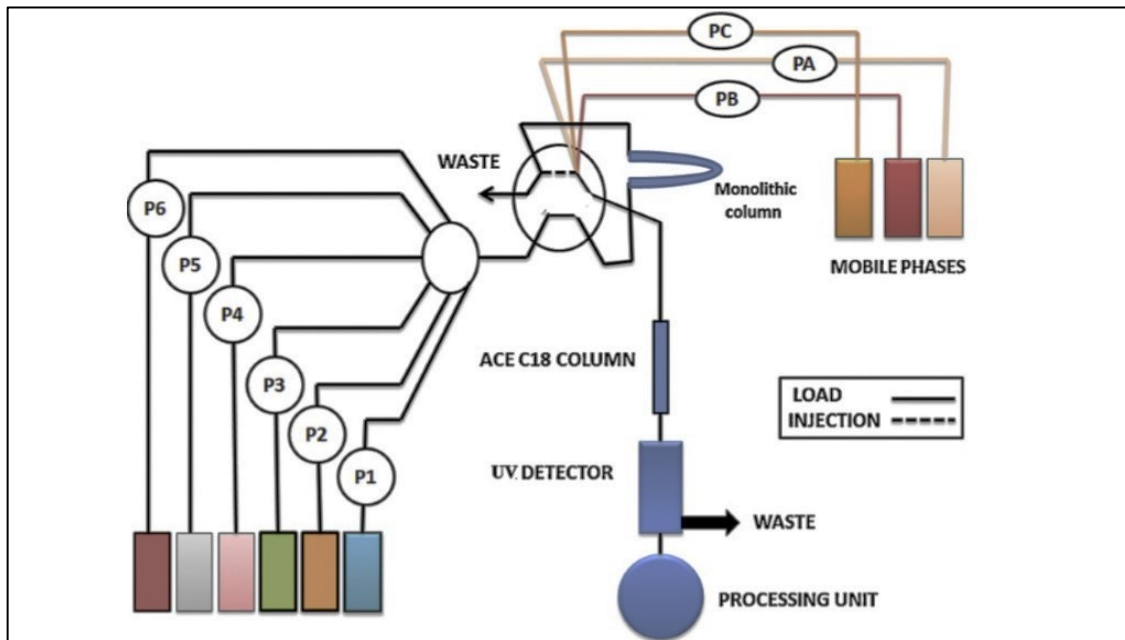
Dôležité pre extrahovanie a izolovanie zložiek z biologických matric je vývoj nových citlivých a selektívnych metód, medzi ktoré patrí hlavne extrakcia na tuhú fázu (SPE – solid phase extraction). Bežne užívané materiály na SPE nie sú vhodné a preto sú potrebné rýchle a selektívne metódy čistenia. Aplikácia SPE spolu s molekulárne vtačenými polymérmi (PIMs – molecularly imprinted polymers), nazývanými MISPE, poskytuje vyššiu špecifickosť v porovnaní s tradičnými SPE adsorbentami. Monolitcké MIPs sú pripravované pomocou in situ polymerizácie. Ľahká príprava a vysoká porozita poskytujú rýchlu separáciu s vysokou účinnosťou kolóny. Použitie MIPs pre SPE je možné v rôznych režimoch, napr.: bežné SPE, kde je MIP zabalený do kaziet, alebo kolón a dávkový režim SPE, kde je MIP inkubovaný so vzorkou. MIPs boli aplikované ako nový materiál pre detekciu nie len tramadolu, ale aj verapamilu, hydroxyzínu, alebo dipyridamolu. V online SPE-HPLC systéme boli optimalizované MIP zabalené do polypropylénových kaziet, ktoré boli začlenené do prietokového systému pred HPLC inštrumentáciu. Kazety boli upravené a naplnené vzorkami obsahujúcimi analyty. Následne bol roztok počas elučnej fázy vymytý do dávkovacej slučky a každá eluovaná vzorka bola nastrieknutá na kolónu a analyzovaná. HPLC analýza tramadolu po online čistení vzoriek bola vykonaná na reverznej HPLC fázy s ACE kolónou s UV detekciou pri 218 nm. [47]

#### **4.2.5 Spojenie monolitckej kolóny s HPLC systémom**

MIP monolitcká kolóna bola pripravená pomocou in situ molekulárnej polymerizačnej techniky a zaradená pred analytickú HPLC inštrumentáciu. Pre rýchlu, automatizovanú a účinnú SPE procedúru na MIP bol využitý princíp sekvenčného vstrekovania. Rozdeľovač pre sekvenčné vstrekovanie bol tvorený mikroelektricky ovládaným ventilom. Vzorky, pufry a premývacie roztoky sú privádzané na monolitckú kolónu pomocou šiestich peristaltických púmp (vis obr. 12).

Najprv bolo upravené pH kolóny pomocou roztokov z púmp 1 až 3 (pH= 3). Extrakčné experimenty zahŕňali naplnenie monolitckej kolóny s 1 ml vzorky, ktorá obsahovala 100 ng/ml tramadolu pomocou pumpy č. 4. Po naplnení bola kolóna kvôli matriciam na biologickej báze premytá roztokmi z púmp č. 5 a 6. Na analýzu vzoriek na báze matrice, boli na kalibráciu použité kalibrátory založené na matrici a preto boli vzorky tramadolu použité na extrakciu pripravené v moči, alebo plazme Po zadržaní

tramadolu na kolóne sa počas elúcie menilo zloženie mobilnej fázy za chodu chromatografickej separácie, pomocou 500  $\mu$ l zmesi metanolu a fosfátového pufru (60:40). Nakoniec všetky eluované zlúčeniny prešli analytickou HPLC kolónou pomocou izokratickej elúcie s mobilnou fázou acetonitril: fosfátový pufr (18:82). [47]



Obr. 14 Schéma online testu tramadolu pomocou monolitckej kolóny spojenej s HPLC systémom.

