

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

## **Mikroextrakce oxazepamu tuhou fází z plasmy**

Rigorózní práce

Hradec Králové, 2010

Mgr. Martin Raška

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001

Mgr. Martin Raška

Děkuji panu Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při sestavování rigorózní práce. Zároveň bych rád poděkoval i dalším členům katedry za ochotu při vypracování praktické části této práce.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	8
2.1.1 Teorie vysokoúčinné kapalinové chromatografie .....	8
2.1.2 Provedení kapalinového chromatografu .....	11
2.2 Analýza biologického materiálu .....	15
2.2.1 Zpracování biologického materiálu .....	15
2.2.2 Extrakční procesy při úpravě vzorků biologického materiálu .....	17
2.2.2.1 Extrakce kapalina-kapalina .....	17
2.2.2.2 Extrakce tuhou fází .....	18
2.2.2.3 Mikroextrakce tuhou fází .....	24
2.2.3 Porovnání SPME a dalších extrakčních metod .....	29
2.3 Validace analytických metod .....	33
2.3.1 Přesnost stanovení .....	34
2.3.2 Správnost stanovení .....	34
2.3.3 Linearita .....	35
2.3.4 Selektivita .....	36
2.3.5 Robustnost .....	36
2.3.6 Detekční a kvantitativní limit .....	38
2.4 Benzodiazepiny .....	39
2.4.1 Oxazepam .....	41
2.5 Rešerše .....	42
3. CÍL PRÁCE .....	46
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	48
4.1 Použitý materiál .....	49
4.2 Příprava standardů a vzorků .....	51
4.3 Provedení extrakce PDMS/DVB vláknem .....	52

4.4 Provedení HPLC analýzy .....	53
5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	54
5.1 Výběr optimálních chromatografických podmínek .....	55
5.2 Optimalizace podmínek extrakce .....	57
5.2.1 Porovnávání výtěžků při různých časových schématech .....	57
5.2.2 Porovnávání výtěžků při různých hodnotách pH plasmatického roztoku ....	62
5.2.3 Kvantitativní hodnocení oxazepamu obsaženého v plasmatickém roztoku ..	63
5.3 Validace metody extrakce PDMS/DVB vláknem .....	67
5.3.1 Přesnost metody .....	67
5.3.2 Správnost metody .....	69
5.3.3 Linearita .....	70
5.3.4 Selektivita .....	70
5.3.5 Robustnost .....	75
5.3.6 Detekční a kvantitativní limit .....	79
6. ZÁVĚR .....	83
7.LITERATURA .....	86
8. POUŽITÉ ZKRATKY .....	89
ABSTRAKT (česká verze) .....	91
ABSTRAKT (anglická verze) .....	92

## **1. ÚVOD**

Biologický materiál je cenným zdrojem informací o vlastnostech léčivých látek. Zkoumáním takového materiálu lze získat data nejen o toxikologických parametrech cílové látky, ale vhodně se dá využít rovněž k studiím farmakologickým. Paleta biologických materiálů je velmi široká a zahrnuje vzorky krve, krevního sera, plazmy, moči nebo slin. Každá z nich má své charakteristické vlastnosti a pro všechny je pak totožné, že se jedná o komplikované směsi obsahující různé složky, jež se navzájem ovlivňují.

Z podstaty struktury biologického materiálu vyplývá, že pro analýzu v něm obsažených cílových látek je potřeba vzorek před samotnou analýzou podrobit vhodné úpravě. Z moderních metod k tomu užívaných je třeba jmenovat zejména extrakce typu kapalina-kapalina (LLE), extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME). Mikroextrakci tuhou fází lze zjednodušeně charakterizovat jako jednoduchou a účinnou sorpční a desorpční techniku zakoncentrování analytu, která se obejde bez užití rozpouštědel nebo komplikovaných aparatur. K jejímu provedení je zapotřebí kromě klasických laboratorních pomůcek pouze křemenného vlákna s vhodným povrchem tvořeným polymerní látkou, která zde hraje roli tuhé fáze.

Jednoduchá aparatura pro provádění SPME umožňuje její napojení přímo na systém, kterým je cílová látka následně analyzována. Tímto systémem bývá ve velkém počtu případů vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která díky své vysoké citlivosti a selektivitě dnes patří mezi nejpoužívanější chromatografické metody. Separaci látek a vytvoření reprodukovatelného záznamu lze její pomocí provést efektivně ve velmi krátkém časovém horizontu. Analyzovat se tímto způsobem dá široká skupina látek od nízkomolekulárních až po ty s vyšší relativní molekulovou hmotností.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**



## **2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**<sup>[1,2,3,4]</sup>

### **2.1.1 Teorie vysokoúčinné kapalinové chromatografie**<sup>[1]</sup>

Podstata vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spočívá v elučním vyvíjení, které je zaznamenáno v podobě eluční křivky (píku) charakteristické pro danou látku ve výsledném chromatogramu. Prováděný proces začíná nanesením směsi dělených látek na kolonu. Ty jsou následně unášeny mobilní fází kolonou a při tom interagují se stacionární fází (rozdělováním, adsorpcí atd.) a zpětně přecházejí do mobilní fáze, se kterou mohou rovněž interagovat. Tento proces se mnohonásobně opakuje a dostatečná odlišnost distribučních konstant jednotlivých dělených látek zaručí po určité době jejich částečné nebo úplné rozdělení do izolovaných pásů. Oddělené látky nakonec kolonu opouštějí v různém retenčním (elučním) čase, jenž závisí na velikosti jejich interakcí se stacionární fází.<sup>[1]</sup>

Každou látku dělenou pomocí HPLC charakterizují základní veličiny, kterými jsou retenční čas  $t_R$ , jenž vyjadřuje dobu od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky, nebo retenční objem  $V_R$ , který vyjadřuje objem mobilní fáze proteklé za tuto dobu. Tyto dvě veličiny spolu souvisejí, což je vystiženo následujícím vzorcem:<sup>[1]</sup>

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

( $F_M$  – objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času)

Retenční objem se skládá ze součtu dvou objemových veličin, kterými jsou redukovaný retenční objem  $V'_R$  a mrtvý objem představující celkový objem  $V_M$ . Ten zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor.<sup>[1]</sup>

Účinnost dělení lze vyjádřit užitím několika následujících veličin, které vystihují kvantitativní i kvalitativní vztahy mezi dvěma separovanými látkami. V první řadě se jedná o relativní ostrost  $\alpha$  a relativní dělení dvou látek  $S_{1,2}$ , které jsou dány následujícími vzorci:<sup>[1]</sup>

$$\alpha = V_{R2} / V_{R1}$$

( $V_V$  – šířka píku v základně vyjádřená v jednotkách objemu)

$$S_{1,2} = (V_{R2} - V_{R1}) / V_{R2}$$

( $V_{R1}$  – retenční objem dělené látky 1,  $V_{R2}$  – retenční objem dělené látky 2)

Pokud je ze dvou výše uvedených veličin relativní ostrosti a relativního dělení dvou látek utvořen jejich součin, pak se dojde k relativní účinnosti kolony. K vyjádření účinnosti dělení je ještě využita další veličina rozlišení, jejíž výpočet je dán následujícím vzorcem: <sup>[1]</sup>

$$R_{1,2} = 2 (V_{R2} - V_{R1}) / (Y_{V1} + Y_{V2})$$

Tímto způsobem lze hodnotu rozlišení vypočítat, ovšem nelze z toho zjistit veličiny, jež tuto hodnotu ovlivňují. To je ovšem pro podstatu chromatografického procesu a zjištění způsobu, jakým zásahem do systému separaci zlepšit, důležité. Jednou z těchto veličin ovlivňujících rozlišení je kapacitní poměr, dalšími pak distribuční konstanta a účinnost. Kapacitní poměr je charakterizován následujícím vztahem: <sup>[1]</sup>

$$k = K_D \cdot V_S / V_M$$

( $K_D$  – distribuční konstanta,  $V_S$  – objem stacionární fáze,  $V_M$  – mrtvý objem)

V praxi se dá kapacitní poměr vypočítat ze zjednodušeného vztahu, který vyjadřuje, kolikrát je retenční objem separované látky větší než mrtvý objem: <sup>[1]</sup>

$$k = (V_R - V_M) / V_M$$

U rozlišení není při volbě ideálních podmínek podstatné dosáhnout co nejvyšší hodnoty, daleko podstatnější je docílení potřebného rozlišení v přijatelné době. S rostoucím rozlišením stoupají požadavky na trvání analýzy a pracovní tlak a to není žádoucí. Zpravidla se dá za dostačující označit dosažení rozlišení  $R_{1,2} = 1$ , kdy se vzdálenost mezi maximy obou píků právě rovná střední šířce píku a píky se jen nepatrně překrývají. Při hodnotě 1,5 již lze dosáhnout dokonalého rozdělení obou píků až na základní linii. Větší rozlišení pak vede ke zbytečnému prodlužování doby analýzy. Po úpravě výše uvedeného vzorce pro rozlišení za využití hodnot kapacitního poměru, retenčního poměru a počtu teoretických pater, vyvstává následující vztah: <sup>[1]</sup>

$$R_{1,2} = 1/4 (r_{1,2} - 1) / r_{1,2} \sqrt{n_{ef}}$$

$$n_{ef} = n [k/(1+k)]^2 - \text{efektivní počet pater kolony}$$

K hodnocení vzniklého chromatogramu coby výstupu měření lze využít několik veličin. Jednou z nich je faktor symetrie, který hodnotí kvalitu píku z hlediska vzájemné symetrie jeho dvou částí, vzestupné a sestupné. Ideální hodnotou značící naprostou symetrii píku je 1,0. Vypočítat faktor symetrie lze následujícím způsobem: <sup>[1]</sup>

$$A_S = w_{0,05} / 2d$$

( $w_{0,05}$  – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky,  $d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky)

V případě, kdy se nečistota od stanovované látky neoddělí úplně, lze využít jako kritérium způsobilosti systému poměr výšky píku k sedlu, jenž se vypočítá z tohoto vztahu: <sup>[1]</sup>

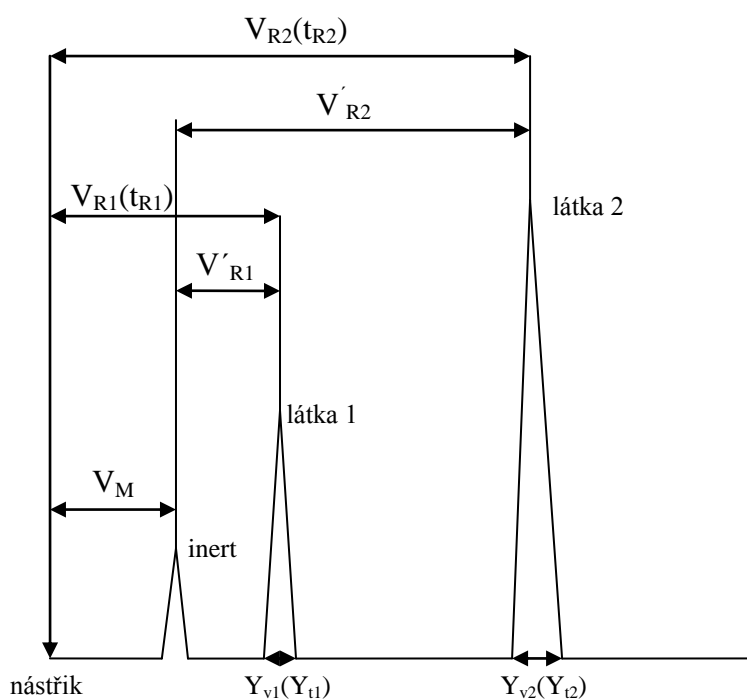
$$p/v = H_p / H_v$$

( $H_p$  – výška píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií,  $H_v$  – výška nejnižšího bodu křivky oddělující pík nečistoty od píku stanovované látky nad extrapolovanou základní linií)

Přesnost stanovení je ovlivněna poměrem signálu k šumu, který tak hraje při stanovování obsahu složek důležitou roli. Získat jej lze z následujícího vzorce: <sup>[1]</sup>

$$S/N = 2H / h$$

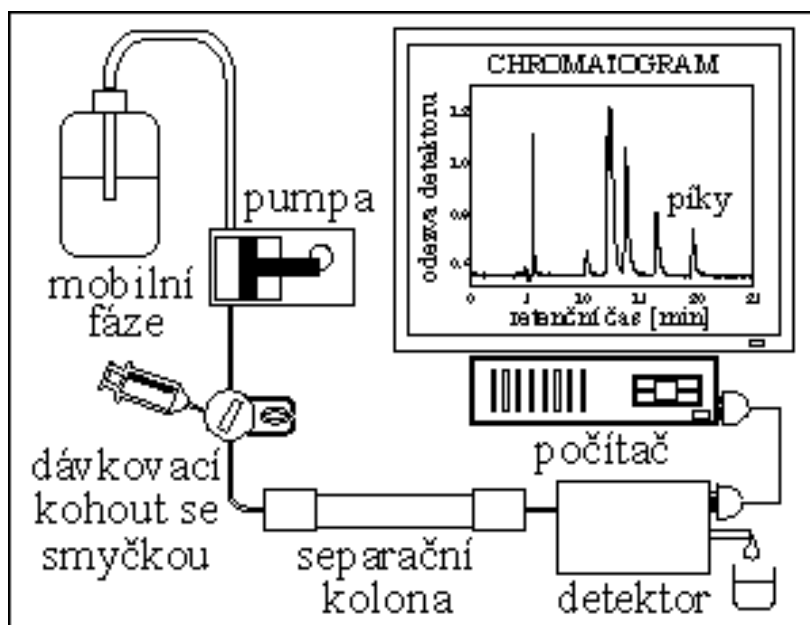
( $H$  - výška píku,  $h$  – rozpětí šumu pozadí)



**Obr. č. 1** - Vzhled chromatografického záznamu dvou látek a nesorbujícího se inertu <sup>[1]</sup>

## 2.1.2 Provedení kapalinového chromatografu<sup>[1,2,3,4]</sup>

Každý kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zajišťují čtyři základní úkony. Těmito úkony jsou transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separace látek a jejich detekce. Tyto úkony zajišťující základní části je možno vidět na obr. č. 2. Chromatograf nemusí pokaždé obsahovat pouze tyto uvedené části a odlišnosti lze nacházet samozřejmě i mezi různě starými zařízeními. Ovšem v zásadě musí být dodrženo řazení základních částí takto za sebou. Podstatnou roli hraje i napojení jednotlivých součástí. Spojení mezi nástřikovým zařízením, kolonou a detektorem by měly být konstruovány s ohledem na to, aby vzniklé mrtvé objemy způsobující rozšiřování elučních křivek nad únosnou míru byly co nejmenší.<sup>[1]</sup>



Obr. č. 2 - Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu<sup>[2]</sup>

### **Kolony**

Výběr správné kolony hraje při měření pomocí HPLC rozhodující roli. Její účinnost závisí kromě kvality použitého materiálu i na její délce, tvaru, vnitřním povrchu a v neposlední řadě pochopitelně materiálu, ze kterého je zhotovena. Na výrobu kolon se používá různých materiálů, z nichž je třeba jmenovat nerezovou ocel nebo borosilikátové

sklo. Skleněné kolony jsou oproti odolnějším ocelovým daleko citlivější na hodnotu maximálního tlaku. Ve výjimečných případech se k zhotovení kolony užívá rovněž plastického polymeru umístěného do speciálního kovového pouzdra. Zásadní vliv na účinnost kolony má materiál, jímž je naplněna, neboť právě tato část kolony přichází do styku s analyzovaným vzorkem a protékající mobilní fází. Velikost zrn se u dnes používaných kolon pohybuje zpravidla do 10  $\mu\text{m}$ , ovšem je zde trend používat kolony s velikostí zrn do 5  $\mu\text{m}$ . Délka analytických kolon se pohybuje v rozmezí 10 – 20 cm, přičemž současné trendy směřují k jejich dalšímu zkracování. <sup>[1]</sup>

Klasické částicové kolony o velikosti zrn 3 – 5  $\mu\text{m}$  vykazují výbornou separační účinnost, ovšem se snižující velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, což negativně ovlivňuje maximální použitelnou rychlost průtoku. Pro používání při značně vysokých rychlostech průtoku mobilní fáze bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň ztráty separační účinnosti, a to i pro separované makromolekuly (bílkoviny nebo syntetické polymery), lze využít monolitických kolon. Tyto kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje jejich vnitřek. V monolitických kolonách se objevují dva typy pórů. Jednak jsou to velké póry (makropóry) zajišťující rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlující přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Druhý typ pórů jsou ty středně velké (mesopóry) poskytující monolitu dostatečně veliký povrch a tím vysokou separační kapacitu. Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se monolitické stacionární fáze rozdělují na anorganické monolity, makroporézní polymerní monolity a stlačitelné monolity (komprimované gely). <sup>[3]</sup>

## **Detektory**

Detektor je část chromatografu, jehož úkolem je indikace látek vycházejících z kolony. Pomocí vhodného snímače sledují některou z vlastností eluátu a signál pak vysílají do koncového zařízení, kterým je počítač. Výsledkem je pak záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. Detektory se v zásadě rozlišují na dva typy. U univerzálního je signál úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku obsahujícího mobilní fázi a daný vzorek. V případě selektivního je signál dán pouze koncentrací detekovaného vzorku. Chromatograf by měl být správně vybaven oběma typy detektorů. <sup>[1]</sup>

Na detektor jsou kladeny různé požadavky, které lze shrnout do následujících bodů: <sup>[1]</sup>

- linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysoká citlivost
- co nejmenší mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- malá citlivost vůči změnám průtoku mobilní fáze, tlaku a teploty
- umožnění provádění gradientové eluce

Další možností dělení detektorů je podle okamžité odezvy, která v prvním případě na rychlosti přívodu mobilní fáze se separovanou látkou do detektoru závisí. Takový typ detektorů se označuje jako koncentrační. Druhým příkladem jsou detektory, kde okamžitá odezva na rychlosti stejně jako na jejich výkyvech závislá není. V tomto případě se jedná o hmotnostní typ. Hlavní rozdělování detektorů ovšem probíhá na základě měřených veličin. Takový způsob rozdělování je uveden v tab. č. 1.<sup>[1]</sup>

Měřená veličina	Detektor
absorpce záření	spektrofotometrický
index lomu	refraktometrický
fluorescence	fluorimetrický
elektrolytický proud	polarografický
elektrická vodivost	vodivostní
permitivita	kapacitní, permitivitní
elektrodový potenciál	potenciometrický
ionizační proud	transportní s plamenoionizační detekcí
sorpční teplo (teplota)	mikroadsorpční
radioaktivita	radiometrický

**Tab. č. 1** – Rozdělení detektorů podle měřených veličin<sup>[1]</sup>

## ***Spektrofotometrické detektory***

Podstatou funkce spektrofotometrických detektorů je proměřování absorbance elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu procházejícího celou detektorem. Detektory spadající do této skupiny se vyznačují značnou citlivostí ( $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  g/ml) a lze jich využít rovněž při gradientové eluci. K měření se teoreticky dá využít celého spektra elektromagnetického záření od ultrafialové oblasti až po infračervené záření. Poslední jmenované oblasti se však využívá minimálně, jelikož tam absorbuje většina rozpouštědel, což není žádoucí. U barevných látek je možné rovněž využít detektorů pro oblast viditelného světla. Zdaleka největší zastoupení nejen v této skupině, ale i mezi detektory obecně mají ultrafialové detektory.<sup>[1]</sup>

Nejjednoduššími a cenově nejpříjemnějšími UV detektory jsou ty s fixní vlnovou délkou. Nejčastěji se jedná o hodnoty 254 nebo 280 nm, neboť při těchto vlnových délkách absorbuje většina léčiv. U dalšího typu UV detektorů se dá vlnová délka libovolně podle potřeby měnit. Scanning UV detektor pak umožňuje během několika sekund snímat absorpční spektrum v maximu píku analyzovaného léčiva. Vrcholem této skupiny je Diode array detektor, který umožňuje na základě řízení počítačem vytvářet trojrozměrnou projekci. Snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při více vlnových délkách a porovnává poměry absorbancí. Toho je dosaženo diodovým polem složeným z množství fotosenzitivních diod umístěných vedle sebe a vzájemně izolovaných formou vícevrstevné struktury. Každá z diod je velká jen několik tisícín palce. Detektor umožňuje výstup každé z nich skenovat, ukládat a zároveň zpracovávat počítačem mnoha různými způsoby.<sup>[1,4]</sup>

## ***Detekce hmotnostní spektrometrií***

Při tomto způsobu detekce napřed dochází po výstupu eluátu z kolony k odstranění mobilní fáze a převedení analyzované látky do plynného stavu. Molekuly látky jsou pak v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. V magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli dochází k rozdělení nabitých částic podle poměru hmotnosti a náboje a jako výstup je zaznamenáno jejich hmotnostní spektrum. Tento finančně dosti náročný způsob detekce je vysoce citlivý a vysoce selektivní.<sup>[1]</sup>

## **2.2 Analýza biologického materiálu**<sup>[5,6,7,8,9,10,11,12]</sup>

### **2.2.1 Zpracování biologického materiálu**<sup>[5]</sup>

Analýza vzorků biologického materiálu skýtá mnoho úskalí a takové vzorky musejí být před samotnou analýzou upraveny, aby k ní vůbec mohlo dojít. Důvodem těchto komplikací je fakt, že biologický materiál tvoří zpravidla velmi komplikovaná směs vzájemně se ovlivňujících složek. Ty pak působí na chování analytu a vlastní průběh reakce, přičemž výsledky analýzy mohou ovlivnit ve smyslu falešného zvýšení i snížení výsledků. Hlavní roli zde sehrává přítomnost bílkovin s jejich možností tvorby vazeb, stav komplexu udržujícího pH s jeho odchylkami a pufrovací kapacitou, parciální tlaky plynů v nativním systému a další. Nelze zanedbat ani přítomnost dost rozsáhlého množství organických a anorganických látek i celou řadu fyzikálně chemických vlastností celého prostředí.<sup>[5]</sup>

Nežádoucího obsahu bílkovin v analyzovaném biologickém vzorku se dá zbavit deproteinačním procesem. Ten musí splňovat tři základní podmínky, kterými jsou:<sup>[5]</sup>

- kompletní odstranění proteinů včetně těch o malé molekulové hmotnosti
- samotný precipitát nesmí adsorbovat na svůj povrch sledované léčivo
- deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo, ovlivňovat další postupy (např. extrakci), interferovat při vlastní detekční reakci a ani jinak nesmí ovlivňovat analytickou výtěžnost

Zároveň je však třeba přihlídnout k faktu, že část daného analyzovaného léčiva je ve formě volné a část vázána na bílkoviny. Po deproteinaci je však analyzováno celkové množství léčiva získané z obou částí.<sup>[5]</sup>

Ke zbavení se bílkovin z materiálu lze využít třech deproteinačních technik, kterými jsou deproteinační precipitační, enzymová a ultrafiltrace. Základem první jmenované techniky je proces precipitace, během něhož dochází k vysrážení proteinové složky z biologického vzorku. K tomuto účelu se dá využít kyselin (trichloroctové, metafosforečné koncentrované nebo chlorovodíkové koncentrované), těžkých kovů (síran zinečnatý, hydroxid lithný, wolfram sodný, chlorid rtuťnatý nebo chlorid hlinitý) a organických rozpouštědel (ethanol koncentrovaný v dvojnásobném množství vůči vzorku, acetonitril v 1,5násobném poměru nebo methanol či aceton). V enzymové deproteinaci dochází ke kýženému procesu za užití enzymů jako subtilisinu, trypsinu, papainu nebo ketodasy. V obou výše uvedených technikách



dochází po jejich provedení k uvolnění složky léčiva vázané na bílkoviny do supernatantu. Naopak při ultrafiltraci zůstává vázaná složka léčiva společně s proteiny na stejné membráně a membránou prošlý ultrafiltrát obsahuje jen volnou složku. Zachycené molekuly se dají roztrždit podle jejich hmotnosti vhodnou volbou velikosti pórů membrány. <sup>[5]</sup>

Vedle dříve nejčastěji používaných materiálů krve a moči dnes nacházejí uplatnění rovněž sliny, likvor, mateřské mléko, slzy, žluč, pot a stolice. Krev je i přes značnou složitost své soustavy používána nejčastěji. Při jejím zpracování je třeba dbát na dodržení izotonie ředícího roztoku, opatrné zacházení s teplotními výkyvy (zahřátí a zmrazení) a ubránění se mechanickému poškození (nešetrný odběr, úzké jehly, vysoký podtlak při odběru, tlak při míchání, centrifugace apod.). Stáním krve (zhruba po dobu 1 – 2 hodin) dochází k vysrážení a oddělení krevního koláče a vzniká tak další z používaných materiálů, krevní sérum. U něho je potřeba dávat pozor při odběru, aby nedošlo k jeho promísení se zbytky krevního koláče. V případě maloobjemových materiálů se dá využít přípravku hydrofobní povahy (silikonový gel), který po přidání a odstředění vytvoří mezi sérem a krví pevný prstenec uzavírající krevní koláč. Dalším materiálem získaným z krve je plazma. Zde přidáním antikoagulačních přísad (heparin, EDTA, citrát sodný, oxalát sodný a amonný nebo fluorid sodný) do vzorku krve nedojde k vysrážení fibrinogenu na fibrin a tím ani ke vzniku krevního koláče, čímž se získá materiál schopný okamžitého dalšího zpracování. Plazma se snadněji dělí centrifugací a objemový zisk vzorku je oproti séru větší. <sup>[5]</sup>

## **2.2.2 Extrakční procesy při úpravě vzorků biologického materiálu**<sup>[6,7,8,9,10,11,12]</sup>

K úpravě kapalných vzorků před jejich následným podrobením analýze lze využít několik různých metod, mezi které se počítá i rozpouštění, odpařování, destilace nebo lyofilizace. V případě, že je následně vzorek analyzován pomocí HPLC, se však nejčastěji využívá metod extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME).

### **2.2.2.1 Extrakce kapalina-kapalina**<sup>[6]</sup>

Při extrakci kapalina-kapalina (LLE) dochází k rozdělování složek analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, z nichž jednu zpravidla tvoří voda a druhou pak organické rozpouštědlo. Do vodní složky přecházejí látky více hydrofilní, zatímco do organické části se extrahují látky více hydrofobní. Analyty extrahované do vodné fáze je možné následně přímo nastříknout na kolonu HPLC s reverzní fází. Látky z organické fáze se před dalším použitím jednoduše získají odpařením rozpouštědla. Na použitá organická rozpouštědla jsou při jejich užití v LLE kladeny následující nároky:<sup>[6]</sup>

- nízká rozpustnost ve vodě (< 10%)
- těkavost umožňující jednoduché odstranění a tím zvýšení koncentrace po extrakci
- kompatibilita s detekcí pomocí HPLC, která je následně využita k provedení analýzy (vyhnout se rozpouštědlům silně absorbujícím UV záření)
- polarita a schopnost tvorby vodíkových můstků zvyšující výtěžek analytu v organické fázi
- vysoká čistota kvůli minimalizaci kontaminace vzorku

Během extrakčního procesu nastane v určitém momentu rovnovážný stav, během kterého může výrazný podíl analyzované látky zůstat v obou fázích. Tento fakt pochopitelně výrazně limituje použitelnost metody za daných podmínek. K zlepšení výtěžku extrakce a potlačení nežádoucího extrahování nečistot lze využít úpravy pH, iontových vazeb, tvorby komplexů a dalších metod.<sup>[6]</sup>

Teoretický podklad procesu LLE vychází ze základního Nernstova rozdělovacího zákona, jenž charakterizuje rozdělení látky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze a je vyjádřen následující rovnicí:<sup>[6]</sup>

$$K_D = C_0/C_{aq}$$

( $K_D$  – distribuční konstanta,  $C_0$  – koncentrace látky v organické fázi,  $C_{aq}$  – koncentrace látky ve vodné fázi)

Výstižnější vyjádření podílu analytu extrahovaného do organické složky lze získat z následující rovnice: <sup>[6]</sup>

$$E = C_0V_0 / (C_0V_0 + C_{aq}V_{aq}) = K_DV / (1 + K_DV)$$

( $E$  – podíl extrahovaného analytu,  $V_0$  – objem organické fáze,  $V_{aq}$  – objem vodné fáze,  $V$  – fázový poměr  $V_0/V_{aq}$ )

Extrakce se v případě biologického materiálu provádí v zábrusových zkumavkách a za použití menších objemů vzorku. Pro extrakce s jedním krokem, jaké jsou typické pro biologický materiál, musí být distribuční konstanta  $K_D$  vysoká (tj.  $> 10$ ), aby došlo ke kvantitativnímu rozdělení analytu (tj.  $> 99\%$ ) do jedné z fází. Současně s tím musí fázový poměr  $V$  zůstat v prakticky použitelném rozmezí hodnot  $0,1 - 10$ . K dosažení zvýšení hodnoty distribuční konstanty je možné využít několik následujících kroků. První z nich je změna organického rozpouštědla. U iontových a ionizovatelných analytů se jedná o potlačení jejich ionizace, čímž dojde k zvýšení jejich rozpustnosti v organické fázi. Tyto analyty je možné rovněž vypárovat do organické fáze přidáním reagens o opačném náboji. Zvýšení hodnoty distribuční konstanty lze dosáhnout i vysolováním za užití neutrální soli (např. síranu sodného), přičemž dojde ke snížení koncentrace analytu ve vodné fázi. <sup>[6]</sup>

### **2.2.2.2 Extrakce tuhou fází**<sup>[6]</sup>

Pro přípravu vzorků pro následnou analýzu pomocí různých chromatografických metod včetně HPLC hraje důležitou roli extrakce tuhou fází (SPE). Oproti více krokové separační metodě LLE (kap. 2.2.2.1), které se svým použitím do určité míry podobá, skýtá extrakce tuhou fází několik výhod. V první řadě se jedná o daleko efektivnější separační metodu, takže je tímto způsobem možné získat větší výtěžek analytu a celkově je jeho zisk jednodušší. To je dáno tím, že u SPE nedochází k separaci mezi dvě fáze, které by mohly vzájemně ovlivňovat svůj objem. Je tedy daleko jednodušší získat celkovou frakci analytu a zároveň se vyhnout nepřesnostem způsobeným variabilním nebo nepřesně změřeným objemem obou fází. Metoda extrakce tuhou fází zároveň umožňuje daleko kompletnější odstranění rušivých látek od frakce analytu, na čemž se podílí látky tvořící tuhou fází schopné

zachytit větší částice. Na provádění této extrakce není na rozdíl od LLE zapotřebí takového množství organického rozpouštědla. Celkově se dá manuální operace spojená s touto metodou označit za snadnější a rovněž na úrovni automatizace lze u SPE využít větších výhod.<sup>[6]</sup>

Na druhou stranu skýtá extrakce tuhou fází oproti LLE i několik nevýhod. Velké rozdíly v tuhé fázi používané v metodě SPE způsobují variabilitu v reprodukovatelnosti výsledků. Oproti tomu u extrakce kapalina-kapalina se užívá čistých a přesně definovaných rozpouštědel. Za nevýhodu se dá považovat i větší plocha povrchu zařízení, v němž je extrakce tuhou fází prováděna, neboť se tím zvyšuje pravděpodobnost nevratného navázání analytu a tím pádem snížení výtěžku.<sup>[6]</sup>

Do šesti bodů je možné zaznamenat hlavní výhody, které skýtá využití metody SPE v přípravě vzorků pro následnou analýzu:<sup>[6]</sup>

- oddělení látek biologické matrice a látek nebezpečných pro kolonu (tzv. zabijáci kolon)
- koncentrace nebo obohacení stopy analytu
- odstranění solí
- výměna rozpouštědla
- in-situ derivatizace
- uchovávání a transport vzorku

SPE je metodou, která může být efektivně použita pro zpracování biologického materiálu. V tomto materiálu se nacházejí četné rušivé látky překrývající pík analytu, které mohou při analýze pomocí HPLC významně ovlivnit její výsledky. V některých případech mohou totiž takové látky obsažené ve vzorku způsobit ve výsledném chromatogramu, že nebude možné je oddělit od píku pro analyzovanou látku. Metoda SPE může vliv takových látek zmírnit anebo jej úplně eliminovat. Nebezpečí pro HPLC analýzu představují tzv. zabijáci kolon, kterými může dojít k zanesení nebo až deaktivování HPLC kolony. Většinou se jim lze ubránit použitím SPE s reverzní fází (RP-SPE), která je schopná je ze vzorku odstranit. Takovými látkami jsou například hydrofobní substance (tuky a oleje) nebo polymery.<sup>[6]</sup>

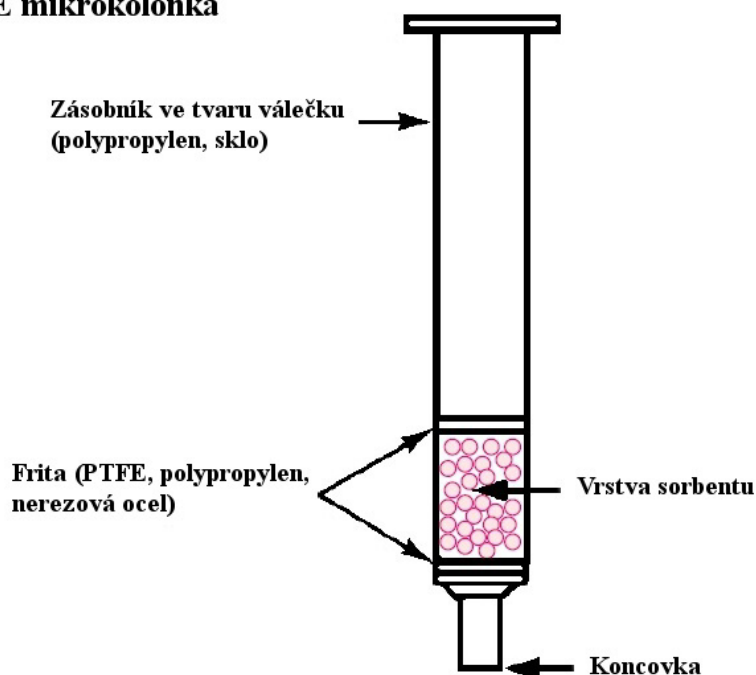
Pokud je zapotřebí zvýšení koncentrace analyzované látky, lze k tomuto účelu rovněž použít extrakce tuhou fází. Pokud se zvolí jako pevná fáze látka umožňující, aby byla pro analyt hodnota  $k \gg 1$ , pak je možné použít relativně velký objem vzorku, než dojde k nasycení pevné fáze. Následně se použije silné rozpouštědlo ( $k < 1$ ), které umožní eluci analytu do malého objemu a tím tak dojde k zvětšení jeho koncentrace a zvýšení senzitivity při detekci.

RP-SPE se dá taktéž využít k odstranění solí ze vzorku, což se hodí zejména v případě HPLC s iontovou výměnou. Podmínky takového procesu, z hlediska hodnoty pH a procentuálního obsahu organického rozpouštědla, jsou vybrány vhodně tak, aby došlo k zachycení analytu a anorganické soli bylo možno z povrchu tuhé fáze vymýt vodou. Následná eluce analytu organickým rozpouštědlem tak již probíhá bez solí. <sup>[6]</sup>

K provedení extrakce tuhou fází lze využít několik zařízení, mezi které patří kolonka, disk nebo mikrovláknko. Poslední jmenované zařízení už ovšem spadá do odlišné metody mikroextrakce tuhou fází (kap. 2.2.2.3). Ze zbylých dvou se hlavně využívá kolonka (obr. č. 3). Její obal je tvořen vysoce čistým polypropylenem upraveným pro medicínální využití. U takového polypropylenu je zaručeno, že během extrakce nebude uvolňovat látky (např. plastifikátory nebo stabilizátory) a kontaminovat jimi vzorek. Kolonka z polypropylenu se ovšem nedá užít v případech, kdy je prováděna extrakce vzorku s opravdu minimálním obsahem analyzované látky. Zde by polypropylen i přes svou vysokou čistotu mohl způsobit nežádoucí navýšení množství extrahovatelných nečistot. Pro takové situace se však dá úspěšně využít kolonky ze skla nebo čistého polytetrafluorethylenu (PTFE). <sup>[6]</sup>

Mikrokolonky pro SPE se vyrábějí v různých tvarech a velikostech, které odpovídají jejich použití. Hlavně se jedná o to, aby pasovaly do automatizovaných zařízení. Jejich objemy se pohybují v rozmezí od 0,5 do 10 ml. Pro extrémní případy tzv. „špinavých“ vzorků, které by mohly způsobit zahlcení klasických kolonek, jsou vyráběny větší o objemu 60 ml. Tato velká zařízení mají zároveň větší hmotnost, která se dostává až k 10 g, zatímco u klasických kolonek se hmotnost pohybuje mezi 35 mg až 2 g. Ve většině případů je preferováno, aby byl daný analyt eluován do co nejmenšího objemu. Tomu pak odpovídá i výběr kolonek, které by měly být pokud možno co nejmenší. Zároveň však je třeba dbát na to, aby nebyla zvolena příliš malá kolonka, u které by došlo k jejímu přesycení. Z hlediska prostorového rozvržení se kolonky skládají ze zásobníku ve tvaru válečku, do kterého je umístěna fritta. Ta udržuje ložisko se sorbentem v kolonce a je vyrobena z PTFE, polypropylenu nebo nerezové oceli s porositou od 10 do 20  $\mu\text{m}$  zajišťující malý odpor toku eluátu. Z této části vychází zúžený výtok opatřený špičkou umožňující napojení jehly, která zajistí přímý odtok eluátu do vialky. <sup>[6]</sup>

### SPE mikrokolonka



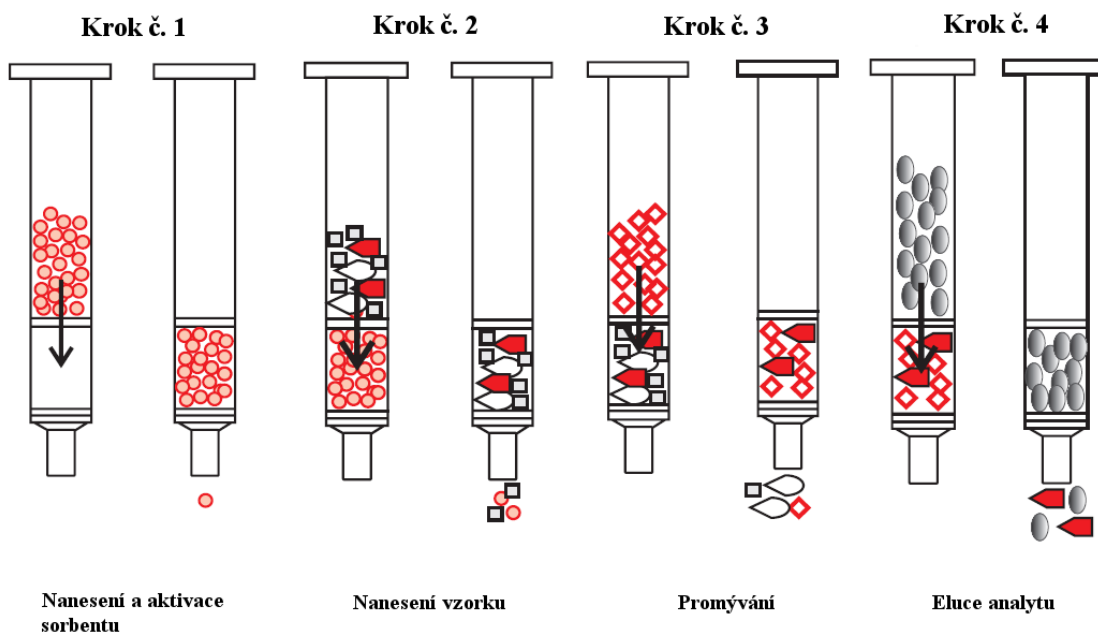
### SPE disk



**Obr. č. 3** – Schematické znázornění SPE provedení v podobě mikrokolonky a disku<sup>[7]</sup>

Kromě využití kolonky lze provést extrakci tuhými fázemi pomocí výše zmíněného disku. Ten připomíná membránové filtry a právě jejich výhody vhodně kombinuje s výhodami SPE. Samotný disk je 1 mm tenký a jeho průměr se pohybuje v rozmezí od 4 do 96 mm, umístěn je v držáku tvořeném odnímatelnou horní a dolní polovinou. Na výrobu disku jsou využívány různé materiály, mezi které patří síť pružného nebo pěnového PTFE doplněného silikátovým nebo pryskyřičným obalem, pevné skleněné vlákno s vloženým obalovým materiálem, PVC s naimpregnovaným obalem nebo derivatizované membrány.<sup>[6]</sup>

Samotný proces extrakce vzorku tuhými fázemi obsahuje čtyři základní kroky, jaké jsou uvedeny v následujícím obr. č. 4.



**Obr. č. 4** – Schematické znázornění procesu extrakce tuhou fází<sup>[7]</sup>

První krok, který se provádí ještě před nanesením samotného vzorku, je aktivace sorbentu. Tímto krokem se v první řadě odstraňují nečistoty, které se přenesly z laboratorního ovzduší a dostaly se do kontaktu se sorbentem. Těchto nečistot je pochopitelně zapotřebí se před samotnou extrakcí zbavit. Druhým neméně podstatným účelem úvodního kroku je solvatace sorbentu. Vyschlý sorbent v případě RP-SPE často způsobuje sníženou retenci vzorku. Aktivací sorbentu se rovněž zabrání tomu, aby při jednotlivých extrakcích kolísala jeho suchost, což by mohlo vést k rozdílným výtěžkům analytu. K promývání se využívá acetonitrilu nebo methanolu, který je v případě RP-SPE a u polárně vázaných fází nejčastěji používaným. U silikátových gelů ovšem způsobuje jejich deaktivaci, tudíž se zde užívá středně polárních rozpouštědel jako např. methylen-chloridu. Pokud se do SPE aplikují vodné vzorky, připadá v úvahu rovněž promytí vodou.<sup>[6]</sup>

Po provedení aktivace sorbentu se přechází ke druhému kroku, kterým je nanesení samotného vzorku. K tomu lze využít pipety, injekční stříkačky nebo v případě vzorků o větším objemu pumpy. Vzorek může být nanášen ve své původní podobě, ale je rovněž možné jeho rozpouštědlo zaměnit za jiné. Vždy jím však musí být slabé rozpouštědlo, které umožní silné zadržení analytu na tuhé fázi. Podle typu rozpouštědla se extrakce tuhou fází dělí na klasickou a s reverzní fází. Uhlovodíková nebo jiná nepolární rozpouštědla jsou typická

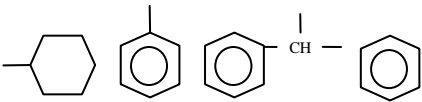
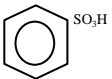
pro tzv. SPE s normální fází. Naopak pokud je analyt rozpuštěn ve vodě nebo pufru s obsahem organické složky (methanol nebo acetonitril) do 10 %, pak se provádí RP-SPE. Iontové a ionizovatelné analyty jsou většinou rozpuštěny ve vodě nebo pufru a extrahují se užitím RP-SPE nebo iontovou výměnou.<sup>[6]</sup>

Účelem třetího prováděného kroku při procesu extrakce tuhou fází je odstranění co největšího množství rušivých látek. Ty by se totiž mohly ze sorbentu při eluci uvolňovat společně s analytem do rozpouštědla. Tento promývací krok může trvat různě dlouhou dobu, v ideálním případě až do chvíle, než se začne ze sorbentu uvolňovat i analyt. K tomu ovšem během tohoto kroku ještě dojít nesmí a analyt po promývání musí zůstat stále sorbovaný. K promývání je zapotřebí vedle optimální délky trvání zvolit i vhodnou látku. Tou je z pohledu analytu středně silné rozpouštědlo (tj.  $3 < k < 10$ ). V případě RP-SPE se využívá vody nebo pufru s malým obsahem organické složky, která zajistí odstranění hydrofobnějších látek a zároveň nevymyje sledovaný analyt.<sup>[6]</sup>

Finálním krokem celého procesu SPE je samotná eluce analytu vhodným rozpouštědlem. V podstatě se zde dají použítá rozpouštědla rozdělit na silná a slabší. Objemově toho silného ( $k = 0$ ) stačí pro eluci malé množství. Takové alternativy se dá vhodně využít tam, kde je zapotřebí dosáhnout určité větší detekční citlivosti při následné analýze pomocí HPLC. Užitím slabšího rozpouštědla ( $k = 1$ ) je možné se naopak vyhnout eluci silně vázaných rušivých látek, které nebylo možno vymýt během promývacího kroku. Objem eluátu je u slabšího rozpouštědla ovšem větší a z toho důvodu je potřeba ještě před následným nástřikem do HPLC provést další krok. Tím je odpaření do sucha a následné rozpuštění analytu ve vhodném jiném rozpouštědle, ideálně ve složení užití mobilní fáze.<sup>[6]</sup>

Pokud na extrakci tuhou fází navazuje analýza pomocí HPLC, je vhodné jako rozpouštědlo využít látku nebo směs látek, jaké jsou slabou mobilní fází. V tomto případě mohou být přímo nastříknuty větší objemy frakce analytu a dosáhne se tím větší detekční citlivosti. Docílit toho lze dvěma způsoby. 1.) Pokud je analytem kyselina nebo zásada, pak se vhodnou úpravou pH potlačí ionizace a maximalizuje se retence analytu během kroků č. 2 a 3 RP-SPE. Po zisku analytu během závěrečného kroku extrakce je možno pH upravit znovu s ohledem na následnou HPLC analýzu. 2.) Za využití slabého sorbentu je umožněno, aby šlo na eluci analytu užít slabšího rozpouštědla. Pro HPLC analýzu je pak vhodné užít „silné“ kolony (např.  $C_{18}$ ).<sup>[6]</sup>



Typ SPE	Tuhá fáze
Normální fáze	-SiOH, AlOH, Mg <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , -CN, -NH <sub>2</sub> , -CH(OH)- CH(OH)-
Reverzní fáze	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub> , (-CH <sub>2</sub> -) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> , (-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> , -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , -CH <sub>3</sub> 
Aniontová výměna	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> , (-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , (-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Kationtová výměna	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> COOH, (-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H, 

Tab. č. 2 – Látky v metodě SPE používané jako tuhé fáze<sup>[6]</sup>

### 2.2.2.3 Mikroextrakce tuhou fází<sup>[8,9,10,11,12]</sup>

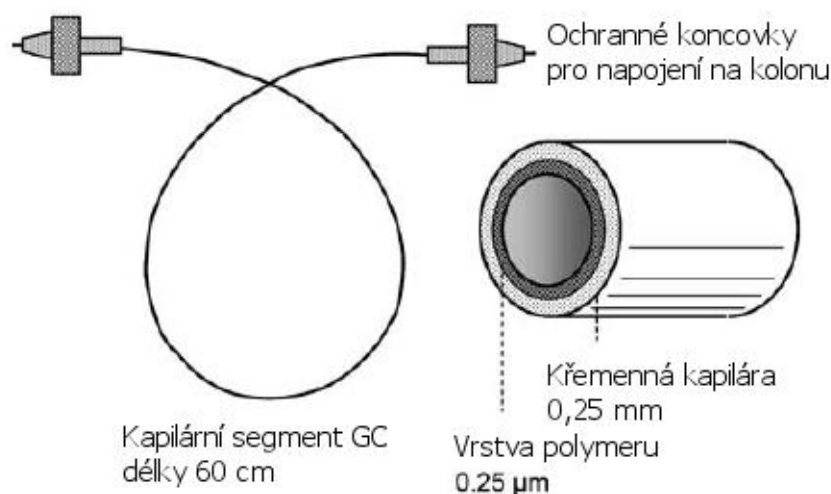
Vývoj mikroextrakce tuhou fází (SPME) byl zacílen na vytvoření rychlé metody přípravy kapalných a plyných vzorků, jejichž obsažené cílové látky by mohly být následně efektně analyzovány. Výhod této metody se dá využít zejména v případě analytů v biologickém materiálu. A to díky tomu, že umožňuje efektivně extrahovat výhradně kýžený analyt bez různých analytů negativně ovlivňujících látek obsažených ve složitém biologickém materiálu. Tento způsob extrakce rovněž umožňuje zpracovávat vzorky, v nichž je daný analyt obsažen v opravdu malém množství. Zjednodušeně lze tuto metodu popsat jako jednoduchou a účinnou sorpční a desorpční techniku zakoncentrování analytu, která se obejde bez užití rozpouštědel nebo komplikovaných aparatur. Její využití je možné jak v terénu, tak v laboratorních podmínkách, a to ve spojení s plynovou i kapalinovou chromatografií.<sup>[10]</sup>