*P1= metanol, P2= ultračistá voda, P3= 25 mM fosforečnan amónny, P4= vzorka (100 ng/ml tramadolu), P5= 0,1M HCL, P6= ultračistá voda*

*Prevzaté z: JAVANBAKHT, 2016. [47]*

#### 4.2.6 Chromatografické podmienky

- Mobilná fáza: acetonitril: 0,01M fosfátový pufr (pH=5,8) =18:82
- Kolóna: ACE C18, 5  $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm
- Prietok: 1 ml/min
- Ultrafialová detekcia:  $\lambda = 218$  nm
- Elúcia: izokratická
- Vstrekovaný objem: 1 ml
- Čas analýzy: 23 min [47]

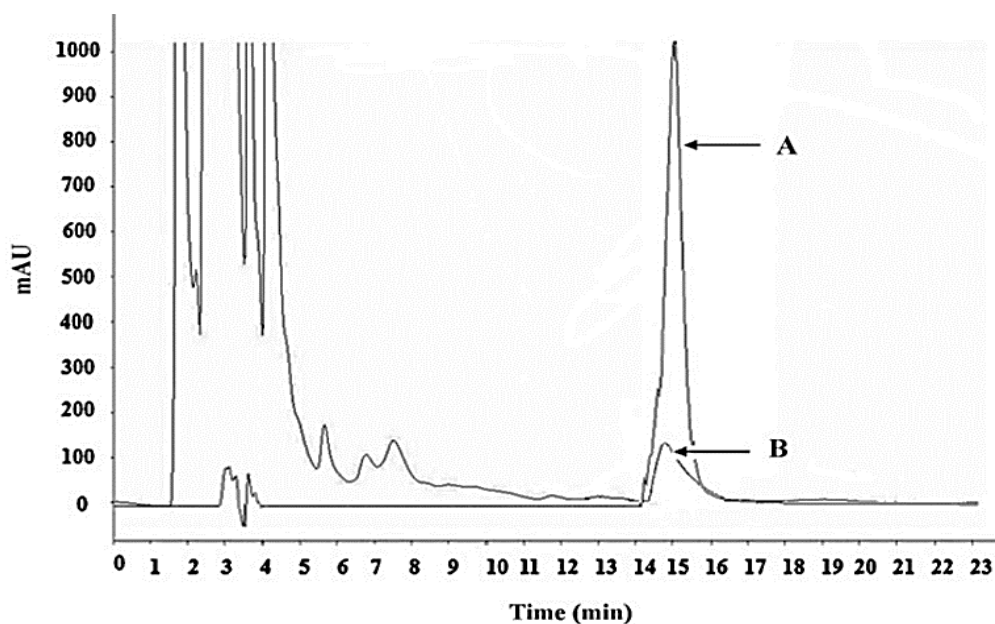
#### 4.2.7 Postup extrakcie vzoriek ľudskej plazmy a moču

Ľudská plazma bez liečiva, získaná z transfúzneho servisu bola pred použitím zmrazená na -20 °C. Kvôli nožnej väzbe tramadolu na proteíny a zníženiu extrakčného

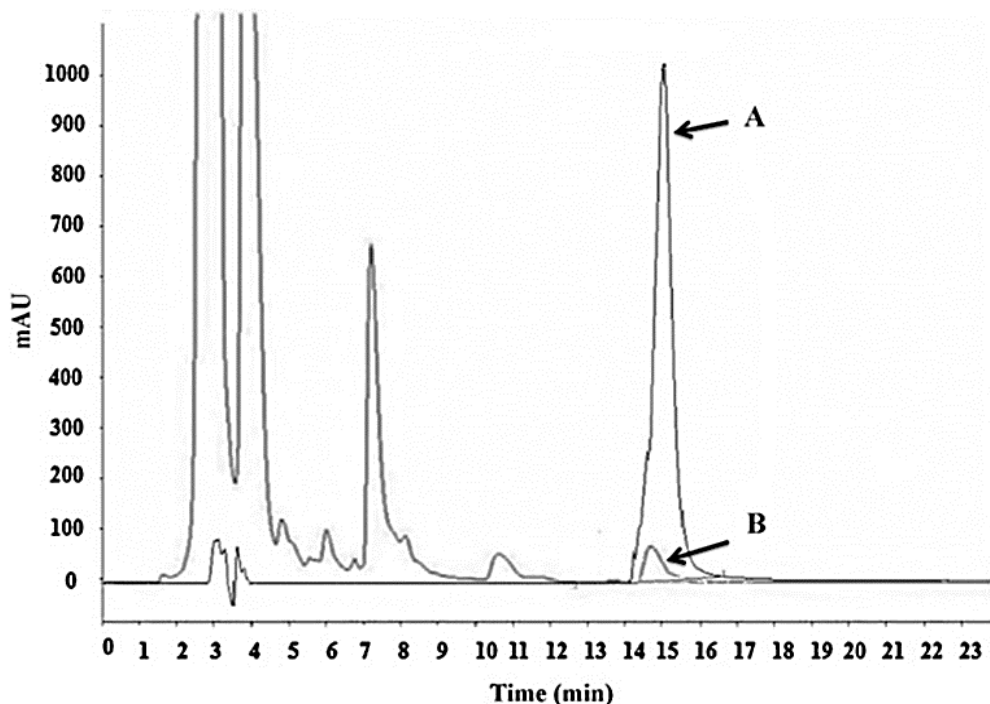
výt'azku (SPE) je nutná úprava plazmy pred extrakciou s MIP monolitickou kolónou. Vzorky plazmy sú zriedené s 25 mM octanom amónnym a následne scentrifugované, aby bol odstránený prebytok proteínov. Supernatant bol prefiltrovaný cez filter z acetátu celulózy a filtrát bol uskladnený v sklenených nádobách pri -20 °C až do analýzy. 1 ml filtrovaného supernatantu bol odobraný a priamo nastrieknutý cez MIP kolónu. [47]

#### 4.2.8 Výsledky

Na dokázanie potenciálu MIP monolitickej kolóny pre selektívne čistenie analytu, bola kolóna použitá na očistenie píkov tramadolu v ľudskej plazme a moči. Výsledky ukázali, že tento postup môže vymyť interferencie a zabrániť kontaminácii HPLC kolóny. HPLC analýza s použitím MIP poskytla lineárnu kalibračnú krivku tramadolu v plazme a v moči v rozsahu 1,0 - 350 ng/ml a 0,1 - 300 ng/ml, s dobrou presnosťou a návratnosťou (90,5- 93,1 % a 93,3- 96,0 %). LOD v moči aj v plazme bol pre tramadol 0,03 ng/ml a LOQ v moči 0,10 ng/ml a v plazme 1,0 ng/ml. Separácia tramadolu a ostatných zložiek v komplexnej biologickej matrici bola dobrá a návratnosť nebola ovplyvnená ďalšími vyšetrovanými zložkami, ako napr. M1 (ODT). Retenčný čas tramadolu bol 15,15 min. [47]



obr. 15 Chromatogram získaný po filtrácii 1 ml vzorky plazmy obohatenej s 50,0 ng/ml tramadolu čistiacim krokom so značenou monolitickou kolónou. Prevzaté z: JAVANBAKHT, 2016. [47]



obr. 16 Chromatogram získaný po filtrácii 1 ml vzorky moču obohatenej s 50,0 ng/ml tramadolu čistiacim krokom so značenou monolitickou kolónou.  
Prevzaté z: JAVANBAKHT, 2016. [47]

### 4.3 Stanovenie tramadolu a ODT pomocou HPLC s hmotnostnou detekciou

HPLC/MS je akceptovaná, ako hlavný nástroj pri identifikácii, štruktúrnej charakteristike a kvantitatívnej analýze liečiv a ich metabolitov, vďaka dobrej citlivosti, selektívnosti a účinnosti. Analýza sa vykonáva v komplexných biologických maticiach a preto je vo všetkých prípadoch použité čistenie a skoncentrovanie pomocou LLE, alebo SPE. Pomocou HPLC metódy s hmotnostnou detekciou bol kvantifikovaný tramadol a jeho metabolit v ľudskej plazme po orálnom jednorazovom podaní 100 mg liečiva. Náhodne vybraným dobrovoľníkom boli po podaní liečiva odobrané vzorky krvi a moču v určených časových intervaloch, ktoré boli následne separované, alebo centrifugované, dekantované, zamrazené a uskladnené pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pred analýzou. [48]

#### 4.3.1 Príprava vzorky

Vzorka plazmy je spolu s IS, ktorým je Tinidazol (Liu, 2009) alebo tramadol- $^{13}\text{C}$  (Chytil, 2010) s roztokom hydroxidu sodného (amónneho) a s acetoacetátom zmiešaná, zvortexovaná a scentrifugovaná. Sepernatant sa vyparí do sucha pod prúdom dusíka vo



vodnom kúpeli (40-45 °C), zvyšok je zriedený s mobilnou fázou a alikvot vzorky je nastrieknutý na kolónu. [49] [50]