Základním principem metody je vystavení malého množství extrakční fáze kapalnému nebo plynému vzorku, přičemž lze využít jak možnosti přímého ponoření do vzorku tak možnosti headspace. V obou případech dochází k tomu samému, a to nasorbování sledovaného analytu na povrch extrakční fáze. Tento děj probíhá do ustanovení rovnováhy

koncentrace analytu v matrici vzorku a na dané fázi. Po vytvoření rovnovážného stavu již k další akumulaci analytu na povrch sorbentu nedochází. Hlavním cílem SPME tedy není kompletní extrakce celého množství analytu, hlavní pozornost je upřena na pohodlnou a rychlou proveditelnost.<sup>[11]</sup>

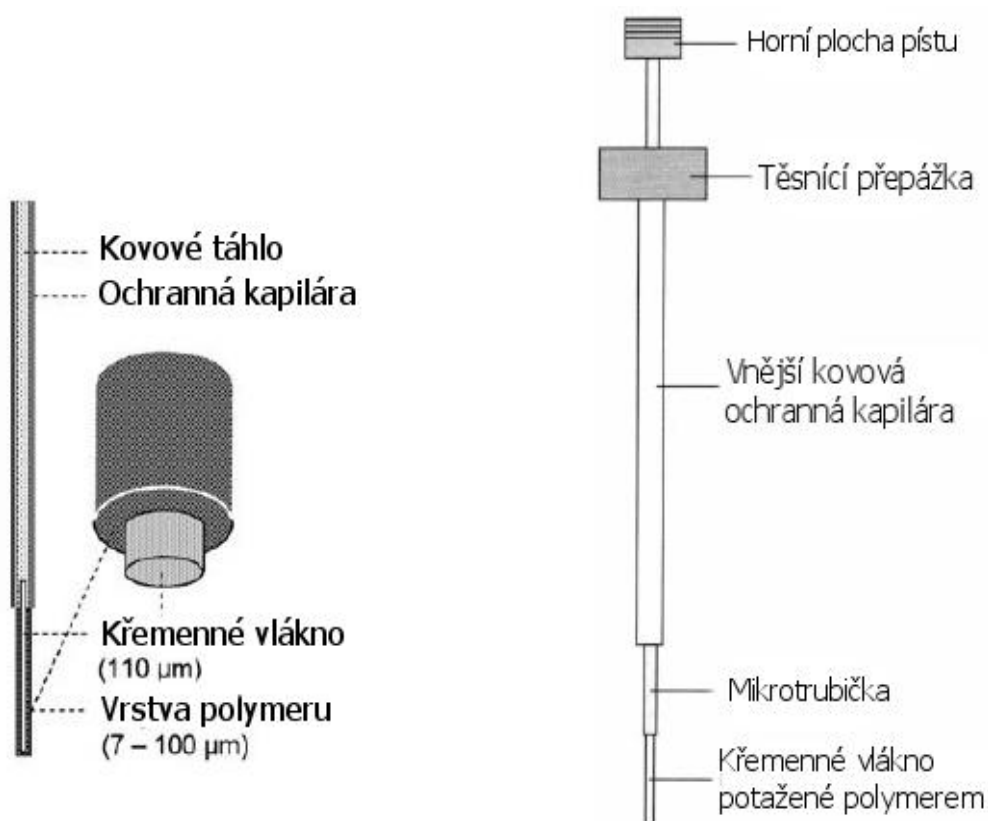
## Vybavení pro provádění SPME

K provedení mikroextrakce tuhými fázemi bylo vyvinuto několik různých způsobů. Od užití vlákna (SPME) přes kapiláru (in-tube SPME), dynamickou extrakci na vnitřně potažené jehle (SPDE), extrakci pomocí míchací tyčinky s nanesenou tuhými fázemi (SBSE) až po membrány. V praxi se ovšem nejčastěji využívá zařízení používaných u prvních dvou metod. Ty lze od sebe základně rozlišit prostorovým uspořádáním sorbentu. Zprvu se jedná o tzv. in-tube SPME, u níž je tuhá fáze nanášena na vnitřní plochu kapiláry a obecně je použitelná pouze pro vzorky v kapalném skupenství. Uspořádání u této metody vzdáleně připomíná techniku SPE (obr. č. 5). Druhou a nejvíce používanou aparaturou pro SPME je ta, kde je tuhá fáze umístěna na vnějším povrchu vlákna (obr. č. 6).<sup>[9,11]</sup>



Obr. č. 5 – Schematické znázornění zařízení pro provádění in-tube SPME<sup>[9]</sup>

Tuhou fází tvoří většinou polymerní látka nanesená v tenké vrstvě na vlákno z taveného křemene. Volba vhodné látky souvisí s typem extrahovaného analytu a dalšími specifiky té které prováděné extrakce. Vzhledem k jeho křehkosti, musí být vlákno vhodně upraveno pro činnosti jako je manipulace a penetrace septa vialky se vzorkem nebo chromatografického injektoru. Ochranu vlákna zajišťuje kapilára z nerezové oceli, do které se při výše zmíněných manipulacích vlákno zasouvá. Během provádění samotné extrakce pak musí být samozřejmě vysunuto, čímž je umožněn jeho kontakt se vzorkem. Rozvržení celého zařízení pochopitelně umožňuje, aby mohlo být vlákno vhodně nasazeno na nastřikovací zařízení chromatografu.<sup>[9,10,11]</sup>



Obr. č. 6 – Schematické znázornění vlákna pro SPME<sup>[8,9]</sup>

Polymery tvořící u SPME povrch vlákna bývají z hlediska skupenství ve formě kvazi- kapalné (polydimethylsiloxanové - PDMS, polyakrylátové – PA a Carbowax – CW vlákno) nebo porézních pevných částic zakotvených v polydimethylsiloxanové nebo Carbowax vrstvě

(polydivinylbenzenové, Carboxen a TPR vlákna). Na křemenné vlákno bývá vrstva polymeru nanášena v různých tloušťkách od 7 až do 100  $\mu\text{m}$  a nacházet se tam může ve dvou uspořádáních, a to jako vázaná či nevázaná. Tloušťkou je pak určen nejen rozsah selektivity daného vlákna, ale rovněž i čas nutný na dosažení rovnovážného stavu při sorpci. Těmčí vrstva vede ke zkrácení extrakčního času. Při výběru vhodného vlákna je zapotřebí se rozhodovat podle polarit, molekulární velikosti a těkavosti analytu (tab. č. 3).<sup>[9,10]</sup>

Typ vlákna	Tloušťka polymerní vrstvy ( $\mu\text{m}$ )	Analyty
Polydimethylsiloxan (PDMS)	7, 30, 100	Nepolární
Polyakrylát (PA)	85	Polární (zejména fenoly)
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)	65	Polární (zejména aminy)
Carbowax/divinylbenzen (CW/DVB)	65	Polární (zejména alkoholy)
Carboxen/polydimethylsiloxan (CAR/PDMS)	75	Těkavé / nízkomolární
Carbowax/templated resin (CW/TPR)	50	Pro aplikaci u HPLC
Divinylbenzen/Carboxen na polydimethylsiloxanovém podkladu (DVB/CAR/PDMS)	50/30	Širší rozmezí analytů

Tab. č. 3 – Seznam používaných vláken<sup>[9,10]</sup>

## Teorie SPME

Metody mikroextrakce tuhou fází lze využít u kapalných i plynných vzorků. V obou případech je založena na stejném principu, kterým je rozdělování částic analytu mezi matici

vzorku a pevnou fází. Rozdělovací koeficient ( $K_{fs}$ ) značí poměr koncentrace ve fázi ke koncentraci v matrici:<sup>[12]</sup>

$$K_{fs} = c_f / c_s$$

( $c_f$  – koncentrace analytu ve stacionární fázi,  $c_s$  – koncentrace analytu v matrici)

Množství analytu navázaného na pevnou fází ( $n_f$ ) se pak dá vyjádřit následujícím vztahem:<sup>[12]</sup>

$$n_f = K_{fs} \cdot V_f \cdot c$$

( $V_f$  – objem pevné fáze)

Této závislosti lze ovšem využít pouze pro ty případy, kdy je objem vzorku prakticky nekonečný. Pro reálné situace se tak užívá upraveného vztahu:<sup>[12]</sup>

$$n_f = K_{fs} V_f V_s c_s / (K_{fs} V_f + V_s)$$

U extrakce z kapalných vzorků je zapotřebí vycházet ze tří důležitých předpokladů. K přechodu částic ze vzorku na vlákno dochází výhradně difúzí, přičemž na tento přechod není potřeba dodávat žádnou další energii. Závěrečný předpoklad je takový, že koncentrace analytu ve vzorku nemá vůbec žádný vliv na fyzikální stav pevné fáze. Mezi šířkou stacionární fáze a dobou, než dojde k ustanovení rovnováhy, platí přímá zákonitost. Čím větší je tato šířka, tím delší dobu se ustavuje rovnováha. Důležitou roli zde zároveň hraje míra rovnoměrného rozmístění částic analytu ve vzorku. Vzhledem k tomu, že prakticky nejde dosáhnout zcela homogenní směsi, vždy je třeba počítat s difúzí tenkou statickou vrstvou vodného roztoku kolem vlákna. To pochopitelně oproti teoretickým předpokladům prodlužuje dobu ustanovení rovnováhy.<sup>[12]</sup>

V případech analytů s nízkou hodnotou  $K_{fs}$  vzniká problém s příliš dlouhou dobou nutnou k ustanovení rovnováhy při extrakci. Pokud je ale vlákno vystaveno vzorku na dobu kratší, než je potřebná k nastolení rovnovážného stavu, tomuto problému se dá vyhnout. Mezi množstvím sorbovaného analytu a jeho celkovou koncentrací ve vzorku i v takovém případě platí lineární závislost. Detekční limit látky pro následnou analýzu ovšem nesmí být příliš nízký.<sup>[12]</sup>

SPME sice patří mezi techniky, při nichž dochází k ustavení rovnovážného stavu, ovšem za určitých podmínek ji lze použít rovněž pro extrakci kvantitativní. Taková možnost nastává tehdy, když má rozdělovací koeficient daného analytu dostatečně vysokou hodnotu. Druhý způsob dosažení kompletní extrakce je možné provést při navázání extrakce na analýzu plynovou chromatografií. Proces sorpce analytu na vlákno a následující desorpce v injektoru

plynového chromatografu je prováděn několikrát za sebou. Kolona chromatografu je v takovém případě udržována při teplotě pod bodem varu daného analytu, čímž se tento udržuje v hlavě kolony a není tedy hned vymýván. [12]

Takový proces lze charakterizovat následujícími rovnicemi: [12]

$$n'_f = K_{fs} \cdot V_f \cdot c_s^o / (K_{fs} \cdot V_f / V_s + 1)$$

(i – počet provedených extrakcí)

$$J = \log(1 / F) / \log(K_{fs} \cdot V_f / V_s + 1)$$

(j – počet provedených extrakcí, F – celkový zisk analytu)

Kromě vzorků v kapalném skupenství se metody SPME rovněž užívá u plynných látek. K extrakci z plynného skupenství dochází rovněž v případech headspace SPME pro látky těkavé. Hodnota difúzního koeficientu je pro přechod analytu z plynného prostředí na vlákno větší než u prostředí kapalného, takže probíhá headspace technika rychleji a je tak v případech těkavých látek upřednostňována. Zároveň se lze tímto způsobem účinně zbavit případných netěkavých rušivých látek, které by se na vlákno nanuly pouze v případě jeho ponoření do kapalného vzorku. U headspace extrakcí se nejprve nechá ustanovit rovnováha mezi kapalnou a plynnou složkou. Teprve poté se vystavuje vlákno plynné části vialky. Namísto jediného tak zde dochází ke dvěma rovnovážným stavům, které jsou vyjádřeny samostatnými rozdělovacími koeficienty. To se následně promítá do úpravy rovnice pro toto provedení SPME: [12]

$$n_f = c_s^o \cdot V_f \cdot V_s \cdot K_{fs} \cdot K_1 / (K_{fs} \cdot K_1 \cdot V_f + K_1 \cdot V_g + V_s)$$

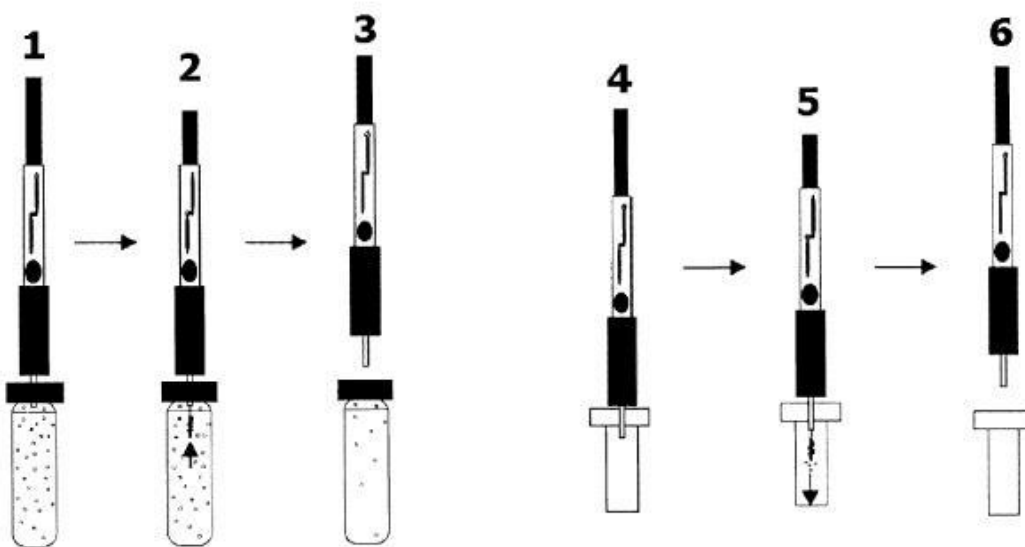
( $K_1$  – rozdělovací koeficient mezi kapalnou a plynnou fází,  $V_g$  – objem plynné fáze)

### **2.2.3 Porovnání SPME a dalších extrakčních metod**<sup>[8,10]</sup>

Na úvod porovnávání SPME s tradičními technikami je třeba konstatovat, že jejím užitím lze dosáhnout obdobně přesných výsledků. Při srovnání této metody s technikami jako LLE a SPE, u nichž dochází k úplnému oddělení celého množství analyzované látky, je patrný základní rozdíl. U mikroextrakce tuhými fázemi je extrahováno jen takové množství analytu, jaké odpovídá jeho volné koncentraci ve vzorku. To skýtá výhodu v případech, kdy je zapotřebí zjistit množství biologicky dostupného podílu analyzované látky ve vzorku. Touto metodou je

rovněž možné analyzování vazebných parametrů dané látky ve vzorku. Na druhou stranu tyto vlastnosti mikroextrakce tuhou fází způsobují i komplikace. U takové metody je totiž zapotřebí provádění kalibrace. Toho lze dosáhnout užitím vnějšího standardu v ekvivalentní matici, vnitřního standardu nebo standardu sloučeniny, která je svými vlastnostmi velmi blízká stanovované látce. Těmito způsoby se pak dá zjistit přesné množství obsaženého analytu ve vzorku. U SPME je tedy zapotřebí v porovnání s výše uvedenými technikami provést větší množství optimalizačních procedur.<sup>[8,10]</sup>

Ačkoliv je SPME velmi často považována za jinou formu SPE, je třeba zdůraznit, že tyto dvě metody si jsou v některých ohledech značně odlišné. Metodu SPE lze jednoduše shrnout do procesu o třech základních krocích (kap. 2.2.2.2). Při tom prvním se vzorek prolévá přes povrch sorbentu, na který v tom momentě dochází k nasorbování celého množství analytu. Ve druhém kroku se následně sorbent prolévá vhodným rozpouštědlem, což zajistí zbavení se nečistot i jiných rušivých látek. A konečně v posledním kroku se extrahuje za užití vhodného rozpouštědla daný analyt. Oproti tomu lze průběh metody SPME rozdělit do dvou kroků. V porovnání s SPE zde dochází k selektivní sorpci látky z matrice na povrch sorbentu, a to do ustanovení rovnovážného stavu. V průběhu prvního kroku se sorbent vystavuje vzorku, čímž dochází na jeho povrch k selektivní sorpci analytů s vyšší afinitou. Celý tento obsah je následně desorbován do vhodného rozpouštědla, k čemuž se zpravidla užívá automatizovaného zařízení a desorpce probíhá přímo do mobilní fáze. Mezi tyto dva popsané kroky (sorpce a desorpce) není obvykle vložena žádná promývací fáze (obr č. 7).<sup>[8,10]</sup>



Extrakce (fáze 1 - 3): 1 - propíchnutí septa vialky se vzorkem, 2 - vystavení vlákna vzorku (probíhá sorpce analytu), 3 - vytáhnutí vlákna z vialky  
 Resorpce (fáze 4 - 6): 4 - Propíchnutí septa vialky s insertem s malým množstvím rozpouštědla nebo přímé připojení na chromatograf, 5 - samotná desorpce analytu, 6 - vytáhnutí vlákna

**Obr. č. 7** – Schematické znázornění jednotlivých kroků při provádění SPME<sup>[10]</sup>

Nespornou výhodou metody SPME je fakt, že při výběru vhodného vlákna zajišťuje selektivní extrakci. Tím se tak dá ubránit několika důležitým problémům. Určitý stupeň selektivity je zapotřebí pro jakoukoliv přípravu vzorků, jelikož není nikterak praktické přenášet do výsledné analýze podrobované směsi všechny látky obsažené ve vzorku. Samozřejmě musí být vyloučeny látky inkompatibilní se zařízením provádějícím analýzu, jakými jsou myšleny hlavně složky matrice vzorku. Zároveň je vhodné se zbavit nechtěných látek, které by mohly zkreslit výsledky analýzy. Metody extrakce tuhou fází a mikroextrakce tuhou fází od sebe právě důležitost selektivity pro určité skupiny analytů rozděluje. Zatímco v případě SPME hraje při výběru sorbentu podstatnou roli, u metody SPE je naopak daleko důležitější dostatečná kapacita povrchu sorbentu, byť i neselektivně pro širší skupinu látek. V případě nedostatečné kapacity pro dané množství analytu by totiž mohlo dojít k prolomení sorbentu a tím ke znehodnocení celého procesu. SPME probíhá do rovnovážného stavu a k ničemu takovému u ní dojít nemůže, takže hlavním cílem zůstává zvolit jako sorbent látku s vhodnou selektivitou pro cílový analyt.<sup>[8,10]</sup>



Vlastnosti použitého sorbentu oddělují metody SPE a SPME i v ohledu dalších parametrů. V případě SPE je objem sorbentu natolik velký, že mu uděluje potenciál udržovat nesorbované látky v tzv. prázdném objemu. Uskutečnění takového promývacího procesu, kterým by se odstranily veškeré nechtěné látky zcela bez ovlivnění cílového analytu, je značně složité. Z tohoto důvodu zde pokaždé vyvstává možnost jejich setrvání v sorbované nebo nesorbované formě v prostoru extrakční kolonky. Metoda SPME má naproti tomu navržené součásti své aparatury tak, že zajišťují, aby se v době desorpce na vlákně zpravidla žádné nechtěné látky nenacházely. Selektivitu dále v případě procesu SPME zvyšuje možnost užití tzv. headspace SPME. Té lze využít u těkavých látek, které jsou na povrch sorbentu sorbovány při jeho vystavení plynnému podílu nad hladinou kapalného vzorku. Tímto způsobem lze dosáhnout oddělení těkavé látky od netěkavých. Pokud je zapotřebí ubránit se sorpci nechtěných makromolekul, může se pro provedení SPME využít materiálů s omezeným přístupem (RAM – restricted access materials), kterými jsou porózní látky překrývající samotný sorbent.<sup>[8,10]</sup>

## **2.3 Validace analytických metod**<sup>[13,14]</sup>

Validace analytické metody je proces, který má prokázat pomocí experimentálních dat a jejich matematického a statistického zpracování, že je daná metoda vhodná pro vybrané použití a získané výsledky provedených analýz jsou spolehlivé. Postup a provedení vlastní validace se dokumentují validačním protokolem, který by měl obsahovat tři části.<sup>[13]</sup>

První částí validačního protokolu je podrobně vypracovaný analytický postup, který má několik základních bodů:<sup>[13]</sup>

- příprava vzorku a standardů
- výrobce, typ a kvalita analytického zařízení
- použitý materiál (kolona, tenká vrstva, mobilní fáze) a jeho případné úpravy (aktivování, kondicionování)
- způsob a postup vnesení vzorků a standardů
- postup analýzy (temperování, gradient, derivatizace)
- postup vyhodnocování včetně použitých výpočetních vzorců

Test vhodnosti použité metody je druhou částí validačního protokolu a jedná se o číselné prokázání toho, že navržený analytický postup byl zvolen správně. Provedeny by měly být alespoň některé z následujících testů:<sup>[13]</sup>

- dělicí účinnost systému (počet teoretických pater)
- asymetrie píku
- rozlišení píků
- čistota píku nebo identita
- opakovatelnost analýzy
- stabilita vzorků a standardů

Číselné prokázání toho, že výsledky získané danou metodou jsou správné, přesné a reprodukovatelné, je vlastní validace analytické metody obsahující tyto úkony:<sup>[13]</sup>

- přesnost stanovení
- správnost stanovení
- linearita
- robustnost
- selektivita (u hlavní látky)
- detekční a kvantitativní limit (u vedlejších látek)

### **2.3.1 Přesnost stanovení**<sup>[13]</sup>

Tímto testem se zjišťuje těsnost shody výsledků nezávislých měření. Předepsaným postupem se připraví deset roztoků analyzované látky, které se nastříknou do chromatografu. Pro hlavní látku i přítomné vedlejší látky se změří odpovídající plochy píků ( $A_i$ ). Získané hodnoty se následně použijí pro výpočet průměrné hodnoty ( $A_p$ ) a směrodatné odchylky ( $s$ ) podle následujících vzorců: <sup>[13]</sup>

$$A_p = (A_i) / n$$

$$s = \sqrt{[\Sigma (A_i - A_p)^2 / (n - 1)]}$$

Požadavkem pro tento test v případě hodnocení samotných substancí je hodnota relativní směrodatné odchylky ( $s_R$ ) menší než 1% pro hlavní látku a nižší než 5% pro látky vedlejší. Hodnota relativní směrodatné odchylky se získá podle následujícího vzorce: <sup>[13]</sup>

$$s_R = 100 s / A_p$$

### **2.3.2 Správnost stanovení**<sup>[13]</sup>

Správnost stanovení je testem, který charakterizuje těsnost shody mezi výsledkem analýzy ( $C_i$ ) a přijatou referenční hodnotou ( $C_0$ ), kterou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah látky zjištěný jinou nezávislou metodou se zaručenou správností. <sup>[13]</sup>

V případě vzorku, kde je stanovovaná látka obsažena v matrici schopné interferovat při měření, se správnost metody provádí pomocí standardního přídavku účinné látky k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku, přičemž známá koncentrace účinné látky je  $C_0$  a koncentrace stanovená u modelového vzorku pak  $C_i$ . <sup>[13]</sup>

Statistické zhodnocení správnosti se provádí pomocí výtěžnosti ( $R_i$  – výtěžnosti jednotlivých analýz,  $R_p$  – průměrná výtěžnost): <sup>[13]</sup>

$$R_i (\%) = 100 C_i / C_0$$

$$R_p = \Sigma (R_i) / n$$

$$s = \sqrt{[\Sigma (R_i - R_p)^2 / (n - 1)]}$$

Ze získaných hodnot se následně počítá směrodatná odchylka ( $s_E$ ) a relativní směrodatná odchylka ( $s_R$ ):<sup>[13]</sup>

$$s_E = [(R_i - 100)^2 / n]$$

$$s_R = 100 s / R_p$$

### 2.3.3 Linearita<sup>[13]</sup>

Definicí linearit je schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Tímto testem se hodnotí kvalita závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky.<sup>[13]</sup>

Prvním krokem je výběr koncentračního rozmezí, ve kterém bude linearita sledována. V tomto rozmezí je následně vybráno alespoň pět různých koncentrací, kterým odpovídají následně připravené vzorky. Každý z nich se poté třikrát nastříkne do chromatografu, přičemž se k zajištění podmínek nahodilého výběru posloupnost nástřiků libovolně mění. Při třech nástřicích pěti vzorků je výsledkem patnáct dvojic koncentrací (hodnota na ose x) a odpovídajících ploch píků (hodnota na ose y), které se následně zpracují standardním postupem pro lineární regresi:<sup>[13]</sup>

$$y = a + bx$$

$$a = y_p - b x_p$$

$$b = [(y_i - y_p) \cdot (x_i - x_p)] / (x_i - x_p)^2$$

$$(x_p = \Sigma (x_i) / n; y_p = (y_i) / n, \text{ přičemž } n \text{ je } 15)$$

Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodně proměnných (x, y) charakterizuje korelační koeficient (r), který lze získat následujícím výpočtem:<sup>[13]</sup>

$$r = [(y_i - y_p) \cdot (x_i - x_p)] / [(y_i - y_p)^2 \cdot (x_i - x_p)^2]$$

Rozptýlení kolem regresní přímky je charakterizováno směrodatnou odchylkou, která se vypočítá podle následujícího vzorce:<sup>[13]</sup>

$$s_E = (y_i - Y_i)^2 / (n - 2)$$

$$(\text{výraz } (y_i - Y_i) \text{ je absolutní reziduum a } Y_i = a + bx_i)$$

Pro grafické posouzení linearit se vynášejí naměřené hodnoty spolu s regresní přímkou do grafu. Pro jednotlivá měření se podobným způsobem do grafu zanáší i reziduály.