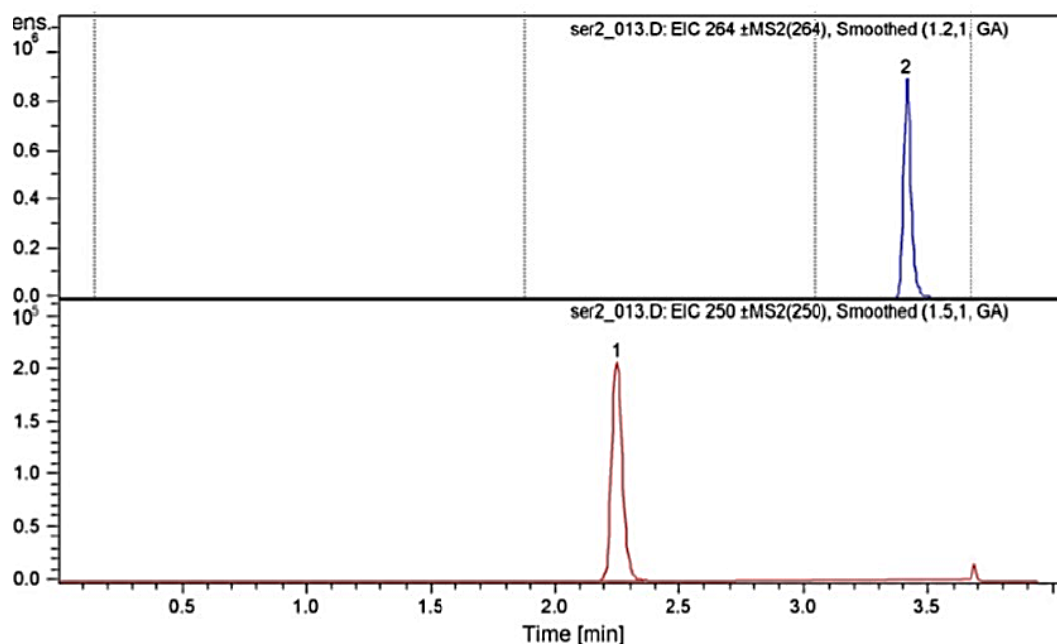
#### 4.3.2 Chromatografické podmienky

- Mobilná fáza: acetonitril: 0,2 % kyselina trifluoroctová =10:90 [48]  
metanol: voda + octan amónny= 1:1 [49]  
hexán: izopropanol: dietylamín= 90:10:0,1 [50]
- Kolóna: Diamonsil C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm [49]  
Zorbax SB-C18, 100 mm x 3 mm, 3,5 µm [48]  
Lux Cellulose-2, 150 mm x 4,6 mm, 3 µm [50]
- Prietok: 0,8-1,3 ml/min
- Detekcia: pozitívna ionizácia elektro-sprejom/ chemická ionizácia za atm. tlaku  
tramadol m/z = 264, ODT m/z = 250,
- Elúcia: izokratická
- Vstrekaný objem: 10-15 µm
- Čas analýzy: 10 min

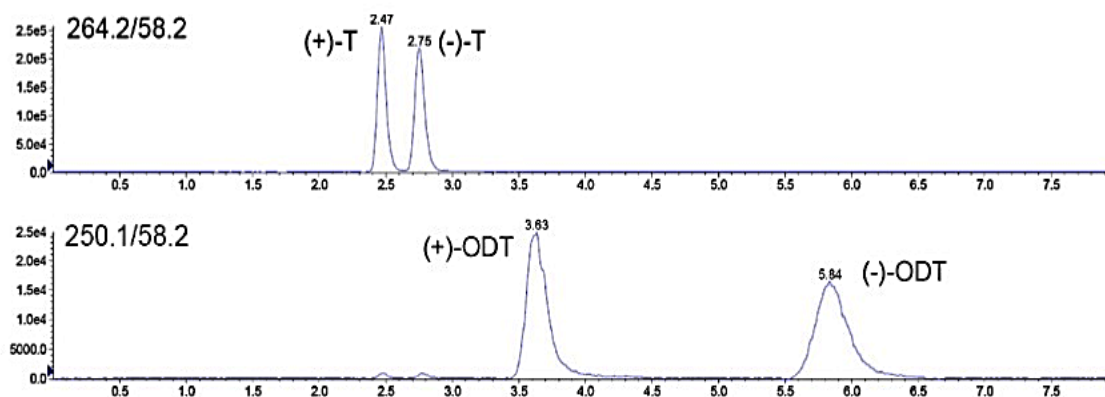
#### 4.3.3 Výsledky

Hmotnostné spektrum tramadolu, alebo IS bolo stanovené priamym nástrekom roztokov jednotlivých zlúčenín v zmesi metanolu a vody do hmotnostného spektrometra, ktorý bol nastavený v režime kladných iónov. Protonizované ióny sa objavili pri m/z = 264 pre tramadol a m/z = 250 pre ODT. Na optimalizáciu selektivity a špecifity iónov sa zvolilo kapilárne napätie, teplota a tok sušiacoho plynu a tlak rozprašovača. [48] [49]

Boli skúšané rôzne pomery hexánu, izopropanolu a rôzna teplota a prietoková rýchlosť k získaniu najlepšej enantiomerickéj separácie. Pri vyššom množstve hexánu bola výsledkom silnejšia retencia analytov a dlhší čas chromatografickej analýzy. Zvýšené množstvo izopropanolu spôsobilo zvýšenie spätného tlaku v kolóne bez zlepšenia separácie. Zmeny teploty výsledky podstatne neovplyvnili. Celková analýza trvala 8 min a retenčné časy všetkých analytov boli kratšie ako 6 min. LOD pre enantioméry tramadolu aj ODT boli 0,15 ng/ml. Podmienky pre hmotnostnú spektrometrickú detekciu boli optimalizované pre maximálnu tvorbu iónov pomocou priamej infúzie štandardného roztoku. [48] [49]



Obr. 18 Chromatogram plazmy 1,5 hod. po orálnom podaní tramadolu.  
 (1) ODT, (2) tramadol  
 Prevzaté z: Vlase, 2008. [48]



Obr. 17 Chromatogram enantiomérov tramadolu a ODT.  
 Prevzaté z: CHYTIL, 2010. [50]

#### 4.4 Zhrnutie

Pomocou HPLC metódy s fluorescenčnou, hmotnostnou a spektrofotometrickou detekciou bol stanovený tramadol a ODT, ako jeho hlavný metabolit v plazme. Liečivo bolo podávané náhodne vybraným zdravým dobrovoľníkom a vzorky plazmy sa odoberali v pravidelných časových intervaloch. Jednotlivé stanovenia sa líšili nie len spôsobom detekcie, ale aj úpravou vzoriek, zložením chromatografického systému, vnútorným štandardom, alebo celkovým časom analýzy.

Stanovenie pomocou fluorescenčnej detekcie vykazovalo dobrú citlivosť, aj selektívnosť, ale kvôli interferenciám balastných zlúčenín bola nutná dlhá premývacía fáza, ktorá celú analýzu výrazne predĺžila. Problém sa vyriešil použitím monolitckej kolóny, ktorá umožnila zvýšenie prietokovej rýchlosti. Monolitická kolóna s MIPs bola použitá pri spektrofotometrickej detekcii, ako úprava pred samotnou HPLC analýzou na zvýšenie selektivity. Vďaka hmotnostnej detekcii mohol byť stanovený nielen tramadol, ale oba jeho enantioméry, spolu s enantiomérmi ODT. Výsledky jednotlivých stanovení sú podrobnejšie rozoberané v diskusii.

## 5 Diskusia

Cieľom tejto práce bolo vyhľadať a spísať informácie o liečive tramadol a popísať chromatografické metódy, pomocou ktorých je možné toto liečivo stanoviť. Tramadol je všeobecne považovaný za bezpečný a má minimálny potenciál na zneužitie. Napriek vysokému počtu štúdií, stále neexistujú žiadne zhodné údaje o jeho potenciálnej závislosti. Liečivo bolo v Európe používané približne 20 rokov, než ho schválili v Spojených štátoch amerických. Pravdepodobnosť zneužívania bola v USA 2-3/10 000, ktorá neskôr klesla na 1/10 000. Od roku 1992 do roku 2006 bola závislosť na tramadole hodnotená odborným výborom pre drogovú závislosť (ECDD, Expert Committee on Drug Dependence) niekoľko krát. Zneužívanie na neliečivé účely bolo populárne v Číne od prvého uvedenia na trh, začiatkom 90. rokov. S cieľom zabrániť zneužívaniu boli v roku 2007 vydané opatrenia na podávanie psychotropných liekov a tramadol bol kontrolovaný, ako druhá kategória psychotropných látok. [51]

Stereoselektívne metódy pre stanovenie tramadolu a ODT boli využité pri štúdiách so zdravými, dospelými dobrovoľníkmi. Na analýzu bolo opísaných niekoľko HPLC metód s použitím SPE, alebo LLE v biologickom materiáli. Pri využití iónovo-párovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou bol najprv stanovený iba tramadol, neskôr aj jeho metabolit ODT s priemernou citlivosťou. Problémom bola prítomnosť balastných zlúčenín, ktoré sa síce objavili až po 40. minúte analýzy, ale mohli interferovať pri analýze ďalších vzoriek v rade. Riešením bolo pridanie premývacej fázy, ktorá však predĺžila celkový čas analýzy. Limitácia prietoku môže byť vyriešená pomocou monolitických kolón, keďže väčšina rutinne používaných metód nie je kratšia ako 15 minút. Tento spôsob umožňuje analýzu do 5 minút a možnosť stanoviť až 50 vzoriek denne. Vysokú selektivitu, presnosť a správnosť ponúka aj publikácia z roku 2016. Lineárny rozsah koncentrácií zodpovedá terapeutickým aj toxickým hladinám tramadolu a zavedený bol veľmi nízky limit detekcie/kvantifikácie. Celková analýza trvala o niečo dlhšie, než s použitím monolitickej kolóny.

Vzhľadom na prirodzenú fluorescenciu tramadolu a na základe literárnych zdrojov došlo k vývoju a validácii veľkého počtu nových HPLC metód s fluorescenčnou detekciou na stanovenie tramadolu a ODT v plazme. Použitie fluorescenčného detektora samo o sebe prispieva k zvýšeniu selektivity. Metódy využívajú jednoduché experimentálne podmienky s použitím SPE/LLE. Aplikácia tejto metódy (HPLC s fluorescenčnou detekciou) bola overená u pacientov liečených tramadolom a stala sa

teda užitočnou na kvantifikáciu terapeutických hladín tramadolu. [41]

Na kvantifikáciu tramadolu a ODT bola validovaná aj HPLC-DAD metóda. Citlivosť bola zvýšená použitím extrakčného postupu, ktorý viedol k vyčisteniu chromatogramov a vysokej extrakčnej účinnosti pre všetky analyty. Použitá metóda poskytuje vhodnú linearitu, presnosť a citlivosť s vysokým výťažkom analytu. Prezentovaná metóda ponúka oproti ostatným metódam lacný a ľahko dostupný nástroj na kvantifikáciu.

V porovnaní s predchádzajúcimi HPLC metódami, kde boli aplikované extrakcie (LLE-HPLC-FD/DAD), nemá HPLC-MS lepšiu citlivosť. Hlavnou výhodou je okrem krátkeho celkového času analýzy, príprava vzorky pomocou proteínovej precipitácie. Okrem jednoduchosti, ktorú táto príprava vzoriek poskytuje, má veľmi dobrú výťažnosť oboch analytov. Vďaka jednoduchej príprave je možná analýza veľkého počtu vzoriek, čím sa táto metóda stáva produktívnejšou a nákladovo efektívnejšou.

Najkratší čas analýzy sa podaril s použitím monolitckej kolóny u fluorescenčnej detekcie, zatiaľ čo najdlhší (24 min) bol nutný u spektrofotometrickej detekcie, kvôli online úprave vzoriek. Tá však oproti metóde bez úpravy pomohla zvýšiť výťažok a presnosť, rozšíriť lineárny rozsah koncentrácie a tým aj zlepšiť hodnoty ULOQ a LLOQ. Poskytla stanovenie iba samotného tramadolu. Okrem krátkej analýzy sa pomocou fluorescenčnej detekcie s monolitickou kolónou dosiahla aj najlepšia citlivosť a pomerne vysoký výťažok. Najlepší výťažok bol dosiahnutý u detekcie hmotnostným spektrometrom, vďaka už spomínanej úprave vzoriek precipitáciou. Presné hodnoty stanovení sú uvedené v tabuľke 1.

Metódy analyzované v tejto práci nepatria medzi jediné možnosti stanovenia liečiva, ale ide o metódy frekventované, citlivé a rýchle. Analyzované sú aj niektoré možnosti zlepšenia výsledkov jednotlivých stanovení.