[13]

### **2.3.4 Selektivita**<sup>[13,15]</sup>

Selektivita charakterizuje schopnost analytické metody kvantitativně stanovit analyt v přítomnosti možných vedlejších látek, neboť tato přítomnost nesmí ovlivňovat přesnost stanovení analyzované látky. Testování se provádí přípravou jednoho roztoku standardu analyzované látky s přidavkem asi 5% vedlejších látek, který se následně třikrát nastříkne do chromatografu. Výsledkem těchto měření jsou tři hodnoty plochy signálu analyzované látky. Z nich se vypočte průměrná hodnota ( $A_I$ ) a následně pak selektivita ( $S_L$ ) podle vzorce:<sup>[13]</sup>

$$S_L (\%) = 100 A_0 - A_I / A_0$$

( $A_0$  je plocha vypočítaná pro odpovídající koncentraci hlavní látky  $c_i$  z parametrů regresní funkce z testu linearity –  $A_0 = a + b c_i$ )

Kromě výše zmíněného hodnocení pomocí výpočtu lze selektivitu zhodnotit i graficky na základě doložení chromatogramů analýzy standardu a dále vzorků bez analytu, které obsahují všechny složky přípravku, rozkladné produkty a nečistoty.<sup>[15]</sup>

### **2.3.5 Robustnost**<sup>[14]</sup>

Za robustní lze analytickou metodu prohlásit, pokud přesnost stanovení neovlivňují malé změny pracovních podmínek. K testu robustnosti se připravuje jeden vzorek standardu analyzované látky, který se několikrát (8krát) nastříkne do chromatografu a změří se výsledné plochy píku  $A_i$ . Před každým nástřikem dojde ke změně pracovních podmínek. V níže popisovaném experimentu se mění 4 pracovní podmínky ( $x_A$  až  $x_D$ ) proměnných na dvou úrovních, spodní (-) a horní (+). Proměnné jsou voleny individuálně tak, aby zahrnovaly faktory s největší pravděpodobností ovlivnění průběhu analýzy. Stejně tak jsou voleny spodní a horní úrovně těchto změn tak, aby reflektovaly možné odchylky od optimálních hodnot při uvažované analýze. Jako proměnné jsou vybírány např. rychlost průtoku mobilní fáze, hodnota pH mobilní fáze, objem nástřiku nebo poměr složek v mobilní fázi.<sup>[14]</sup>

Významnost jednotlivých faktorů se může určit zkrácenou multifaktorovou analýzou podle Placketta a Burmana. V té se každé z proměnných přiřadí dvě hodnoty (vyšší + a nižší -). Celý plán (obr. č. 8) je uspořádán tak, že v každém řádku je  $n/2$  ( $n$  – počet pokusů) proměnných s vyšší hodnotou a  $n/2-1$  s hodnotou nižší. Poslední řádek obsahuje proměnné

pouze s hodnotami – a po sestavení prvního řádku se další provádějí cyklickou záměnou znamének (obr. č. 8).<sup>[14]</sup>

Pokus	$x_A$	$x_B$	$x_C$	$x_D$	$x_E$	$x_F$	$x_G$	Účelová veličina $y_j$
1	+	+	+	-	+	-	-	$y_1$
2	+	+	-	+	-	-	+	$y_2$
3	+	-	+	-	-	+	+	$y_3$
4	-	+	-	-	+	+	+	$y_4$
5	+	-	-	+	+	+	-	$y_5$
6	-	-	+	+	+	-	+	$y_6$
7	-	+	+	+	-	+	-	$y_7$
8	-	-	-	-	-	-	-	$y_8$
Působení $W_i$	$W_A$	$W_B$	$W_C$	$W_D$	$W_E$	$W_F$	$W_G$	

**Obr. č. 8** – Plackettův-Burmanův plán pro 7 proměnných při 8 pokusech<sup>[14]</sup>

( $x_i$ ( $i=A-G$ ) – parametry analýzy, jejichž vliv na výsledek se zjišťuje;  $y_j$ ( $j=1-8$ ) – výsledky analýzy při dané kombinaci hodnot  $x_A$  až  $x_D$ ;  $W_i$ ( $i=1-8$ ) – působení příslušného parametru  $x_A$  až  $x_G$  na výsledek  $y$ )

Rozdíly sledovaných podmínek jsou v obr. č. 8 zaznamenány ve sloupcích  $x_A$  až  $x_D$ , sloupce pro  $x_E$  až  $x_G$  neobsahují žádnou skutečnou veličinu a použijí se pro výpočet vlivu zdánlivě proměnné  $W_S$ . Hledaný vliv jednotlivých proměnných se zjistí ze vzorce:<sup>[14]</sup>

$$W_i = (\Sigma y^+ - \Sigma y^-) / (m/2)$$

Vlivem náhodných chyb kolísá proměnná  $W_S$  kolem nuly a umožňuje vypočítat rozptyl  $s_w^2$  při počtu  $m$  pokusů a počtu  $n$  skutečných faktorů:<sup>[14]</sup>

$$s_w^2 = [(W_E)^2 + (W_F)^2 + (W_G)^2] / (m - n - 1)$$

Z tohoto vzorce se pak jeho odmocněním získá výpočet směrodatné odchylky  $s_w$ . Vliv faktoru je pokládán za významný, pokud  $W_i \geq W^\circ = s t (P, f = m - n - 1)$ , kde  $s$  značí směrodatnou odchylku a  $t (P, f)$  kritickou hodnotu Studentova rozdělení pro zvolenou hladinu významnosti  $P$ .<sup>[14]</sup>

### **2.3.6 Detekční a kvantitativní limit**<sup>[13]</sup>

Detekční limit (LOD) je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako trojnásobek směrodatné odchylky ( $s_n$ ) odezvy slepého pokusu (šumu) a lze jej vypočítat podle následujícího vzorce:<sup>[13]</sup>

$$LOD = 3 s_n K / b$$

( $K$  – poměr plocha píku/výška píku charakteristický pro stanovovanou látku;  $b$  – poměr plocha píku/koncentrace analytu daný směrnici regresní rovnice ze stanovování linearity z kap. 2.4.3)

Kvantitativní limit (LOQ) je nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Definována je jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu a k výpočtu se využívá tento vzorec:<sup>[13]</sup>

$$LOQ = 10 s_n K / b$$

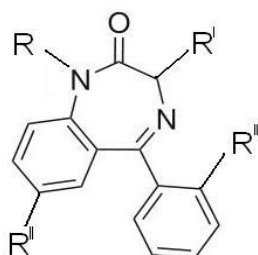
Směrodatná odchylka šumu se odhaduje při měření slepého vzorku ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se následně změří největší kladná ( $r^+$ ) a záporná ( $r^-$ ) amplituda šumu. Směrodatná odchylka se z těchto hodnot získá podle následujícího vzorce:<sup>[13]</sup>

$$s_n = (r^+ - r^-) / 5$$

## 2.4 Benzodiazepiny<sup>[16,17]</sup>

Benzodiazepiny lze označit za početnou skupinu látek, která čítá více než 3000 členů. Takřka 50 z nich pak našlo uplatnění v klinické praxi, kde se jich užívá v různých indikacích. Rozsah jejich účinků sahá od anxiolytického přes sedativní, hypnotický, myorelaxační, amnestický až po antikonvulzivní. U každé látky jsou jednotlivé účinky vyjádřeny rozdílně, kdy například oxazepam patří do skupiny benzodiazepinů převážně anxiolyticky působících.<sup>[16]</sup>

Základní charakteristikou těchto látek je z chemického pohledu jejich jednotný základní vzorec tvořený sedmičlenným diazepinovým kruhem spojeným s benzenovým jádrem (obr. č. 9). Celé toto uskupení se pak u jednotlivých zástupců liší v navázání rozdílných substituentů v charakteristických polohách.<sup>[16]</sup>



---

Obr. č. 9 – Benzodiazepinové jádro

Mechanismus účinku benzodiazepinů je založen na jejich selektivním obsazování specifického vazebného místa na receptorovém komplexu GABA<sub>A</sub>. Při obsazení těchto míst se alostericky navýší afinita vazebného místa pro  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu umístěného na jiné části receptorového komplexu. Tato kyselina představuje hlavní inhibiční neurotransmitter v centrálním nervovém systému a následně tak dochází ke zvýšení frekvence otevírání chloridového kanálu. To vede ke zvýšenému vstupu chloridových iontů do buňky, což má za následek prohloubení postsynaptického inhibičního potenciálu vazebného místa pro  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu.<sup>[16]</sup>

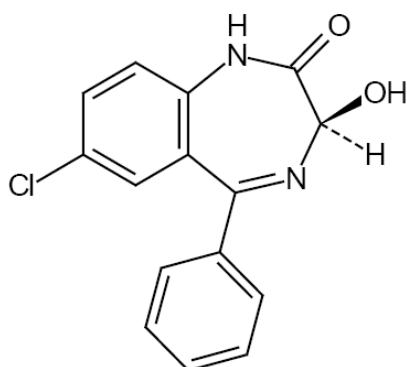
Z farmakokinetického hlediska se dají benzodiazepiny charakterizovat jako látky s výbornou biologickou dostupností po perorálním podání, která se blíží ku 100 procentům.



Jejich účinek nastupuje v průběhu hodiny, přičemž delší je pak u oxazepamu, lorazepamu a temazepamu. Vazba na plasmatické bílkoviny se pohybuje v rozmezí 60 – 95 %. Jejich vysoká lipofilita benzodiazepinům zajišťuje snadnou prostupnost hematoencefalickou bariérou a kumulaci v tukové tkáni. Biotransformace probíhá mikrosomálním systémem cytochromu P450 a následně pak dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou. Ledvinami jsou tyto látky vylučovány ve formě ve vodě rozpustných sloučenin.<sup>[16]</sup>

Podávání benzodiazepinů samozřejmě skýtá rizika v podobě různých nežádoucích účinků, jaké se u pacientů mohou projevit. V běžném dávkovacím rozmezí, tedy aniž by došlo k předávkování, se může vyskytnout zmatenost, poruchy koordinace, anterográdní amnézie nebo ospalost. Pokud u pacienta dojde k předávkování, pak benzodiazepiny způsobí hlavně prodloužení a prohloubení spánku. Během toho ale nedochází k závažnému ovlivnění respiračních a kardiovaskulárních funkcí. K útlumu respirace dojít může, a to v případě kombinace s jinými látkami majícími tlumivý účinek na CNS, zejména při konzumaci alkoholu. Při dlouhodobějším užívání benzodiazepinů se projevuje tolerance, tedy postupné slábnutí požadovaného účinku při stále stejném dávkování. Dlouhodobější užívání s sebou pak nese riziko vzniku závislosti, která se při vysazení projeví zvýšenou úzkostí a nespavostí. K tomu se mohou ještě přidružit tělesné projevy jako tachykardie, psychomotorický neklid, třes nebo bolest hlavy. U dětí a starších pacientů se lze při léčbě těmito látkami setkat s paradoxní excitací, stavy zmatenosti a zvýšené agresivity. V opravdu akutních případech předávkování je možno využít kompetitivního antagonisty na receptorech pro benzodiazepiny, flumazenilu. Jeho účinek v případě parenterálního podání nastoupí do několika málo minut.<sup>[16]</sup>

## 2.4.1 Oxazepam<sup>[17]</sup>



$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$  - (3RS)-7-chlor-5-fenyl-3-hydroxy-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

$M_r$  286,72      CAS 604-75-1

*Vlastnosti* – bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu 96% a v dichlormethanu

## **2.5 Rešerše**

### **Stanovení midazolamu v lidské plasmě za užití SPME a GC-MS<sup>[18]</sup>**

Studie se zabývala analýzou midazolamu obsaženého ve vzorku lidské plasmy. Před jeho extrakcí byla prováděna deproteinizace, samotná extrakce byla provedena metodou SPME a analýza na GC-MS s použitím pinazepamu jako vnitřního standardu.

*Užité extrakční podmínky:* vlákno – PA (85 µm vrstva polyakrylátu), jenž před užitím aktivováno vložením na 10 – 15 min. do injekčního portu GC (teplota 250 °C), po každém kroku vlákno promýváno vložením na 2 min. do destilované vody (stálé míchání) a následně na 2 minuty do injekčního portu GC; sorpce prováděna vložením vlákna na 10 min. do roztoku předehřátého na 50 °C (stálé míchání); pH upraveno na neutrální.

### **Metoda SPME napojená na SM-HPLC k analýze benzodiazepinů v lidské moči<sup>[19]</sup>**

Studie se zabývala analyzováním šesti benzodiazepinů (nitrazepam, flunitrazepam, fludiazepam, diazepam, clotiazepam, medazepam) obsažených v lidské moči. Z tohoto biologického materiálu byly cílové látky extrahovány pomocí techniky SPME a jejich analýza provedena užitím SM-HPLC.

*Užité extrakční podmínky:* vlákno – PA (85 µm vrstva polyakrylátu) a PDMS (100 µm vrstva polydimethylsiloxanu), ve vzájemném porovnání vybráno jako vhodnější vlákno PA; teplota během extrakce udržována na 60 °C, vzorek bez úpravy pH, desorpční čas 30 min., desorpční roztok – 30 µl acetonitrilu.

*Užité chromatografické podmínky:* mobilní fáze - acetonitril:voda (35:65); průtok 0,1 ml/min; teplota 35 °C.

### **Stanovení delorazepamu v moči s využitím techniky SPME napojené na HPLC<sup>[20]</sup>**

Studie se zabývala stanovováním delorazepamu, jenž byl obsažen v prostředí lidské moči. Z tohoto materiálu se extrahoval užitím techniky SPME a analýza probíhala na HPLC. V této

studii byla zároveň porovnávána dvě SPME vlákna polydimethylsiloxan/divinylbenzenové a Carbowax/templated resin využitá k extrakci delorazepamu.

*Užité extrakční podmínky:* vlákno – PDMS/DVB (60  $\mu\text{m}$  vrstva polydimethylsiloxan/divinylbenzenu) a Carbowax/TPR-100 (50  $\mu\text{m}$  vrstva carbowax/templated resin), ve vzájemném porovnání vybráno jako vhodnější PDMS/DVB; sorpce prováděna po dobu 30 min. za stálého míchání, desorpce prováděna do acetonitrilu (trvání 3 a 5 min.) a směsi acetonitril:voda v poměru 40:60 a 80:20 (trvání 3 min.) a stejné směsi o poměru složek 90:10 (trvání 3 a 5 min.).

*Užité chromatografické podmínky:* mobilní fáze – acetonitril:voda (65:35); průtok 1 ml/min.

### **Užití metod SPME a GC-ECD benzofenonů ke stanovení benzodiazepinů v moči<sup>[21]</sup>**

Studie se zabývala analýzou vybraných benzodiazepinů obsažených ve vzorku moči, které byly před extrakcí převedeny na benzofenony provedením kyselé hydrolýzy. Získané benzofenony se následně extrahovaly pomocí SPME a analyzovaly pomocí GC-ECD.

*Užité extrakční podmínky:* vlákno – 10 mm dlouhé PDMS (100  $\mu\text{m}$  vrstva polydimethylsiloxanu); extrakce 1 - ponořením na 30 min. do vzorku za stálého míchání, desorpce prováděna po dobu 5 minut přímo do nástřikové části GC; headspace extrakce 2 – vzorek předeřhán na 100 °C a udržován na této teplotě, vlákno vystaveno nad hladinu vzorku po dobu 30 min.; desorpce provedena analogicky s extrakcí 1.

### **Aplikace SPME ke zkoumání vazby diazepamu na lidský sérový albumin<sup>[22]</sup>**

Studie se zabývala možnostmi užití techniky SPME k hodnocení vazby diazepamu na lidský sérový albumin. Ve studii byly zkoumány dvě metody, přičemž v té první bylo vlákno vystaveno vzorku proteinu s přesně daným obsahem diazepamu. Ve druhé pak bylo vlákno napřed vystaveno roztoku o jasně dané koncentraci diazepamu a následně necháno desorbovat do roztoku s proteinem.

*Užité extrakční podmínky:* vlákno – PDMS (100  $\mu\text{m}$  vrstva polydimethylsiloxanu); extrakční čas byl stanoven na 45 min.

### **Užití automatizované In-Tube SPME napojené na LC-ESI-MS ke stanovení vybraných benzodiazepinů<sup>[23]</sup>**

Studie měla za cíl zkoumat stanovení diazepam, nordiazepam, temazepam, oxazepam, 7-aminoflunitrazepam, N-desmethylflunitrazepam a clonazepam, které byly obsaženy v puřrovacím roztoku a dále vzorcích s obsahem moči a séra. K extrahování benzodiazepinů z daného biologického materiálu bylo využito metody In-Tube SPME a následná analýza prováděna na kapalinovém chromatografu s MS detekcí.

*Užitě chromatografické podmínky:* mobilní fáze - reverzní, methanol:50mM octanu amonného ve vodě (60:40); průtok 0,3 ml/min.

### **Analýza oxazepamu v moči užitím SPE a HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci při průchodu kolonou<sup>[24]</sup>**

Studie se zabývala stanovením oxazepam, který byl obsažen ve vzorku lidské moči. Na jeho extrakci z tohoto prostředí bylo využito extrakce tuhou fází (SPE) a následná analýza provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (fluorescenční detekce) s derivatizací kyselinou octovou po průchodu kolonou.

*Užitě chromatografické podmínky:* mobilní fáze – methanol:voda (60:40); průtok 0,5 ml/min; derivatizace kyselinou octovou o průtoku 1,1 ml/min za vzniku směsi kyselina:methanol:voda (22:6:4).

### **Simultánní stanovení benzodiazepinů pomocí HPLC: Zkoumání užití metod LLE a SPE pro lidskou plasmu<sup>[25]</sup>**

Studie se zabývala extrakcí sedmi vybraných benzodiazepinů (flunitrazepam, clonazepam, oxazepam, lorazepam, chlórdiazepoxid, nordiazepam a diazepam), které byly obsaženy ve vzorku lidské plasmy. K provedení extrakce bylo užitó metod extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce tuhou fází (SPE) a extrahované látky poté analyzovány pomocí HPLC s UV detektorem.

*Užité chromatografické podmínky:* mobilní fáze – pufr 5 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH = 6,0:methanol:diethylether (55:40:5); průtok 0,8 ml/min; detekce UV při 245 nm.

### **3. CÍL PRÁCE**

Za cíl této rigorózní práce bylo kladeno provést optimalizaci podmínek pro provádění mikroextrakce tuhou fází (SPME) využité k extrakci oxazepamu z krevní plasmy a následně tuto metodu validovat. Vypracování praktické části této práce sestávalo z níže uvedených úkolů:

1. Optimalizace extrakčního procesu úpravou pH plasmatického vzorku
2. Optimalizace extrakčního procesu vybráním nejvhodnějšího časového schématu pro jeho provádění
3. Kvantitativní hodnocení oxazepamu extrahovaného z plasmatického roztoku
4. Validace metody pomocí testu přesnosti, správnosti, linearity, selektivity, robustnosti detekčního a kvantitativního limitu



## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## **4.1 Použitý materiál**

### **Chemikálie a biologický materiál:**

*oxazepam* – Spofa, Praha, Česká republika

*methanol p.a.* – Penta, Praha, Česká republika

*kyselina fosforečná 85% p.a.* - Penta, Praha, Česká republika

*hydroxid draselný ČL 2005* – RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, ČR

*destilovaná voda*

*králíčí heparisovaná plasma* – Eldoret s.r.o., Praha, Česká republika

### **Chromatografický materiál:**

*analytická kolona pro HPLC* - kovová Separon SGX C18, 150x4 mm I.D., 7 $\mu$ m – Tessek Ltd., Praha, ČR

*vlákno pro SPME* – PDMS/DVB 100  $\mu$ m, výrobce: Supelco, Bellefonte, USA, dodavatel: Sigma Aldreich, Praha, ČR

*držák pro SPME vlákno* - výrobce: Supelco, Bellefonte, USA, dodavatel: Sigma Aldreich, Praha, ČR

### **Přístroje:**

*čerpadlo Consta Metric 3500* – Thermo Separation Products, USA

*čerpadlo Spectra System P1000* – Thermo Separation Products, USA

*autosampler Spectra System AS 1000* - Thermo Separation Products, USA

*UV detektor Spectra System UV 3000 HR* - Thermo Separation Products, USA

*analytické váhy HR-120* - A&D Company Ltd., Japonsko

*pH metr Acidimetr 333* – Druopta Praha, Česká republika

*ultrazvuk K 10* – Krainek s.r.o., Nové Zámky, Slovensko

*magnetická míchačka MM2A* – Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

*počítačový program ChromQuest 4.2.34* - Thermo Electron 2003, USA

**Pomůcky:**

*mikropipeta 10 – 100  $\mu$ l* – Eppendorf Research, Německo

## **4.2 Příprava standardů a vzorků**

Při přípravě standardů a vzorků se vycházelo ze zásobního roztoku oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml, který byl připravován pravidelně pro každý jednotlivý den provádění extrakcí. Příprava spočívala v navážení přesného množství 0,01 g oxazepamu na analytických váhách do odměrné baňky o objemu 10 ml. Toto množství oxazepamu bylo následně v dané baňce rozpuštěno přidáním methanolu o objemu sahajícím po rysku. Po úplném rozpuštění oxazepamu byl zásobní roztok připraven.

Standardy byly připravovány naředěním připraveného roztoku na koncentrace 0,1 a 0,001 mg/ml. K tomuto účelu se využilo odměrných baněk o objemu 10 ml, do nichž bylo odpipetováno 1, respektive 0,01 ml z roztoku o koncentraci 1 mg/ml a doplněno methanolem po rysku. Takto připravenými standardy se následně naplnily vialky určené do autosampleru použitého chromatografu.

Vzorky byly připravovány odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml do vialky. K drtivé většině extrakcí se připravovaly vzorky o koncentraci oxazepamu 0,1 mg/ml, v případě testu linearitě ovšem vzorky i o jiných koncentracích (kap. 5.2.3). V případě přípravy nejpoužívanějších roztoků o výše zmíněné koncentraci 0,1 mg/ml bylo nejprve do vialky odpipetováno 0,5 ml zásobního roztoku. K tomu se následně přidalo 0,5 ml králičí plasmy. K získání konečného objemu 5 ml se došlo doplněním stávajících dvou složek 4 ml vody. Všechny tímto způsobem připravené vzorky byly následně použity k extrakci za využití PDMS/DVB vlákn.

### **4.3 Provedení extrakce PDMS/DVB vláknem**

Vzorky připravené podle postupu popsaného v předešlé kapitole 4.2 byly podrobeny extrakci s využitím PDMS/DVB vlákna. K procesu extrakce bylo využito magnetické míchačky, na které byla pomocí držáku umístěna vialka s vzorkem. Míchačka byla během procesu sorpce aktivována a za pomoci magnetického míchadélka umístěného ve vialce se vzorkem bylo zajištěno rovnoměrné promísení vzorku. Samotné PDMS/DVB vlákno v originálním obalu určeném k manipulaci s ním bylo připevněno ke stojanu tak, aby mohlo být ponořeno do vialky s roztokem.

Nejprve se prováděla aktivace vlákna ponořením na 30 minut do vialky obsahující čistý methanol. Po aktivaci bylo vlákno ponořeno do vialky se vzorkem a necháno po patřičnou dobu (kap. 5.1.1) provádět proces sorpce. Po uplynutí času potřebného k sorpci bylo vlákno z vialky vytáhnuo a následně ponořeno do vialky s insertem obsahujícím 250  $\mu$ l čistého methanolu. Tím byla prováděna desorpce trvajícím časovým intervalem zjištěným jako ideální (kap. 5.1.1). Po uplynutí daného časového úseku bylo vlákno vytaženo a vialka s insertem pak umístěna do autosampleru a provedla se analýza HPLC. Vlákno bylo na závěr podrobeno procesu čištění ponořením nejprve na 30 minut do vialky s obsahem čistého methanolu a následně na 10 minut do vialky s vodou. Poté bylo znovu připraveno k dalšímu provedení výše popsaného procesu.

#### **4.4 Provedení HPLC analýzy**

Po získání analytu z plasmatického roztoku užitím extrakce PDMS/DVB vláknem dle postupu popsaného v předešlé kapitole byl tento podroben hodnocení pomocí HPLC. K tomu se využilo analytické kolony Separon SGX C18 a detekce prováděna UV detektorem Spectra System UV 3000 HR nastaveným na vlnovou délku 228 nm. Dávkování vzorku bylo provedeno autosamplerm Spectra System AS 1000, do jehož prostoru se vždy umístila na patřičnou pozici vialka s insertem obsahujícím 250  $\mu$ l methanolického roztoku extrahovaného oxazepamu. Během každé analýzy byla nastříkována dávka 20  $\mu$ l.

Za mobilní fázi byla zvolena směs methanol:voda v poměru 80:20, jejíž hodnota pH se upravovala na 7,5. Toho bylo pokaždé docíleno využitím roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,01 mol/l. Ke každým 500 ml směsi mobilní fáze se odpipetovávalo 0,6 ml tohoto roztoku za současného měření aktuální hodnoty pH na pH-metru. Po úpravě pH byla mobilní fáze vystavena působení ultrazvuku na dobu 10 minut, čímž došlo k jejímu odplynění. Mobilní fáze se nechávala systémem proudit průtokovou rychlostí 0,8 ml/min.

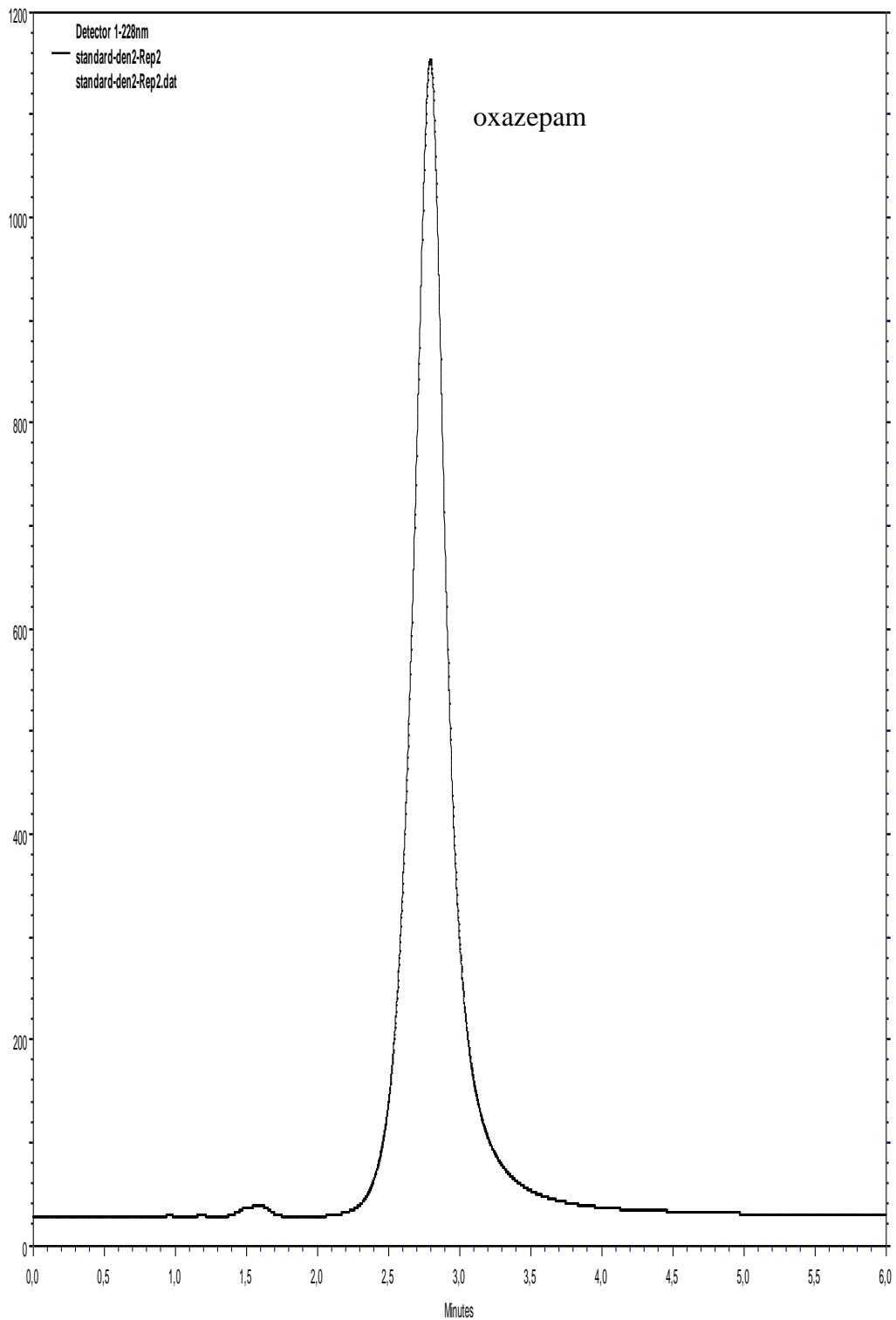
Aby mohly být výtěžky kvantitativně hodnoceny, využilo se metody vnějšího standardu. Ten se připravil ze zásobního roztoku oxazepamu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml (kap. 4.2), jaký byl použit k přípravě plasmatických roztoků podrobovaných extrakci PDMS/DVB vláknem. Určitý podíl methanolického roztoku oxazepamu se naředil dle postupu uvedeného v kapitole 4.2 na koncentraci 0,1 mg/ml. Vialky naplněné methanolickým roztokem oxazepamu o této koncentraci se nechaly analyzovat chromatografem postupem výše popsaným pro vzorky po extrakci vláknem.

## **5. VÝSLEDKY A DISKUZE**

## **5.1 Výběr optimálních chromatografických podmínek**

Základním krokem ještě před samotným zaobíráním se extrakcí oxazepamu z plasmatického roztoku pomocí metody SPME bylo stanovit optimální chromatografické podmínky, za kterých by byla daná látka analyzována. Touto problematikou se již zabývala diplomová práce s názvem Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií II.<sup>[26]</sup> Po vyzkoušení různých kombinací mobilní fáze se tam došlo k cílovému poměru methanol:voda 80:20, který byl stanoven jako optimální. U mobilní fáze byl rovněž zkoušen vliv rozdílného pH na kvalitu výsledného píku a nejlepších výsledků se dosáhlo při pH 7,5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,8 ml/min a detekce prováděna při hodnotě 254 nm. Vzhledem k tomu, že bylo v rámci této rigorózní práce prováděno rovněž analyzování oxazepamu pomocí HPLC, byly zjištěné optimální podmínky s jedinou výjimkou převzaty. Ona jediná výjimka se týká hodnoty vlnové délky, při které se prováděla detekce. Tato byla změněna na hodnotu 228 nm charakterizující maximum absorpce dané látky.





**Obr. č. 10** - HPLC chromatogram roztoku standardu oxazepamu o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  stanovovaného při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm

## **5.2 Optimalizace podmínek extrakce**

Optimalizace extrakčního procesu oxazepamu navazovala na zjištění z diplomové práce zabývající se úvodem do problematiky metody SPME. [26] V jejím rámci bylo zprvu prováděno extrahování oxazepamu z vodného roztoku a ten následně analyzován. K optimalizaci celého procesu byla nejprve porovnávána výtěžnost oxazepamu při různých časových schématech a následně i při rozdílných hodnotách pH daného vodného roztoku. Následně se optimalizační proces v tomto rozvržení přenesl na plasmatické roztoky oxazepamu. Využití plné plasmy nepřineslo kýžený efekt a jako výrazně efektivnější se jevílo využití roztoku zředěné plasmy o koncentraci 10 %. V této rigorózní práci se tak již veškeré extrakce prováděly na takovémto roztoku plasmy. K provádění mikroextrakce zde bylo využito PDMS/DVB vlákna.

### **5.2.1 Porovnávání výtěžků při různých časových schématech**

Optimalizace podmínek extrakce oxazepamu z plasmatického roztoku za využití PDMS/DVB vlákna sestávala ze dvou kroků. Tím prvním bylo zjištění rozdílů výtěžností při použití různých časových schémat a druhým pak porovnání výtěžku po úpravách hodnoty pH roztoku. Upravována byla jak délka trvání sorpce, tak i délka trvání následné desorpce. Celkem tak bylo utvořeno následujících šest časových schémat (sorpce/desorpce): 2/2, 5/5, 10/5, 10/10, 30/10 a 30/30 minut. Pro každé z nich byla provedena jedna extrakce a extrahovaný analyt následně podroben HPLC analýze. Výsledkem této analýzy byly hodnoty ploch píků oxazepamu pro dva nástříky na kolonu. Pro přehlednost a snazší porovnání výtěžnosti byla z těchto hodnot vždy vypočtena hodnota jeho koncentrace (tab. č. 4).

Časové schéma sorpce/desorpce (min)	Plocha	Průměr ploch	Množství oxazepamu v nástřiku (µg)	Určená koncentrace (µg/ml)	Určená koncentrace (%)
2/2	304516	304217	0,0285	1,43	1,43
	303918				
5/5	113510	113883	0,0107	0,54	0,54
	114256				
10/5	271625	272976	0,0256	1,28	1,28
	274326				
10/10	144569	145949	0,0137	0,69	0,69
	147328				
30/10	379256	380356	0,0356	1,78	1,78
	381456				
30/30	375123	376007	0,0353	1,77	1,77
	376891				

**Tab. č. 4** – Hodnoty mapující výtěžky jednotlivých extrakcí při různých časových schématech

Ze zjištěných hodnot výtěžností jednotlivých extrakcí při každém z časových schémat nebyla potvrzena přímá úměra mezi množstvím extrahovaného oxazepamu a časového úseku. Největší množství oxazepamu bylo extrahováno při extrakci, v jejímž rámci trval proces sorpce 30 a desorpce 10 minut (obr. č. 11). Obdobných a jen nepatrně nižších hodnot se dosáhlo při časovém schématu, kde byla délka desorpce ještě o 20 minut delší. Na základě výsledků bylo časové schéma s největší výtěžností (30/10 minut) vybráno pro další prováděné extrakce.

Porovnávání výtěžnosti bylo prováděno na základě hodnot ploch píků charakteristických pro oxazepam, ale kromě toho byla rovněž pro každé schéma vypočtena koncentrace oxazepamu. Tato hodnota byla získána za užití výpočtů popsanych v následujících bodech:

#### Bod č. 1 – Stanovení hmotnosti oxazepamu v nástřiku standardu

Z roztoku standardu o koncentraci 0,1 mg/ml nástřikováno 20  $\mu$ l » v nástřiku obsaženy 2  $\mu$ g oxazepamu.

#### Bod č. 2 – Stanovení hmotnosti oxazepamu obsaženého v roztoku podrobenému extrakci

Ze základního methanolického roztoku oxazepamu o koncentraci 1 mg/ml odebíráno 0,5 ml » v roztoku pro extrakci obsaženo celkem 500  $\mu$ g oxazepamu.

#### Bod č. 3 – Porovnání ploch píků standardu a příslušného extraktu

Za modelový příklad vybrána extrakce o časovém schématu 30 / 10 minut (sorpce/desorpce). Velikost plochy píku pro množství 2  $\mu$ g oxazepamu byla získána z analýzy roztoku standardu o koncentraci 100  $\mu$ g/ml.

2  $\mu$ g (obsah oxazepamu)..... 21331152 (plocha píku)

x ..... 380356

---

$$x = 2 / 21331152 \cdot 380356 = 0,0357$$

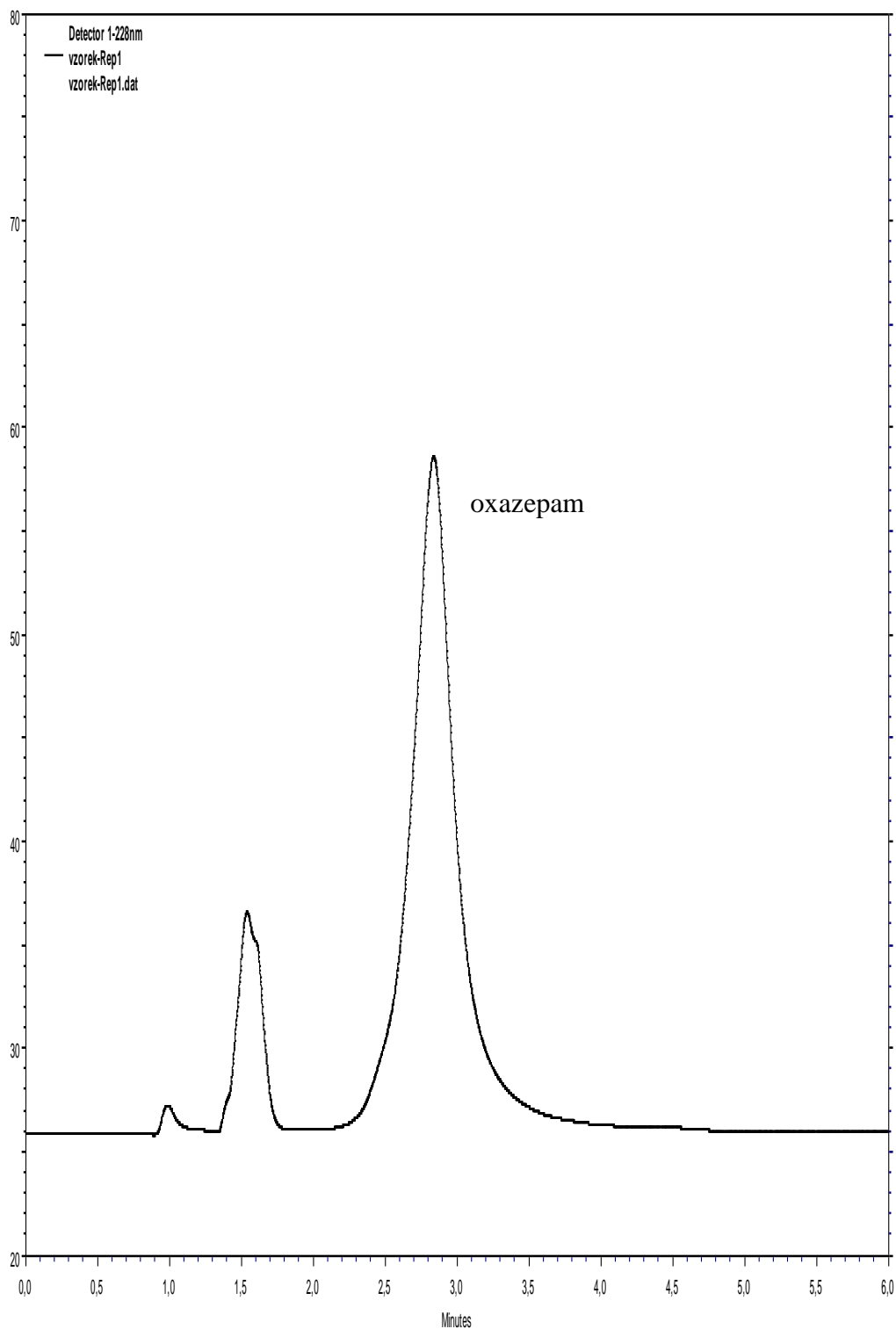
Ve 20  $\mu$ l nástřiku extraktu bylo obsaženo 0,0357  $\mu$ g oxazepamu.

#### Bod č. 4 – Výpočet koncentrace oxazepamu v extraktu a výtěžnosti extrakce

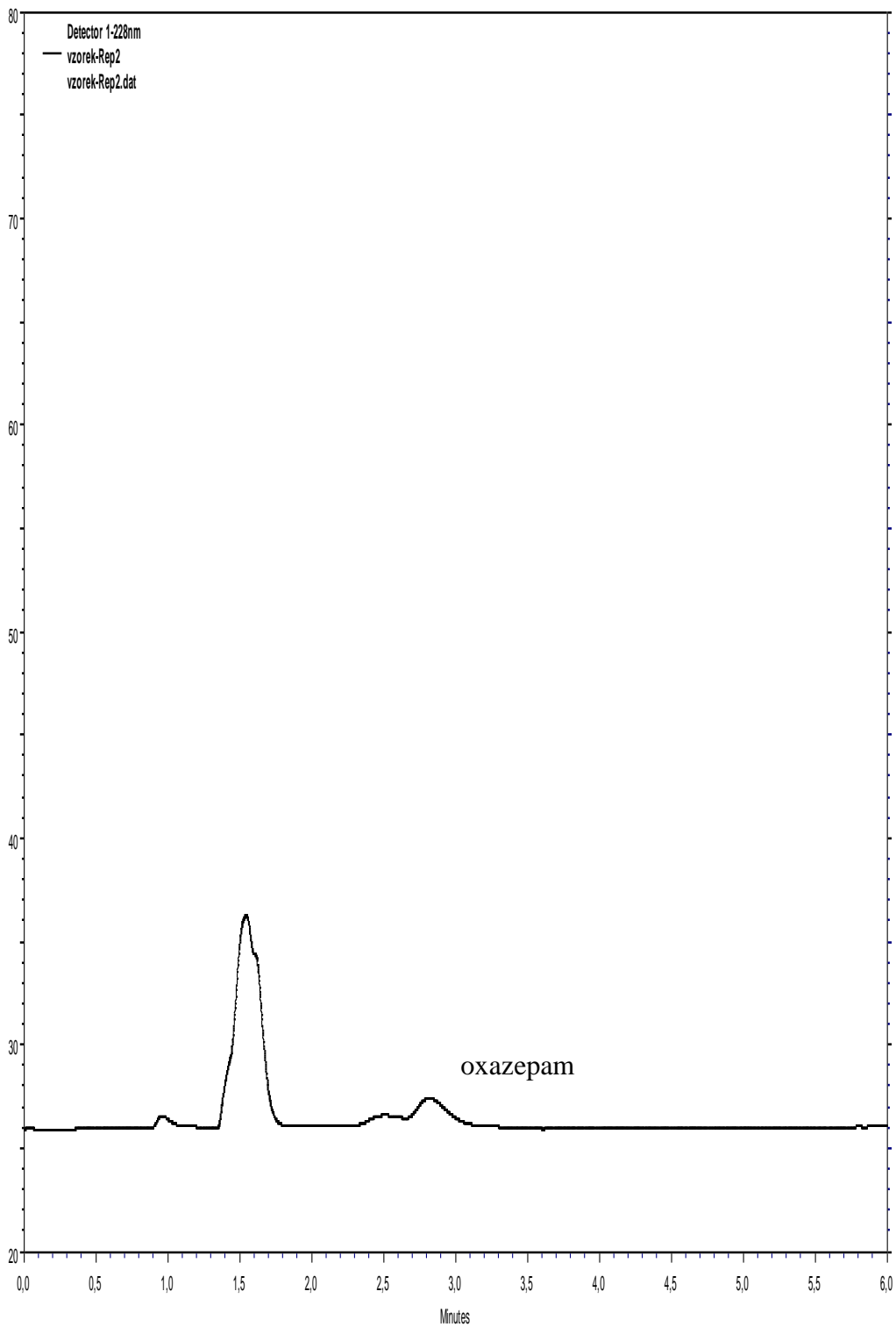
0,0356  $\mu$ g oxazepamu obsaženo ve 20  $\mu$ l nástřiku » v celkovém objemu extraktu 250  $\mu$ l obsaženo 0,445  $\mu$ g oxazepamu » koncentrace extraktu byla 1,78  $\mu$ g/ml.

Pokud se vychází z faktu, že roztok podrobený extrakci měl koncentraci oxazepamu 100  $\mu$ g/ml, pak hodnota vyšší koncentrace extraktu zároveň procentuálně vyjadřuje výtěžnost extrakční metody.

Kromě prováděných extrakcí, kdy po sorpčním procesu následovala pouze jediná desorpce, byla zkoušena i možnost sekundární desorpce. Ta byla zkoušena výhradně u časového schématu s nejvyšší výtěžností, a to tak, že se kromě primární desorpce trvající 10 minut po jejím provedení vlákno ještě na dalších 10 minut ponořilo do vialky s čistým methanolem. Na základě analýzy extraktu získaného touto sekundární desorpcí bylo zjištěno, že tato neposkytuje takřka žádný významný výtěžek a záznam analýzy neposkytl nikterak kvalitativně hodnotný pík (obr. č. 12).



**Obr. č. 11** - HPLC chromatogram plasmatického roztoku oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml podrobeného extrakci při časovém schématu (sorpce/desorpce) 30/10 minut. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm



**Obr. č. 12** - HPLC chromatogram plasmatického roztoku oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml podrobeného sekundární desorpce. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm

### **5.2.2 Porovnávání výtěžků při různých hodnotách pH plasmatického roztoku**

Po zjištění optimálních časových délek trvání sorpce a desorpce analytu na a z PDMS/DVB vlákna byl zkoušen vliv úpravy hodnoty pH na výtěžnost. Nejprve byla změřena hodnota pH pro připravený plasmatický roztok oxazepamu bez jeho další úpravy. Výsledkem měření se stala hodnota 7,7. Následně byla za užití zředěného roztoku kyseliny fosforečné zvyšována kyselost roztoku nejprve na hodnotu pH = 7, následně pak na 6 a 5. Obdobným způsobem se postupovalo i při úpravě pH vzorku směrem k vyšším hodnotám. Pro tuto úpravu bylo využito zředěného roztoku hydroxidu draselného, kterého bylo rovněž využito k úpravám pH mobilní fáze. Hodnota pH plasmatického vzorku byla směrem nahoru upravována na hodnoty 8 a 9.