Tabuľka 1 Prehľad HPLC stanovení tramadolu a ODT\*

HPLC metóda s:	Florescenčná detekcia	Florescenčná detekcia + monolitická kolóna	Spektrofotometrická detekcia	Spektrofotometrická detekcia + online úprava	Hmotnostná detekcia
<b>Lineárny rozsah koncentrácie (ng/ml)</b>	2,6-105	2,5-500 1,5-500	125-250	1-350	2,1-305 2,2-314
<b>LLOQ (ng/ml)</b>	10* 9	2,5* 1,25	125	1	2,1* 2,2
<b>ULOQ (ng/ml)</b>	105	500	250	350	300
<b>Príprava vzoriek</b>	LLE	LLE	LLE	SPE/LLE	precipitácia
<b>Presnosť (%)</b>	0,77-11,47* 2,47-7,73	2,5-9,7* 2,5-9,9	2,29-8,40* 1,89-10,91	2,6-3,8*	4,2-10,2* 2,9-10,3
<b>Návratnosť (%)</b>	86* 70	80,8* 87,3	83,51* 78,72	93,1*	96* 96
<b>Retenčný čas (min)</b>	4,35* 3,10	3,10* 1,30	3,42* 4,75	15,15*	3,50* 2,30
<b>Celkový čas analýzy (min)</b>	19	4,5	10	24	8
<b>Zdroj</b>	39	43	45	47	48

## 6 Záver

Bakalárska práca sa zaoberá liečivom tramadol, ktoré patrí medzi opioidné analgetiká. Ide o skupinu liečiv, ktoré vplyvajú na CNS pôsobením na špecifické receptory. V práci je popísaný nie len ich účinok, ale predovšetkým mechanizmus účinku tramadolu, jeho štruktúra a farmakokinetika. Dôležité sú jeho rozdiely nie len v účinku, ktoré sú dané prítomnosťou dvoch izomérov.

Nasleduje charakteristika chromatografie, jej vzniku a princípu separácie. Táto kapitola sa zaoberá najmä HPLC, ako často použíwanej fyzikálno-chemickej analytickej metódy. Popísaná je hlavne jej inštrumentácia spolu s vybranými typmi detektorov. Pozornosť je venovaná chirálnej separácii na jednotlivých chirálnych stacionárnych fázach, ktorá poskytuje dobré rozlíšenie enantiomérov

Analytická časť je zameraná na samotné stanovenie tramadolu a jeho hlavného metabolitu ODT pomocou HPLC s použitím reverznej stacionárnej fázy. Aplikovaná bola fluorescenčná, spektrofotometrická a hmotnostná detekcia. V publikovaných článkoch prevažuje HPLC metóda s fluorescenčnou detekciou, ktorá sa ukázala ako najvhodnejšia, pre stanovenie tramadolu. V jednotlivých článkoch nie je táto metóda vykonávaná za rovnakých podmienok. Dochádza k rozdielom nie len v inštrumentácii ale aj pri použití chemikálií (napr. vnútorný štandard). Keďže tramadol obsahuje benzénový kruh, detekcia pomocou UV nie je vhodná, kvôli nízkej selektivite a citlivosti. Tie je tiež možné zvýšiť hmotnostnou detekciou.

Stanovenie tramadolu je možné aj pomocou HPLC metódy s elektrochemickou detekciou, alebo plynovej chromatografie. Cieľom každého stanovenia je skrátiť čas celkovej analýzy, znížiť dávkovací objem vzoriek a zvýšiť citlivosť a selektivitu. Výsledky jednotlivých stanovení je možné zlepšiť použitím monolitických kolón, alebo online úpravou vzoriek. Porovnanie a prehľad výsledkov stanovení je zhrnutý v tabuľke.

## 7 Zoznam skratiek

CNS	centrálny nervový systém
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration)
ODT	O-demetyltramadol
NDT	N-demetyltramadol
M1	metabolit 1
M2	metabolit 2
CYP2D6	cytochróm 2D6
CYP3A	cytochróm P3A
P450	cytochróm P 450
NSAID	Nesteroidné protizápalové liečivo (Non-steroidal anti-inflammatory drug)
LC	Kvapalinová chromatografia (Liquid chromatography)
GC	Plynová chromatografia (Gas chromatography)
HPLC	Vysokočinná kvapalinová chromatografia (High -performance liquid chromatography)
PEEK	polyetereterketón
UV-VIS	ultrafialový-viditeľný (ultraviolet-visible)
DAD, PDA	Detektor s diódovým poľom (Diode Array Detector, Photodiode-array)
MS	hmotnostná spektrometria (mass spectrometry)
API	ionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization)
APPI	fotoionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization )
ESI	ionizácia elektrosprejom (electrospray ionisation)
APCI	chemická ionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
MALDI	ionizácia laserom za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization )
EI	elektrónová ionizácia (electron ionization)
CSP	chirálna stacionárna fáza (chiral stationary phase)



CD	cyklodextríny
OVM	ovomukoid
AGP	$\alpha$ 1-kyslý glykoprotein
BSA	hovädzí sérový albumín (bovine serum albumin)
diMeSA	N,N-dimetylsulfanilamid
IS	vnútorný štandard (internal standard)
LOQ	limit kvantifikácie (limit of quantification)
LOD	limit detekcie (limit of detection)
LLE	extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (liquid-liquid extraction)
SPE	extrakcia na tuhú fázu (solid-phase extraction)
MIPs	molekulárne vtlačené polyméry (molecularly imprinted polymers)
LLOQ	horný limit kvantifikácie (upper limit of quantification)
ULOQ	spodný limit kvantifikácie (lower limit of quantification)
ECDD	odborný výbor pre drogovú závislosť (Expert Committee on Drug Dependence)