<b>Hodnota pH</b>	<b>Plocha</b>	<b>Průměr ploch</b>	<b>Množství oxazepamu v nástřiku (µg)</b>	<b>Určená koncentrace (µg/ml)</b>	<b>Určená koncentrace (%)</b>
5	524647	527672	0,050	2,51	2,51
	530697				
6	478690	455997	0,043	2,17	2,17
	433303				
7	418788	416537	0,039	1,98	1,98
	414286				
7,7	511103	511284	0,048	2,43	2,43
	511465				
8	501925	503020	0,047	2,39	2,39
	504114				
9	513705	526973	0,050	2,50	2,50
	540241				

**Tab. č. 5** – Hodnoty mapující výtěžky jednotlivých extrakcí při různých hodnotách pH plasmatického roztoku

Každý z upravených roztoků byl podroben extrakci PDMS/DVB vláknem, a to za užití zjištěného optimálního časového schématu uvedeného v předešlé kapitole 5.2.1. Extrahovaný analyt se následně nechal podrobit HPLC analýze za užití pro tento účel optimálních chromatografických podmínek (kap. 5.1). Po vyhodnocení výtěžků jednotlivých extrakcí se došlo k hodnotám zaznamenaným v tab. č. 5. Při snižování pH došlo nejprve k velkému skoku, kdy výtěžnost pro pH = 7 byla výrazně nižší než ta u neupravovaného vzorku. Tato výtěžnost se nakonec ukázala být nejmenší ze všech vzorků vůbec. U pH = 6 byla výtěžnost vyšší než pro hodnotu pH = 5, která pak byla o něco málo vyšší než tomu bylo v případě vzorku bez úpravy. Hodně podobnou výtěžnost poskytoval ještě roztok vzorku s nejvyšší hodnotou pH = 9. Tato výtěžnost byla zároveň o něco vyšší než v případě vzorku bez úprav.

Nejlepších výtěžností se dosáhlo u vzorků, jejichž pH bylo v rámci rozsahu 5 – 9 nejnižší a nejvyšší. Vzhledem k tomu, že se ale od výtěžnosti u vzorku bez úpravy pH příliš neodlišovaly a pracnost prováděné úpravy nevyvážila poměrně nevýrazný efekt, v dalších prováděných extrakcích se žádná úprava pH plasmatických roztoků neprováděla.

### **5.2.3 Kvantitativní hodnocení oxazepamu obsaženého v plasmatickém roztoku**

Po zjištění optimálního časového schématu a optimální hodnoty pH plasmatického roztoku, za které se extrahovalo ze vzorku největší množství oxazepamu, bylo přistoupeno ke kvantitativnímu hodnocení tohoto analytu obsaženého v plasmatickém roztoku. Nejprve bylo připraveno celkem pět vzorků o různých koncentracích oxazepamu, které byly podrobeny extrakci PDMS/DVB vláknem za optimálních podmínek zjištěných v předešlých kapitolách. Všechny extrakty ze vzorků o koncentracích 50, 100, 200, 350 a 500 µg/ml byly podrobeny analýze HPLC a naměřeny pro ně hodnoty ploch píků (tab. č. 6). Tyto hodnoty byly následně zaneseny do grafu závislosti plochy píku na koncentraci (obr. č. 13) a zpracovány postupem pro lineární regresi.



Koncentrace ve vzorku [µg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Průměrná hodnota
50	191051	242491	216771
100	334485	334788	334637
200	550913	553090	552002
350	671324	679497	675411
500	803610	797573	800592

Tab. č. 6 – Hodnoty ploch pík oxazepamu pro jednotlivé koncentrace připravených vzorků

Regresní funkce :  $y = b x + a$

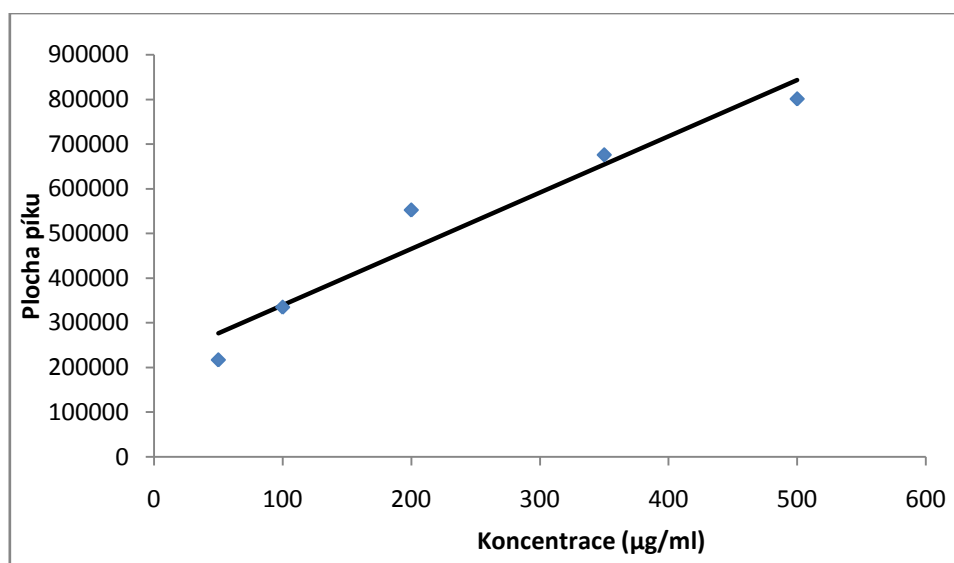
Počet bodů:  $n = 5$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek

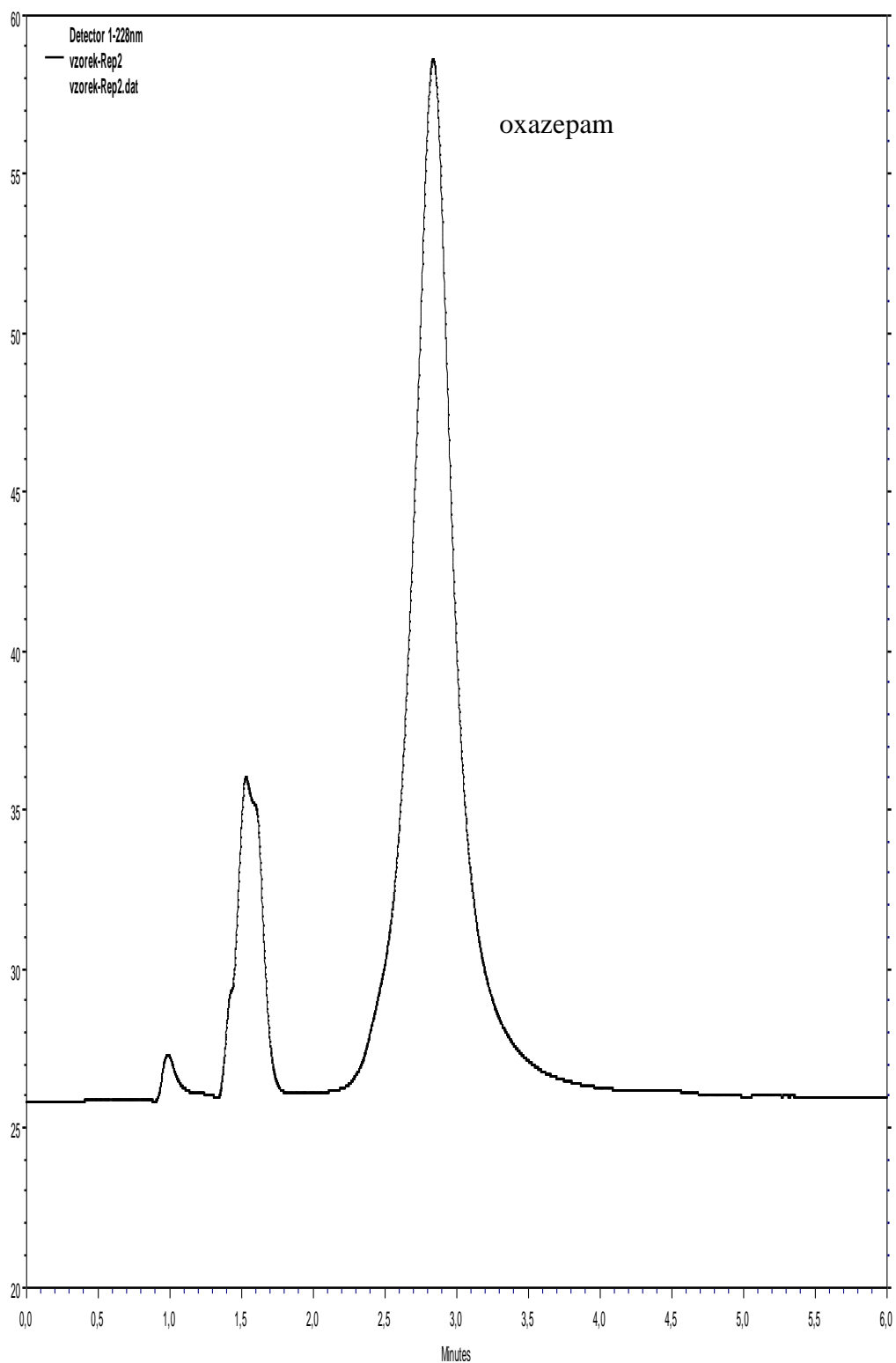
směrnice	$b = 1,26 \cdot 10^3$	$\pm$	$1,8 \cdot 10^2$
absolutní člen	$a = 2,14 \cdot 10^5$	$\pm$	$5,3 \cdot 10^4$

koeficient korelace	$R = 0,971$
reziduální odchylna	$s_{rez} = 6,67 \cdot 10^4$

Závislost  $y$  na  $x$  byla prokázána na hladině významnosti 0,01



Obr. č. 13 – Graf závislosti plochy píku na koncentraci



**Obr. č. 14** - HPLC chromatogram plasmatického roztoku oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml podrobeného extrakci při provádění kvantitativního hodnocení. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm, extrakce provedena v časovém schématu (sorpce/desorpce) 30/10 minut

Následně bylo provedeno analyzování modelových vzorků k ověření kalibrační křivky. Pro tento účel se připravily roztoky s koncentracemi oxazepamu 120 a 400 µg/ml, které byly následně na 12 hodin umístěny do mrazáku. Po uplynutí této doby se nechaly stát při laboratorní teplotě, aby došlo k jejich zahřátí. Po zahřátí pak byly podrobeny extrakci a jejich výtěžky následně analyzovány HPLC. Výsledné hodnoty ploch píků byly zaneseny do tab. č. 7 a vypočteny pro ně hodnoty určené koncentrace vycházející z parametrů kalibrační křivky.

Koncentrace ve vzorku [µg/ml]	Nástřík 1	Nástřík 2	Průměrná hodnota	Určená koncentrace [µg/ml]	Výtěžnost (%)
120	354950	352317	353634	110,82	92,35
400	718567	721963	720265	401,80	100,45

**Tab. č. 7** – Hodnoty ploch píků oxazepamu pro jednotlivé koncentrace připravených modelových vzorků a vypočtené hodnoty výtěžnosti

## 5.3 Validace metody extrakce PDMS/DVB vláknem

### 5.3.1 Přesnost metody

Validace metody extrakce PDMS/DVB vláknem byla prováděna šesti testy, a to hodnocením přesnosti metody, správnosti metody, linearity, selektivity, robustnosti a detekčního a kvantitativního limitu. Na začátek se provedlo validování metody prvním uvedeným testem. K jeho uskutečnění bylo připraveno pět vzorků plasmatických roztoků oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml. Každý z těchto vzorků byl podroben extrakci podle výše popsaného postupu (kap. 4.2) a za podmínek v kapitole 5.1 zjištěných jako optimální. Získaný extrakt byl následně analyzován dvěma nástřiky do systému HPLC. Tím byly získány hodnoty ploch píků charakteristických pro oxazepam (tab. č. 8) dále využité pro níže popsané výpočty.

	Nástřik 1	Nástřik 2	Průměrná hodnota
<b>Extrakce 1</b>	320581	317231	318906
<b>Extrakce 2</b>	351299	349312	350306
<b>Extrakce 3</b>	322685	343605	333145
<b>Extrakce 4</b>	323023	321591	322307
<b>Extrakce 5</b>	352218	349843	351031

**Tab. č. 8** – Hodnoty ploch píků oxazepamu pro jednotlivé provedené extrakce

Výpočet č. 1 – Výpočet průměrné hodnoty plochy píku ( $A_p$ )

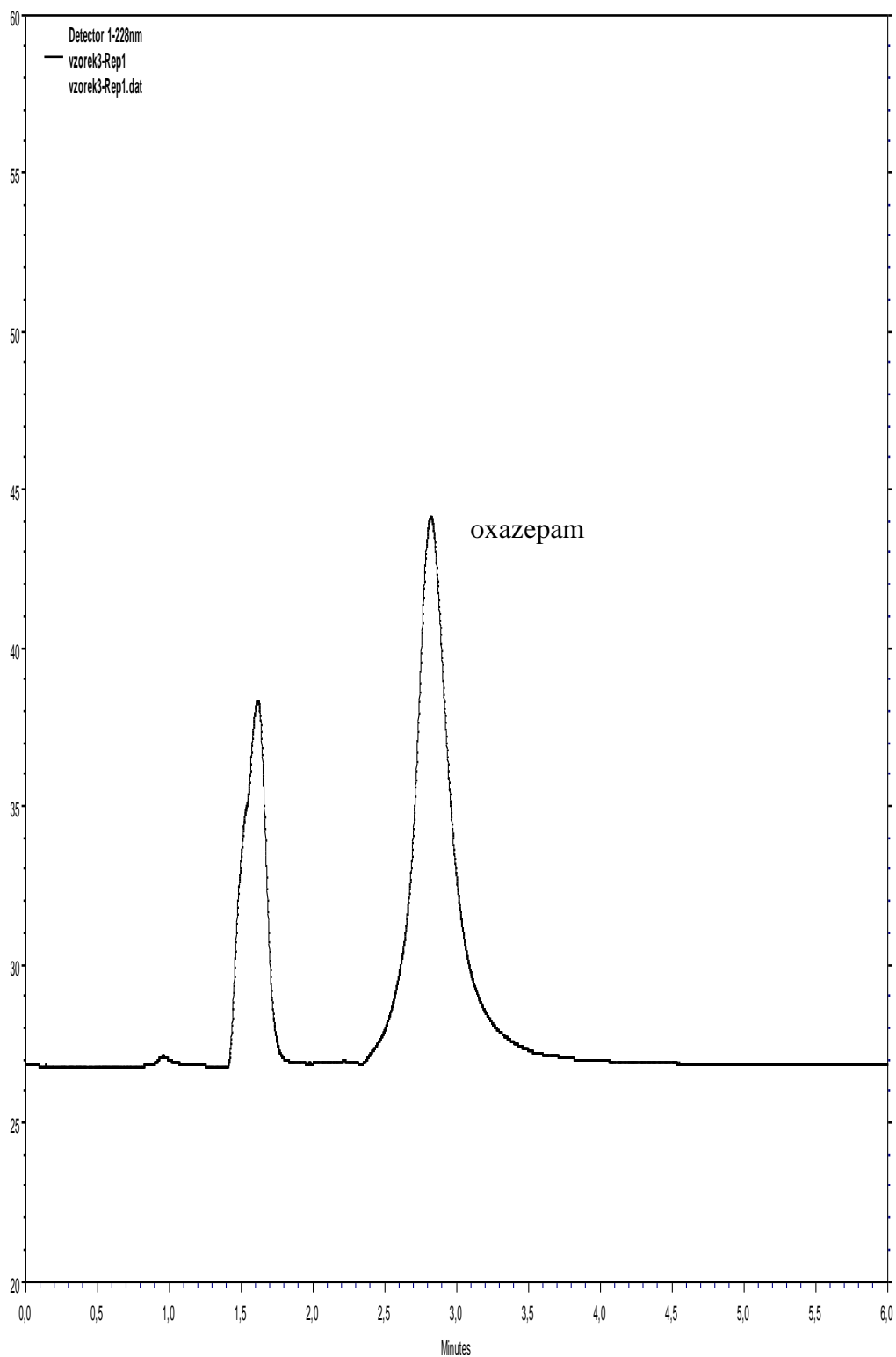
$$A_p = \Sigma A_i / n \gg \text{pro hodnoty zaznamenané v tab. č. 8 } A_p = 335139$$

Výpočet č. 2 – Výpočet směrodatné odchylky ( $s$ )

$$s = \sqrt{[\Sigma (A_i - A_p)^2 / (n - 1)]} \gg \text{pro zjištěné hodnoty ploch píků z tab. č. 8 } s = 15122$$

Výpočet č. 3 – Výpočet relativní směrodatné odchylky ( $s_R$ )

$$s_R = 100 \cdot s / A_p \gg \text{pro hodnoty vypočtené v předešlých bodech } s_R = 4,512 \%$$



**Obr. č. 15** - HPLC chromatogram plasmatického roztoku oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml podrobeného extrakci při stanovování přesnosti metody. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm, extrakce provedena v časovém schématu (sorpce/desorpce) 30/10 minut

### 5.3.2 Správnost metody

Druhým testem, kterým se prováděla validace metody, byla její správnost. Pro provedení tohoto validačního kroku bylo připraveno pět samostatných vzorků plasmatických roztoků oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml. Podobně jako v případě předcházející přesnosti metody byl každý z těchto vzorků podroben mikroextrakci PDMS/DVB vláknem postupem popsáným v kap. 4.3. Získaný extrakt byl následně podroben analýze pomocí HPLC, přičemž každý byl na kolonu nastříknut celkem dvakrát. Z výsledných hodnot ploch pík oxazepamu (tab. č. 9) se za užití parametrů regresní přímky z kap. 5.2.3 spočetla pro jednotlivé extrakce hodnota určené koncentrace. Tyto hodnoty byly následně vztaženy na známou koncentraci oxazepamu v plasmatickém roztoku podrobenému extrakci, která činila 100 µg/ml. Při této koncentraci se tak hodnota procentuální výtěžnosti rovnala vypočtené určené koncentraci (tab. č. 9). Výsledných hodnot bylo zároveň využito k výpočtům níže popsaných veličin charakterizujících správnost metody.

	Nástřík 1	Nástřík 2	Průměrná hodnota	Určená koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)
<b>Extrakce 1</b>	349224	347613	348419	106,68	106,68
<b>Extrakce 2</b>	360059	373265	366662	121,16	121,16
<b>Extrakce 3</b>	350202	353378	351790	109,36	109,36
<b>Extrakce 4</b>	360843	357402	359123	115,18	115,18
<b>Extrakce 5</b>	375186	376681	375934	128,52	128,52

**Tab. č. 9** – Hodnoty ploch pík oxazepamu pro jednotlivé provedené extrakce a vypočtené výtěžnosti

Výpočet č. 1 – Výpočet průměrné výtěžnosti ( $R_p$ )

$$R_p = \Sigma R_i / n \gg \text{pro hodnoty zaznamenané v tab. č. 9 } R_p = 116,18$$

Výpočet č. 2 – Výpočet směrodatné odchylky (s)

$$s = \sqrt{[\Sigma (R_i - R_p)^2 / (n - 1)]} \gg \text{pro vypočtené hodnoty výtěžností z tab. č. 9 } s = 8,87$$

Výpočet č. 3 – Výpočet relativní směrodatné odchylky ( $s_R$ )

$$s_R = 100 \cdot s / R_p \gg \text{pro hodnoty vypočtené v předešlých bodech } s_R = 7,63 \%$$

### **5.3.3 Linearita**

Při hodnocení linearity se vycházelo z měření a výpočtů provedených v kap. 5.2.3. V jejím rámci se připravilo pět modelových vzorků o různých koncentracích, u nichž se zjistily hodnoty ploch píků a jednotlivé body byly zaneseny do grafu závislosti plochy píku na koncentraci (obr. č. 13). Postupem lineární regrese se pak vytvořila kalibrační křivka a byl zjištěn korelační koeficient, který měl v tomto případě hodnotu 0,971. Ve vymezeném rozmezí koncentrací od 50 do 500 µg/ml lze kvantitativní hodnocení oxazepamu označit za lineární.

### **5.3.4 Selektivita**

Test selektivity byl prováděn naměřením ploch píků připraveného roztoku oxazepamu, který měl koncentraci 100 µg/ml. Tento roztok byl podroben celkem třem extrakcím PDMS/DVB vláknem. Pro každou extrakci byly naměřeny odpovídající plochy píků. Z nich byla vypočtena průměrná hodnota potřebná do následujících výpočtů. K nim byla zároveň zjištěna hodnota plochy píku vycházející z parametrů regresní funkce v kvantitativním hodnocení (kap. 5.2.3).

Kromě provedených výpočtů se selektivita potvrzovala i graficky na základě porovnání tří chromatogramů. V první řadě byl analýze HPLC podroben vzorek samotného methanolu (obr. č. 17) a následně extrakt provedený na vzorku samotné plasmy bez přídavku oxazepamu (obr. č. 16). Třetí záznam pak odpovídal extrahovanému oxazepamu z jeho plasmatického roztoku (obr. č. 18). Na základě porovnání těchto tří záznamů lze konstatovat, že v prázdné plasmě žádný pík případných reziduí z biologického materiálu neinterferuje s píkem oxazepamu. Rovněž na záznamu samotného methanolu je vidět, že ani toto rozpouštědlo analýzu oxazepamu nikterak neruší.

#### Výpočet č. 1 – Výpočet plochy píku z parametrů regresní funkce z testu linearity ( $A_0$ )

$$A_0 = a + b c_i \gg \text{pro hodnoty z testu linearit} A_0 = 214000 + 1260 \cdot 100 = 340000$$

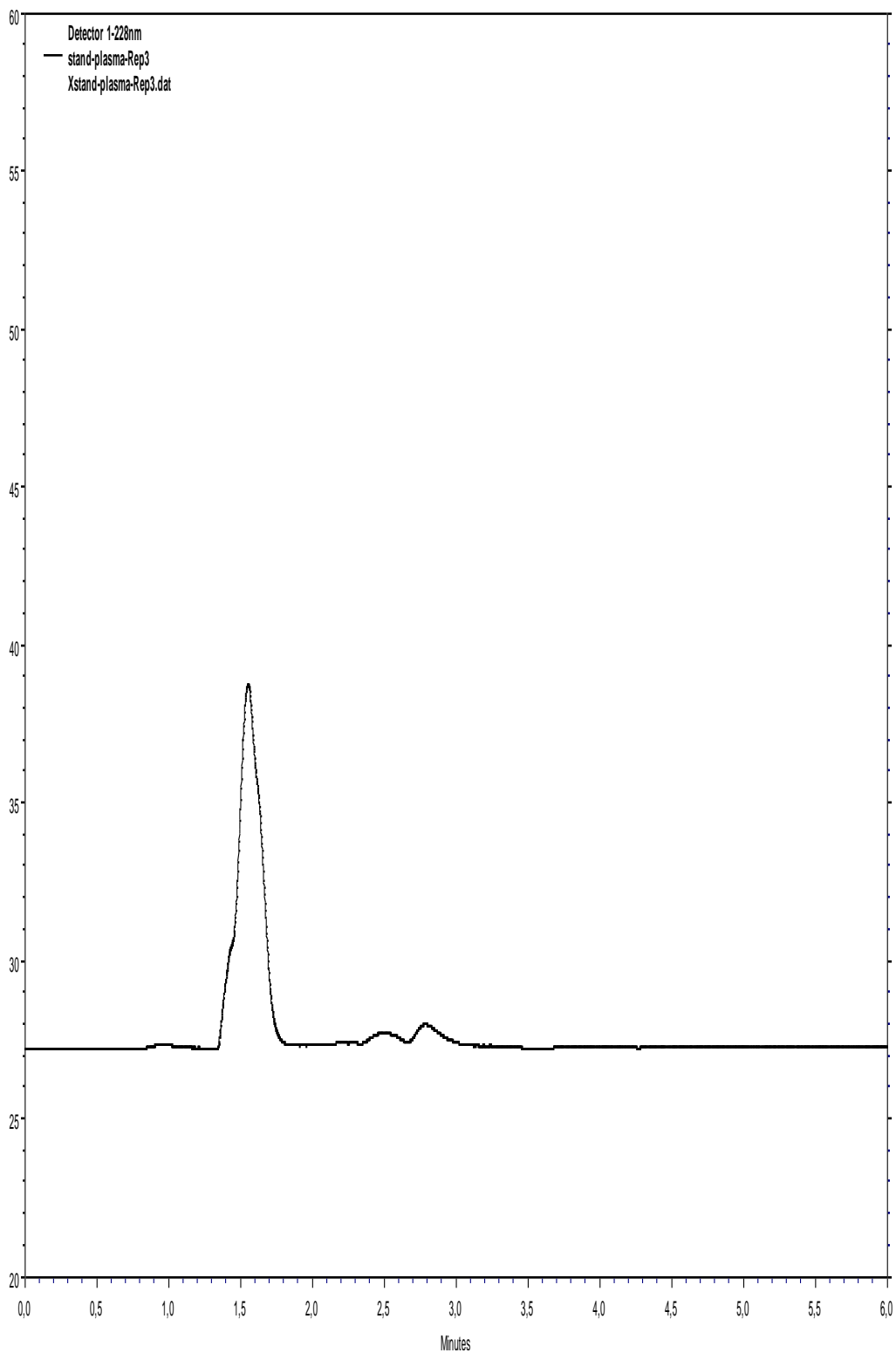
#### Výpočet č. 2 – Výpočet selektivity

Získané plochy píků odpovídající třem provedeným extrakcím - 343224, 349617 a 345135

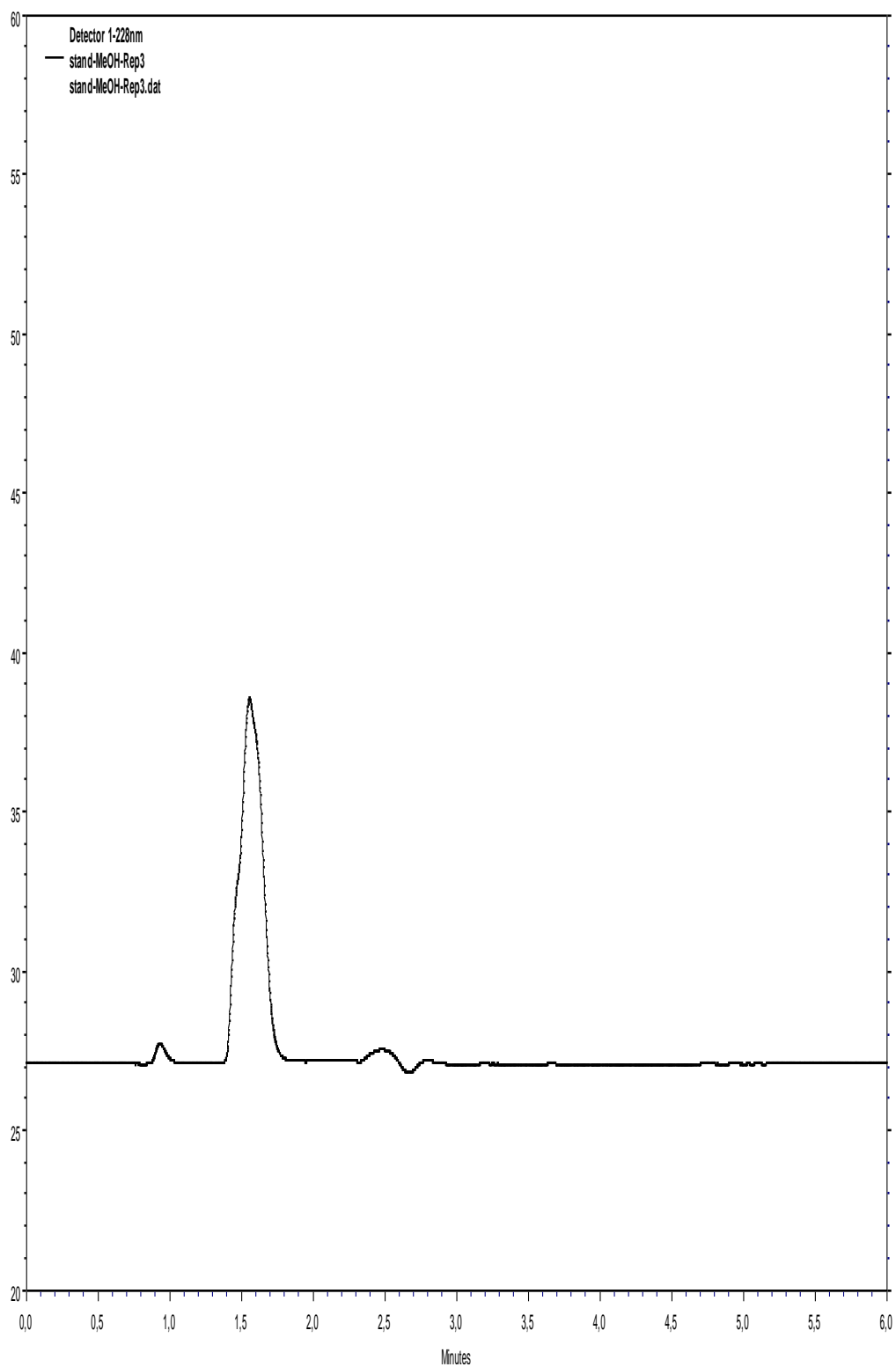
$$S_L (\%) = 100 \cdot A_0 - A_1 / A_0$$

*Pro zjištěné hodnoty »  $S_L = 100 \cdot 340000 - 345992 / 340000 = 98,98 \%$*

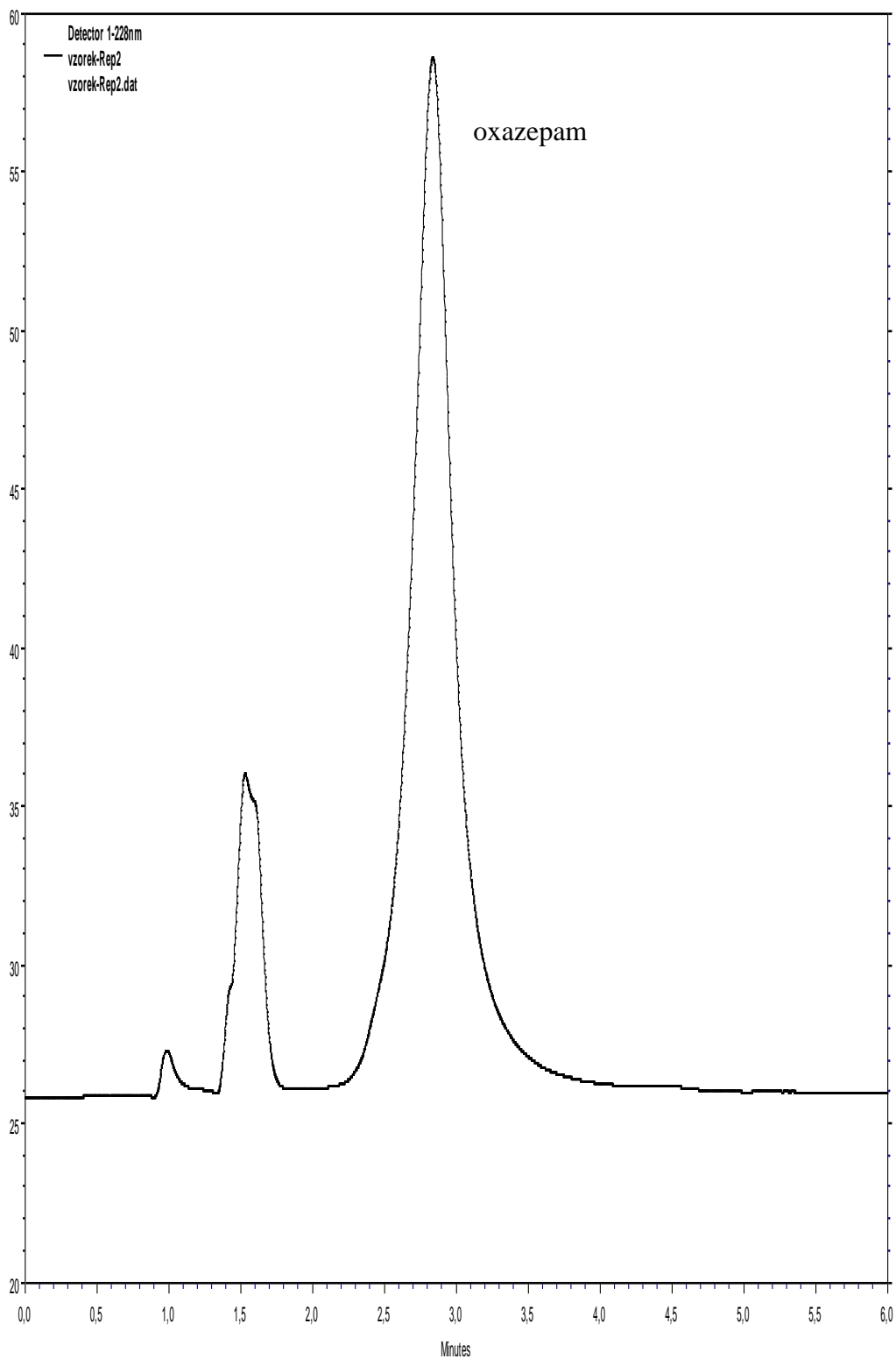




**Obr. č. 16** - HPLC chromatogram extraktu získaného z čisté plasmy při extrakci prováděné v časovém schématu (sorpce/desorpce) 30/10 minut. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm



**Obr. č. 17** - HPLC chromatogram nástřiku čistého methanolu. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm

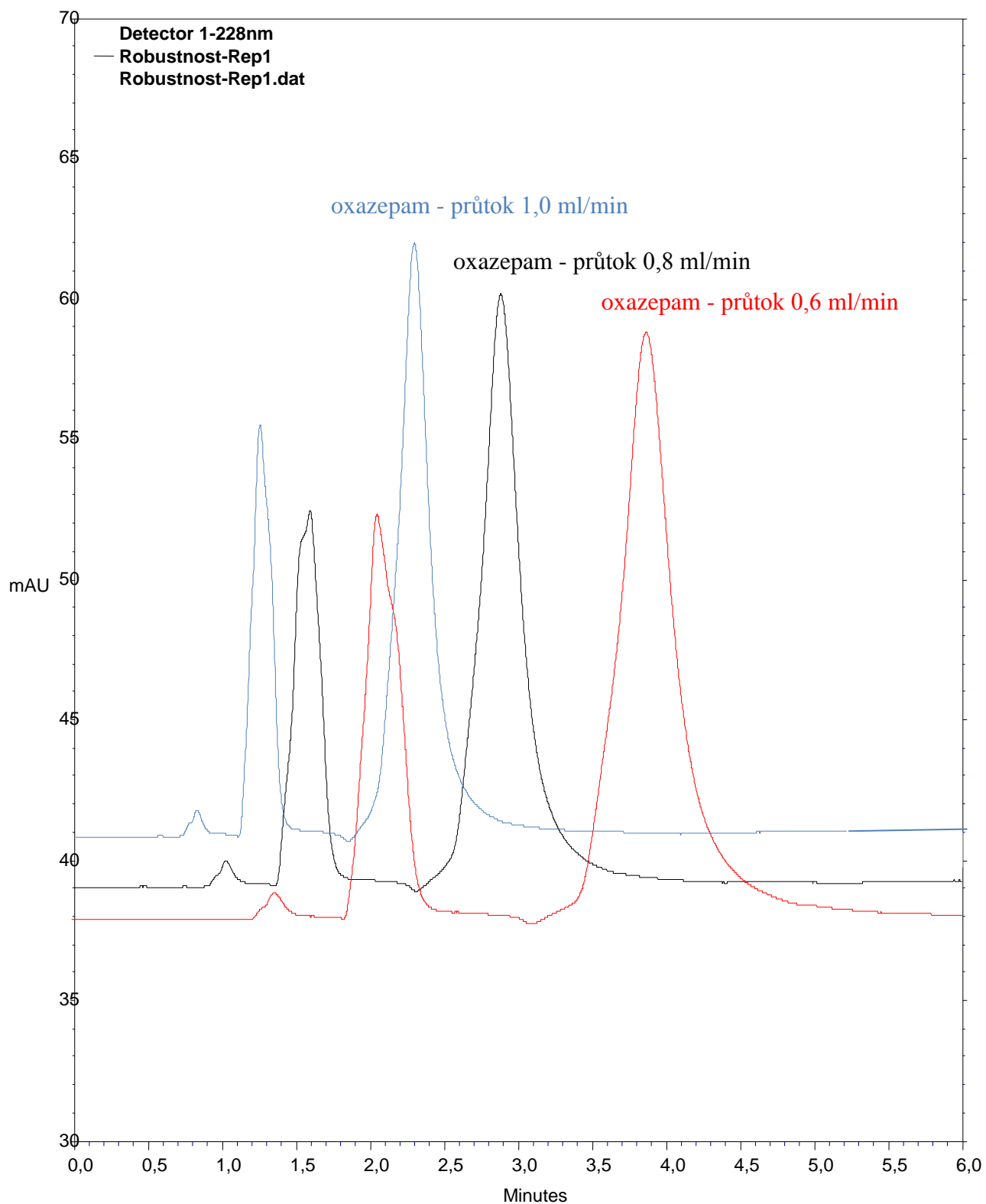


**Obr. č. 18** - HPLC chromatogram plasmatického roztoku oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml podrobeného extrakci při provádění testu selektivity. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm, extrakce provedena v časovém schématu (sorpce/desorpce) 30/10 minut

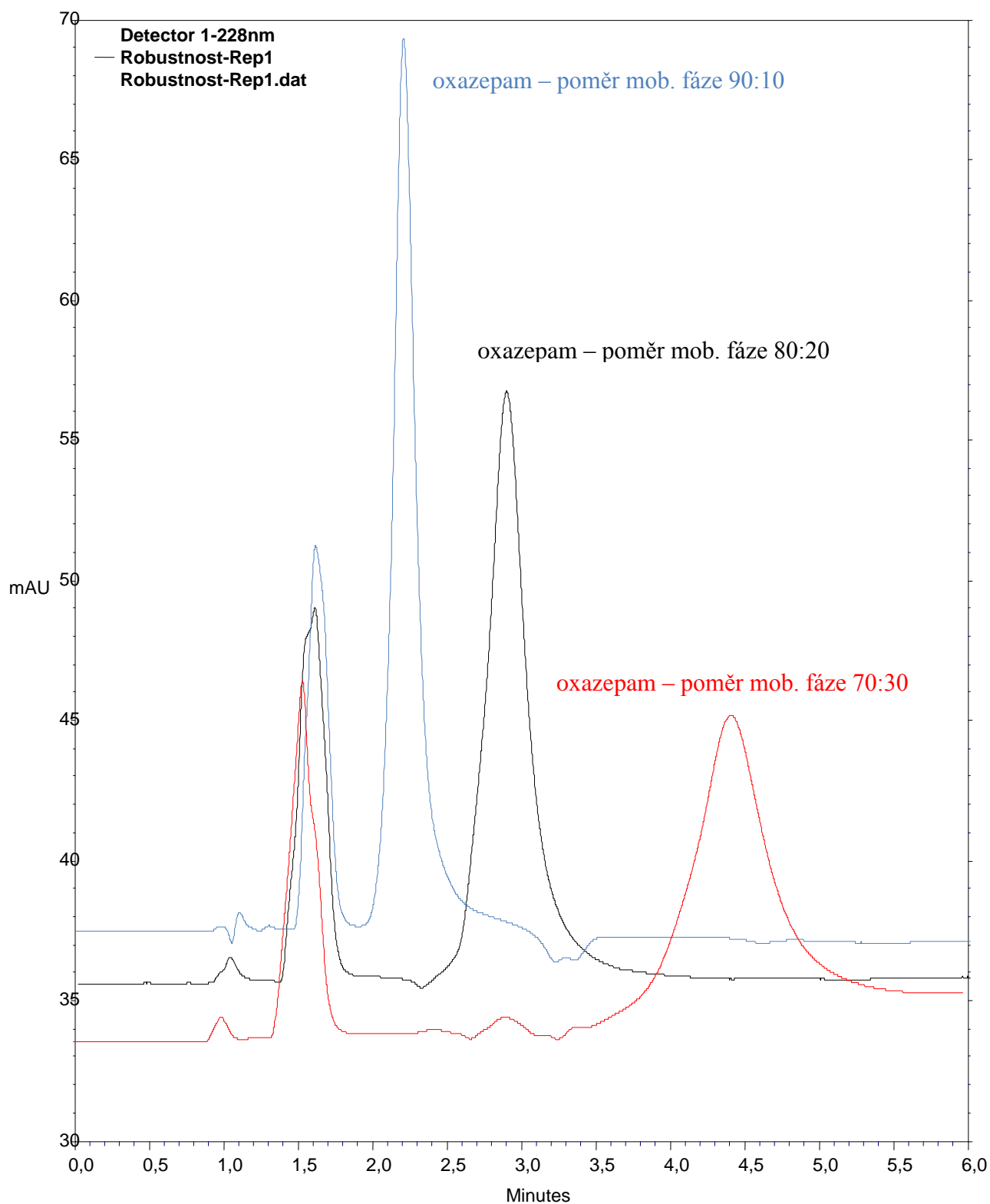
### **5.3.5 Robustnost**

Zjišťování robustnosti metody bylo prováděno na úpravách třech parametrů analýzy, a to rychlosti průtoku, složení mobilní fáze a hodnoty pH mobilní fáze. Připraven byl roztok oxazepamu o koncentraci 100 µg/ml, který byl podroben přímo analýze kapalinovým chromatografem bez provádění extrakce. Rychlost průtoku byla upravena na hodnoty o 0,2 ml/min vyšší a nižší, než byla ta obvykle využívaná. Jednalo se tedy o rychlosti 0,6 a 1,0 ml/min. Z výsledných chromatogramů se vybraly jednotlivé plochy píků, jež byly pro srovnání barevně odlišeny a vloženy do jednoho grafu (obr. č. 19). Z tohoto porovnání jsou při změnách průtoku patrné rozdíly v retenčních časech oxazepamu, přičemž rychlost vymytí oxazepamu z kolony přímou úměrou koreluje s rychlostí průtoku.

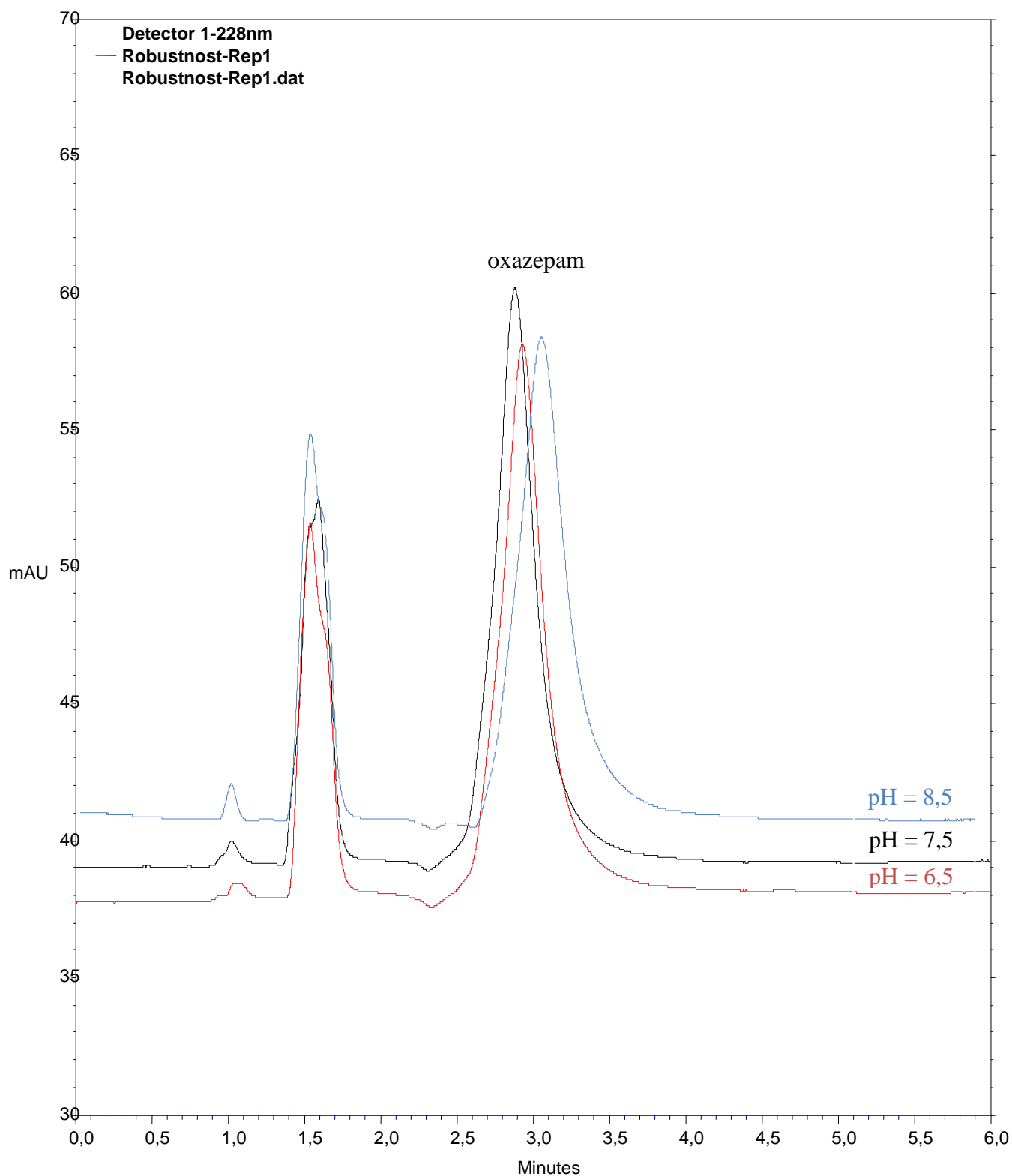
V případě úpravy složení mobilní fáze byly poměry methanol:voda změněny z obvyklých 80:20 na 90:10 a 70:30. Analogickým způsobem byly vybrány i nižší a vyšší hodnoty pH mobilní fáze, které se upravovaly na 6,5 a 8,5 oproti v jednotlivých analýzách používaným 7,5. I u úprav složení mobilní fáze a hodnoty pH byly vytvořeny společné grafy se zanesením jednotlivých záznamů. Rozdílné složení mobilní fáze mělo vliv na retenční čas i kvalitu výsledného píku. Čím větší podíl methanolu mobilní fáze obsahovala, tím byl pík ostřejší a retenční čas nižší (obr. č. 20). V případě změn pH byly rozdíly mezi jednotlivými píky minimální (obr. č. 21).



**Obr. č. 19** – Grafické srovnání záznamů analýz identického vzorku prováděných při různých rychlostech průtoku. Stanovováno při ostatních chromatografických podmínkách nezměněných – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; detekce při 228 nm



**Obr. č. 20** - Grafické srovnání záznamů analýz identického vzorku prováděných při různých poměrech složek mobilní fáze. Stanovováno při ostatních chromatografických podmínkách nezměněných – pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm



**Obr. č. 21** – Grafické srovnání záznamů analýz identického vzorku prováděných při různých hodnotách pH mobilní fáze. Stanovováno při ostatních chromatografických podmínkách nezměněných – mobilní fáze: methanol:voda 80:20; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm

### 5.3.6 Detekční a kvantitativní limit

Zjišťování detekčního a kvantitativního limitu bylo prováděno na vzorku s nulovým obsahem analytu. Na vzniklém chromatogramu byla vytažena a zvětšena oblast záznamu šumu v okolí známého retenčního času oxazepamu. Do tohoto záznamu byla zanesena do odhadnutého středu šumu nulová linie a následně od ní změřeny největší kladná a největší záporná amplituda šumu. Z těchto hodnot pak byla vypočtena směrodatná odchylka podle vzorce v níže uvedených výpočtech.