## 8 Zoznam obrázkov

Obr. 1 Vzorec R a S racemátu tramadolu .....	12
Obr. 2 Hlavné metabolity tramadolu. ....	14
Obr. 3 Všeobecný vzorec aminokyselín .....	15
Obr. 4 Separácia zmesi v chromatografickom systéme. ....	18
Obr. 5 Schéma systému HPLC. ....	19
Obr. 6 Schéma PDA.....	23
Obr. 7 Schéma tvorby inklúzneho komplexu. ....	28
Obr. 8 Chromatogram ľudskej plazmy po orálnom podaní liečiva. ....	32
Obr. 9 Emisné spektrum tramadolu a diMeSA.....	33
Obr. 10 Excitačné spektrum pre tramadol a diMeSA.....	33
Obr. 11 Závislosť koncentrácie na čase tramadolu, M1 a M2 po podaní 100 mg tramadolu. .....	34
Obr. 12 Chromatogram plazmy dobrovoľníka 2,5 hod. po jednorazovom orálnom podaní 100 mg tramadolu. ....	35
Obr. 13 HPLC-DAD chromatogram ľudskej plazmy.....	36
Obr. 14 Schéma on-line testu tramadolu pomocou monolitckej kolóny spojenej s HPLC systémom. ....	38
Obr. 15 Chromatogram získaný po filtrácii 1 ml vzorky plazmy obohatenej s 50,0 ng/ml tramadolu čistiacim krokom so značenou monolitickou kolónou. ....	39
Obr. 16 Chromatogram získaný po filtrácii 1 ml vzorky moču obohatenej s 50,0 ng/ml tramadolu čistiacim krokom so značenou monolitickou kolónou. ....	40
Obr. 17 Chromatogram plazmy 1,5 hod. po orálnom podaní tramadolu.....	42
Obr. 18 Chromatogram enantiomérov tramadolu a ODT.....	42

## 9 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Prehľad HPLC stanovení tramadolu a ODT* .....	46
---	----

## 10 Zoznam citovanej literatúry

1. HYNIE, S. *Psychofarmakologie v praxi*. Galén. 1995. 250-275. ISBN 80-85824-17-5.
2. KULICHOVÁ, M. *Opioidné analgetiká v liečbe nádorovej bolesti*. 2017. [online] [cit. 10-02-2019].  
Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/a8511c4eb046ce2b7f2e14aa141dd99c.pdf>
3. Brochures and Fact Sheets | National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) [online] [cit. 11-02-2019].  
Dostupné z: <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh21-2/132.pdf>
4. [online] [cit. 13-02-2019].  
Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Opioidn%C3%AD\\_analgetika](https://www.wikiskripta.eu/w/Opioidn%C3%AD_analgetika)
5. GODFRAIND, T. et al. *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. IUPHAR Media Ltd. 1998. 1 219-220 ISBN 0 9533510 0 9
6. SUCHOPÁR, J. et al. *Remedia compenium*. Panax. 1997. 2 601- 604. ISBN 80-902126-3-8.
7. Tramadol History and Statistics - DrugAbuse.com. Drug Abuse Treatment – Alcohol and Substance Abuse Programs [online] Copyright © DrugAbuse.com 2019. All Rights Reserved [cit. 21-02-2019].  
Dostupné z: <https://drugabuse.com/tramadol/history-statistics/>
8. WHO | *World Health Organization* [online]  
Dostupné z: [https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/6\\_1\\_Update.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/6_1_Update.pdf)
9. VAZZANA, M. et al. *Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery system*. 2015. Elsevier Masson SAS. 0753-3322.
10. DOLEŽAL, M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum. 2013. 1 121-133. ISBN 978-80-246-2382-5.
11. KANAAN, M. et al. *Uptake/Efflux Transport of Tramadol Enantiomers and O-desmethyl-Tramadol: Focus on P-glycoprotein* *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2009. **105**(4), 199-206 [cit. 22-2-2019] DOI: 10.1111/j.1742-7843.2009.00423.x. ISSN 17427835.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-7843.2009.00423.x>
12. MATOUŠKOVÁ, O. Digitální repozitář UK [online]. Copyright ©Ec [cit. 22.02.2019].

- Dostupné z:  
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/47300/140008566.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
13. [online] [cit. 24-02-2019]  
Dostupné z: <file:///C:/Users/Nat%C3%A1lia/Downloads/tramal-retard-tablety-100-mg-spc.pdf>
  14. CHYTIL, L. Digitální repozitář UK [online] Copyright © [cit. 08.03.2019]  
Dostupné z:  
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/31651/140000946.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  15. DOSTÁLEK, M. et al. *Farmakokinetika*. 2006. 1 119-120 ISBN 80-247-1464-7.
  16. KOZÁK, J. et al. *Opioidy v léčbě bolesti*. Mladá fronta a. s., 2009. 65-70. ISBN 978-80-204-2122-7.
  17. DOUŠA, M. Chirální separace [online] [cit. 13-03-2019] Dostupné z:  
<http://www.hplc.cz/chiral/index.htm>
  18. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/goldbook>
  19. SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicological Sciences*. 2009, 110(1), 4-30. 20.
  20. ČERVINKA, O. Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické listy*. 1999, 93, 294-305.
  21. MUSTAFA, S. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY BY Dr Sana Mustafa Assistant Professor Dept of. [online] Copyright © 2019. Course Hero, Inc. [cit. 18-03-2019].  
Dostupné z: <https://www.coursehero.com/file/13176783/high-performance-liquid-chromatography-hplc-by-dr-sana-mustafa/>
  22. NOVÁKOVÁ, L. et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint a.s., 2013. 1 11-83. ISBN 978-80-260-4243-3.
  23. SNYDER, R. L.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, W. J. *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley & Sons, Hoboken 2010. ISBN 978-0-470-17754-0.

24. CVAČKA, J. *Vysokoúčinná kapalinová Chromatografie*. 2011 [online]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>
25. DOLAN, J. W. How Does It Work? Part 1: Pumps. LCGC Asia Pacific. 2016, 19(2), 16-19.
26. DOLAN, J. W. How Does It Work? Part 3: Autosamplers. LCGC Europe. 2016, 29(7), 370-374.
27. DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2002. ISBN 80-86548-09-0.
28. DOUŠA, M. *Chromatografická kolona* [online] [cit. 25-03-2019] Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/hplc\\_column.html](http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html)
29. SWARTZ, M. *HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW*. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2010, 33(9-12), 1130-1150.
30. DOLAN, J. W. How Does It Work? Part 4: Ultraviolet detectors. LCGC Europe. 2016, 29(8), 436-441.
31. [online] [cit. 28-03-2019]  
Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc-blog-diode-array-detector-settings-five-minutes-change-your-chromatography-forever>
32. HOLPAČEK, M. Mass Spectrometry Group at Univesity of Pardubice [online] [cit. 30-03-2019].  
Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)
33. ABOUL-ENEIN, H. Y. *High-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases*. J. Chromatogr. A, 2001, 906(1-2), 185-193.
34. WARD, T. J.; FARRIS A. B. *Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review*. J. Chromatogr. A, 2001, 906(1-2), 73-89.
35. SUBRAMANIAN, G. *A practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. 1994. 11-12 ISBN 3-527-28288-2.
36. KALÁT, M. *Nanočásticové senzorové systémy*. Diplomová práce. DSpace Home [online] [cit. 15-04-2019]. Dostupné z: [https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/22116/Nanocasticove\\_senzorove\\_systemy\\_-\\_Michael\\_Kalat%2C\\_DP%2C\\_TUL\\_2017.pdf?sequence=1](https://dspace.tul.cz/bitstream/handle/15240/22116/Nanocasticove_senzorove_systemy_-_Michael_Kalat%2C_DP%2C_TUL_2017.pdf?sequence=1)
37. GU, Y., FAWCETT P. *Improved HPLC method for the simultaneous determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma*. 2005.

- Elsevier science. *Journal of Chromatography B*, 821 (2005) 240-243. Doi:10.1016/j.jchromb.2005.05.003.
38. NOBILIS, M. et al. *High-performance liquid chromatographic determination of tramadol in human plazma*. 1996. Elsevier science. *Journal of Chromatography B*, 681. 177-183. SSI 0378-4247(95)00522-6.
39. NOBILIS, M. et al. *High-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its O-desmethyl metabolite in blood plasma. Application to a bioequivalence study humans*. 2002. Elsevier Science. PII: S0021-9673(01)014567-9.
40. ZHOU, X., LIU, J. *Fluorescence detection of tramadol in healthy Chinese volunteers by high-performance liquid chromatography amd bioequivalence assessment*. 2015. *Drug Design, Development and Therapy*. 9 1225-1231.
41. BACONI, D. *Determination of Tramadol in human plasma HPLC with fluorecence detecion*. 2016. *J Mind Med Sci.* 3(1) 55-64.
42. DYDERSKI, S. et al. *Bioavailability of tramadol hydrochloride from tramadol - capsules 50 mg*. 2001. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 58(5) 345-349. ISSN 0001-6837.
43. ROUINI, M. et al. *Development and validation of a rapid HPLC method for simultaneous determination of tramadol, and its two main metabolites in human plasma*. Elsevier science. *Journal of Chromatography B*, 830 (2006) 207-211. Doi:10.1016/j.jchromb.2005.10.039.
44. CURTICAPEAN, A. et al. *Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in human plazma*. Elsevier science. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2008) 1304-1312. Doi:10.1016/j.jprot.2008.01.012.
45. MAHA, A. *Simultaneous Determination of Tramadol and O-Desmethyltramadol in Human Plasma Using HPLC–DAD*. *Journal of Chromatographic Science* (2014) 52 1186–1192 Doi:10.1093/chromsci/bmt174.
46. HILAL, M. *Simultaneous Determination of Tramadol and O-Desmethyltramadol in Human Plasma Using HPLC–DAD*. *Journal of Chromatographic Science* (2014) 52:1186–1192. Doi:10.1093/chromsci/bmt174.
47. JAVANBAKHT, M. et al. *On-line clean-up and determination of tramadol in human plasma and urine samples using molecularly imprinted monolithic column*

- coupling with HPLC*. Elsevier science. Journal of Chromatography B, 911 (2012) 49-54. Doi:10.1016/j.jchromb.2012.10.019.
48. VLASE, L. et al. *Determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Talanta 75 (2008) 1104-1109 Doi:10.1016/j.talanta.2008.01.006.
49. LIU, P. et al. *Development and validation of a sensitive LC-MS method for the determination of Tramadol in human plasma and urine*. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics 2009, Vol. 34, No. 3&4, pp. 185-192.
50. CHYTIL, L. et al. *Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection*. 2012. Elsevier science. Journal of Chromatography B, 878 (2010) 481-486. Doi:10.1016/j.jchromb.2009.12.005.
51. ZHANG, H. et al. *The Investigation of Tramadol Dependence with No History of Substance Abuse: A Cross-Sectional Survey of Spontaneously Reported Cases in Guangzhou City, China*. National Center for Biotechnology Information 2013 [online] [cit. 06-05-2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3787562/>.