#### Výpočet č. 1 – Výpočet směrodatné odchylky

Změřené hodnoty největších amplitud šumu » *kladná*  $r^+ = 0,013$ , *záporná*  $r^- = 0,006$

$s_n = (r^+ - r^-) / 5$  » z *výše uvedených hodnot amplitud vychází směrodatná odchylka*  $s_n = 0,0038$

#### Výpočet č. 2 – Výpočet parametrů píku

Pro samotný výpočet limitů bylo nejprve třeba zjistit hodnotu  $K$  vystihující poměr plocha píku/výška píku a hodnotu  $b_1$  vyjadřující poměr plocha píku/koncentrace daný regresní rovnicí z kvantitativního hodnocení (kap. 5.2.3).

$$K = 21324604 / 1140 = 18706$$

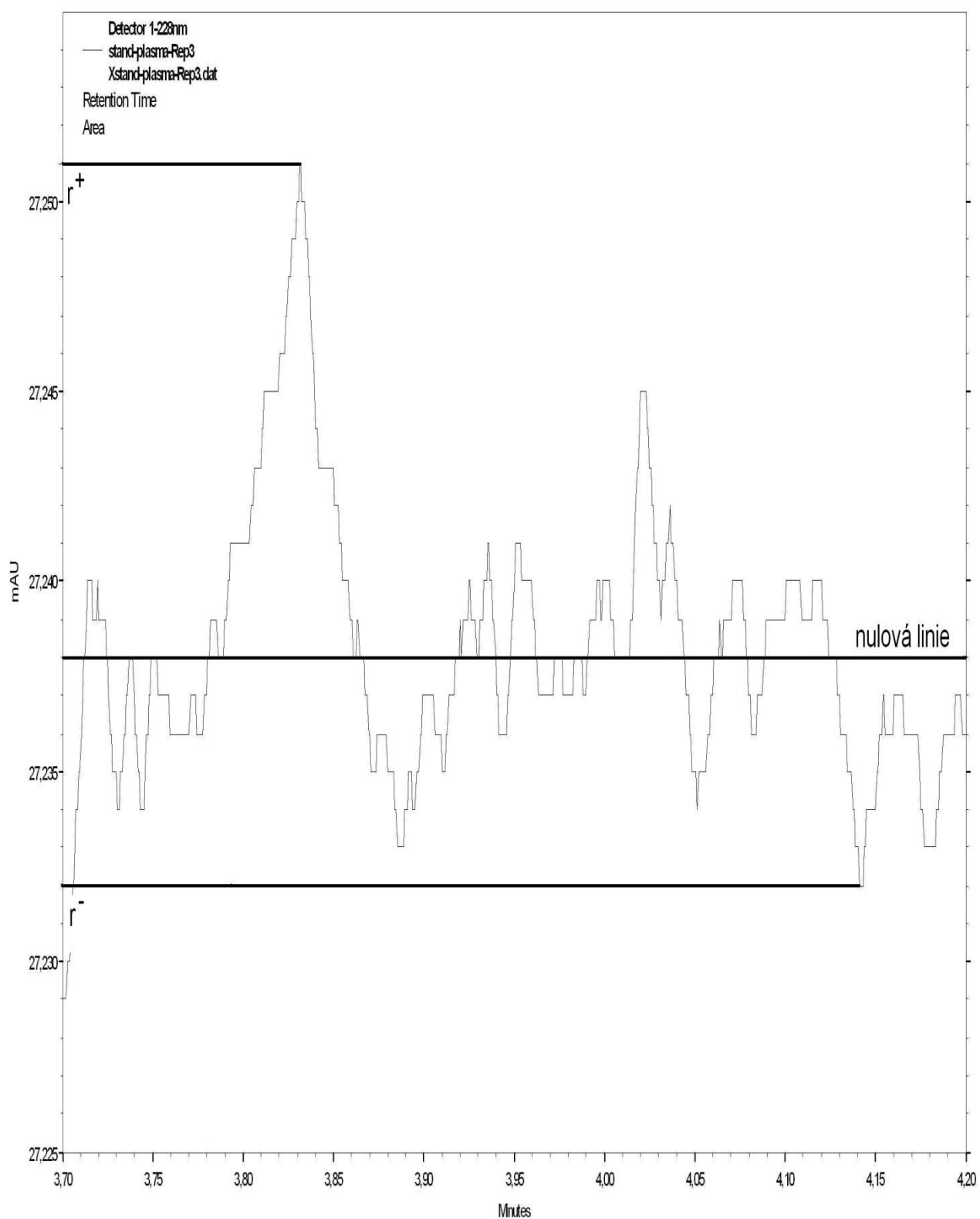
$$b = 1260$$

#### Výpočet č. 3 – Výpočet detekčního (LOD) a kvantitativního limitu (LOQ)

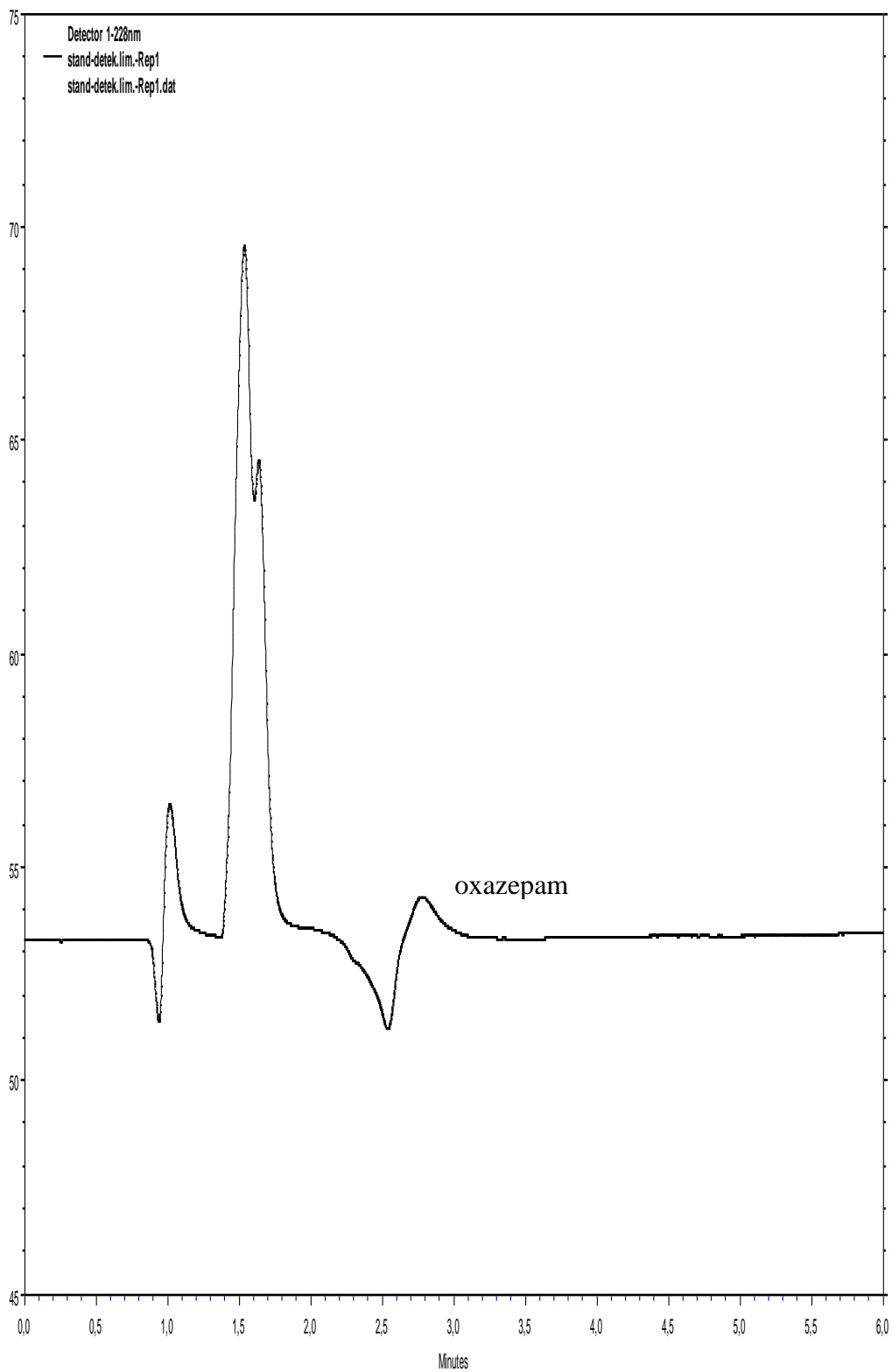
$LOD = 3 s_n K / b$  » *pro zjištěné hodnoty v předešlých bodech výpočtů*  $LOD = 0,169 \mu\text{g/ml}$

$LOQ = 10 s_n K / b$  » *pro zjištěné hodnoty v předešlých bodech výpočtů*  $LOQ = 0,564 \mu\text{g/ml}$

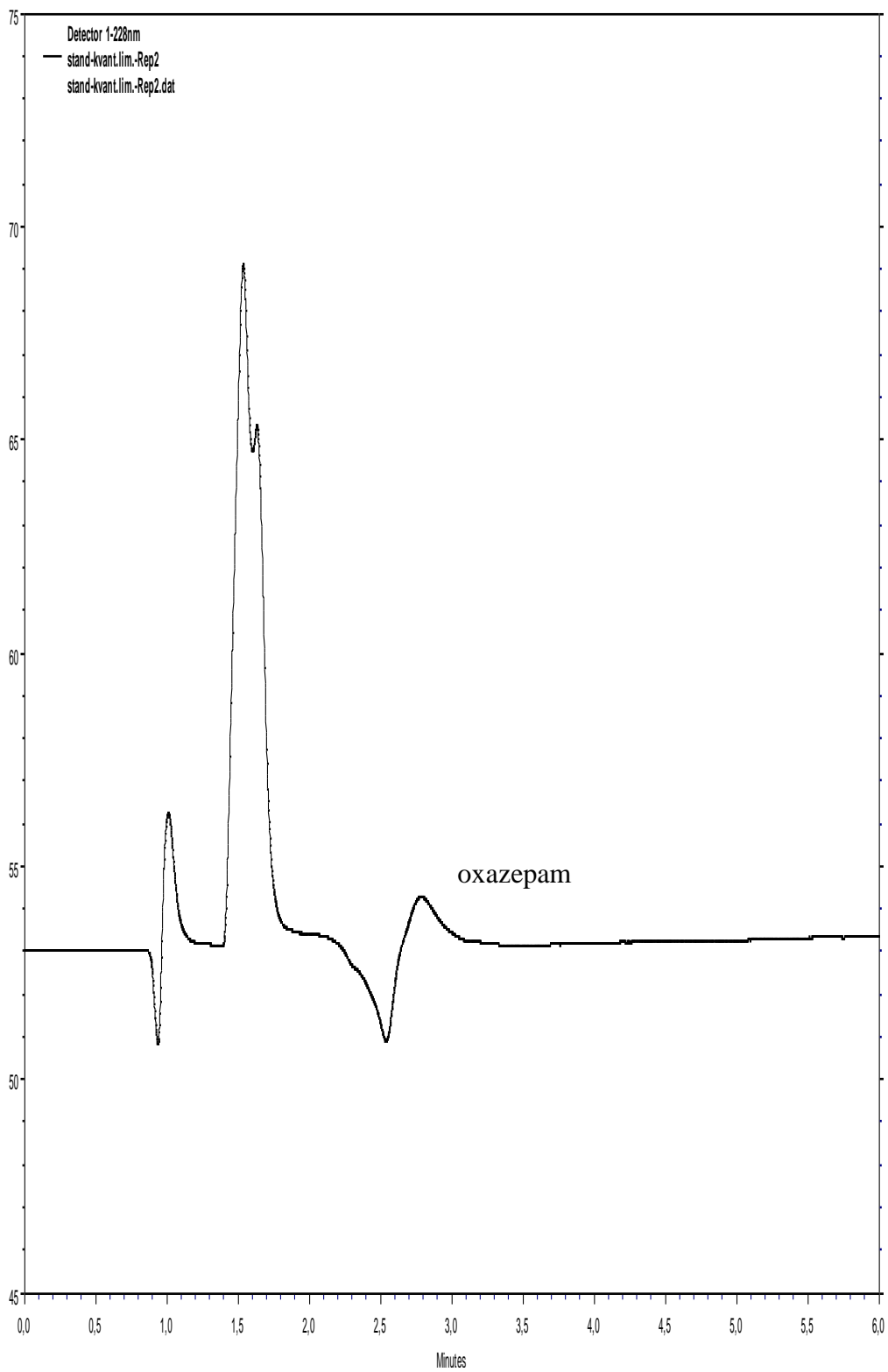




**Obr. č. 22** – Oblast záznamu šumu v okolí retenčního času oxazepamu u vzorku s nulovým obsahem analytu s vyznačením nulové linie a nejvyšší kladné a záporné amplitudy šumu. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm



**Obr. č. 23** – HPLC chromatogram roztoku oxazepamu o koncentraci odpovídající detekčnímu limitu. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm



**Obr. č. 24** – HPLC chromatogram roztoku oxazepamu o koncentraci odpovídající kvantitativnímu limitu. Stanovováno při chromatografických podmínkách – mobilní fáze: methanol:voda 80:20, pH = 7,5; průtok: 0,8 ml/min; detekce při 228 nm

## **6. ZÁVĚR**

Náplní této rigorózní práce bylo zabývání se využitím metody mikroextrakce tuhou fází pro extrakci oxazepamu z plasmu. K provádění této speciální extrakční metody bylo využito k tomu určeného polydimethylsiloxan/divinylbenzenového (PDMS/DVB) vlákna. Tím byl extrahován výše zmíněný oxazepam z jeho plasmatického roztoku a výsledný extrakt následně analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

V první části práce byla prováděna optimalizace metody tak, aby byl její průběh co možná nejefektivnější. V průběhu hledání optimálních podmínek extrakce se upravovaly jednak časová schémata sorpce a desorpce a zjišťováno bylo rovněž ideální pH roztoku, při němž by se extrahovalo co největší množství oxazepamu. Extrahované podíly cílové látky byly pokaždé analyzovány pomocí HPLC při stabilních chromatografických podmínkách. Ty byly následující: jako mobilní fáze zvolena směs methanol:voda o poměru 80:20, pH mobilní fáze upraveno na 7,5, průtok nastaven na rychlost 0,8 ml/min a detekce prováděna při 228 nm.

Při zjišťování ideálního časového schématu provádění extrakce se došlo v úsecích dvou až třiceti minut pro sorpci a desorpci k závěru, že nejefektivnější je sorpce trvající 30 a desorpce pak 10 minut. Sekundární desorpce následující po těchto deseti minutách již další podíl extraktu nepřinesla. Před hledáním nejvhodnější hodnoty pH byla naměřena hodnota plasmatického roztoku oxazepamu beze změny. Zjištěná hodnota 7,7 se v porovnání s roztoky s upravenými hodnotami ukázala jako dostatečně efektivní.

Po zjištění optimálních podmínek pro provádění extrakce bylo přistoupeno ke kvantitativnímu hodnocení oxazepamu obsaženému v plasmatickém roztoku. V rámci tohoto hodnocení se využitím pěti modelových vzorků o různých koncentracích (50, 100, 200, 350 a 500  $\mu\text{g/ml}$ ) a následnými výpočty sestavila kalibrační křivka a byl zjištěn korelační koeficient, který měl hodnotu 0,971.

Další a zároveň poslední částí práce bylo provedení validace metody, a to testů přesnosti, správnosti, linearity, selektivity, robustnosti a zjištění detekčního a kvantitativního limitu. Pro test přesnosti bylo připraveno pět vzorků, které byly postupně podrobeny extrakci. Z výsledných ploch píků charakteristických pro sledovaný analyt byla vypočtena směrodatná odchylka 4,5 % charakterizující přesnost metody. Obdobným způsobem byla zjišťována směrodatná odchylka i u testu správnosti, kde se však vycházelo z přepočtů ploch píků na koncentraci užitím rovnice pro kalibrační křivku. Zde bylo dosaženo výsledku 7,63 %.

Testována byla rovněž linearita, která vycházela z hodnot zjištěných v rámci kapitoly zabývající se kvantitativním hodnocením oxazepamu v plasmatickém roztoku. Korelační koeficient nabylo pro daná měření hodnoty 0,971. Získaných hodnot z linearity se rovněž

využilo k dalšímu testu, kterým bylo měření selektivity. U dané metody byla zjištěna její selektivita na úrovni 98,98 %.

V testu robustnosti se zjišťovala míra ovlivnění přesnosti stanovení malými změnami pracovních podmínek. Tyto změny byly prováděny na úrovni rychlosti průtoku, složení mobilní fáze a hodnoty pH mobilní fáze. Vyhodnocení robustnosti bylo provedeno na základě grafického porovnání píků charakteristických pro extrakci oxazepamu provedenou po jednotlivých výše uvedených změnách. Závěrečným testem validace metody se stalo zjišťování detekčního a kvantitativního limitu. Provedením jednotlivých výpočtů se došlo k hodnotám 0,169  $\mu\text{g/ml}$  pro detekční a 0,564  $\mu\text{g/ml}$  pro kvantitativní limit.

## **7.LITERATURA**

- 1.) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie; SNTL; Praha 1985
- 2.) <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>; únor 2010
- 3.) [http://www.hplc.cz/Faq/monolithic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Faq/monolithic_columns.htm); leden 2010
- 4.) <http://www.chromatography-online.org/topics/diode/array.html>; únor 2010
- 5.) Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalytika léků; Avicenum; Praha 1990
- 6.) Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L.: Practical HPLC method development; John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken 1997
- 7.) <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>; únor 2010
- 8.) Pawliszyn J., Pedersen-Bjergaard S.: Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends; J. Chromatogr. Sci. 44, 2006; str. 290 – 307
- 9.) Pragst F.: Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology; Anal. Bioanal. Chem. 388, 2007; str. 1393 – 1414
- 10.) Augusto F., Pires Valente A. L.: Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis; Trends Anal. Chem. 21, 2002; str. 428 – 438
- 11.) Pawliszyn J., Lord H.: Evolution of solid-phase microextraction technology; J. Chromatogr. A 885, 2000; str. 153 – 193
- 12.) Prosen H., Zupančič-Kralj L.: Solid-phase microextraction; Trends Anal. Chem. 18, 1999; str. 272 – 282
- 13.) Holík M.: Validace analytických metod; Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity; Brno 1995
- 14.) [http://www.hplc.cz/Validace/index.htm#\\_Obsah](http://www.hplc.cz/Validace/index.htm#_Obsah); březen 2010
- 15.) Klimeš J. a kolektiv; Kontrola léčiv II.; Nakladatelství Karolinum; Praha; 2004
- 16.) Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie; Galén; Praha; 2007
- 17.) Český lékopis 2009; Grada Publishing; Praha; 2009
- 18.) Frison G., Tedeschi L., Maietti S., Ferrara S. D.: Determination of midazolam in human plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry; Rapid Commun. Mass Spectrom. 15, 2001; str. 2497 – 2501



- 19.)** Jinno K., Taniguchi M., Hayashida M.: Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 1998; str. 1081-1091
- 20.)** Aresta A., Monaci L., Zambonin C. G.: Determination of delorazepam in urine by solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 2002; str. 965-972
- 21.)** Guan F., Seno H., Ishii A., Watanabe K., Kumazawa T., Hattori H., Suzuki O.: Solid-Phase Microextraction and GC-ECD of Benzophenones for Detection of Benzodiazepines in Urine; *J. Anal. Toxicol.* 23, 1999; str. 54 – 61
- 22.)** Yuan H., Pawliszyn J.: Application of Solid-Phase Microextraction in the Determination of Diazepam Binding to Human Serum Albumin; *Anal. Chem.* 73, 2001; str. 4410 – 4416
- 23.)** Yuan H., Mester Z., Lord H., Pawliszyn J.: Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Selected Benzodiazepines; *J. Anal. Toxicol.* 24, 2000; str. 718 – 725
- 24.)** Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: Analysis of oxazepam in urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection by post-column derivatization; *J. Chromatogr.* 616, 1993; str. 344 – 348
- 25.)** Borges K. B., Freire E. F., Martins I., Bastos de Siqueira M. E. P.: Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma; *Talanta* 78, 2009; str. 233 – 241
- 26.)** Raška M.: Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií II; Diplomová práce; Farmaceutická fakulta UK Hradec Králové; 2009

## **8. POUŽITÉ ZKRATKY**

**HPLC** (High performance liquid chromatography) – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

**LLE** (Liquid-liquid extraction) – Extrakce kapalina-kapalina

**SPE** (Solid phase extraction) – Extrakce tuhou fází

**RP-SPE** (Reversed phase-solid phase extraction) – Extrakce tuhou fází s reverzní fází

**SPME** (Solid Phase Microextraction) – Mikroextrakce tuhou fází

**PTFE** – Polytetrafluorethylen

**PDMS** – Polydimethylsiloxan

**PA** – Polyakrylát

**PDMS/DVB** – Polydimethylsiloxan/divinylbenzen

**CW/DVB** – Carbowax/divinylbenzen

**CAR/PDMS** – Carboxen/polydimethylsiloxan

**CW/TPR** – Carbowax/templated resin

**DVB/CAR/PDMS** – Divinylbenzen/Carboxen na polydimethylsiloxanovém podkladu

**EDTA** – Ethylendiamintetraoctová kyselina

**GABA** –  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

**SM-HPLC** – Semi-microcolumn-high performance liquid chromatography

**LC-ESI-MS** – Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry

**GC** (Gas chromatography) – Plynová chromatografie

**GC-MS** (Gas chromatography-mass spectrometry) – Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

**GC-ECD** (Gas chromatography-electron capture detection) – Plynová chromatografie s detekcí elektronovým záchytem

## ABSTRAKT

### **Mikroextrakce oxazepamu tuhou fází z plasmy**

Rigorózní práce

Mgr. Martin Raška

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

Tato rigorózní práce se zabývá problematikou extrahování účinných látek z biologického materiálu. Konkrétně je zaměřena na extrahování oxazepamu z 10 % plasmatického roztoku užitím mikroextrakce tuhou fází (SPME) a následnou analýzou extrahovaného podílu za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Mikroextrakce tuhou fází je ideální metodou pro zpracování biologického materiálu. Jedná se o jednoduchou a účinnou techniku přípravy vzorku, která v sobě integruje sorpci, desorpci a zkoncentrování analytu, nevyžaduje užití rozpouštědel ani složitých aparatur. Jednoduchou podstatou této metody je vystavení kapalného či plynného vzorku malému množství extrakční fáze. Extrakce byla v praktické části této práce prováděna z plasmatického roztoku a k jejímu provedení bylo využito polydimethylsiloxan/divinylbenzenové vlákno (PDMS/DVB). S výjimkou kvantitativního hodnocení se k extrakcím využívalo plasmatických roztoků o koncentraci oxazepamu 0,1 mg/ml. V první části praktického oddílu se zjišťovaly optimální extrakční podmínky. Změny pH plasmatického roztoku k vyšším i nižším hodnotám žádné významné zlepšení extrakce nepřinesly. Jako nejefektivnější časové rozvržení extrakce se ukázalo trvání sorpce 30 minut a desorpce 10 minut. Následovalo kvantitativní hodnocení oxazepamu, během kterého se vypracovala kalibrační křivka. Závěrečná část práce byla zaměřena na validaci použité metody, během které se provedlo hodnocení její přesnosti, správnosti, linearity, selektivity, robustnosti a detekčního a kvantitativního limitu.

## ABSTRACT

### **Solid-phase microextraction of oxazepam from plasma**

Rigorous thesis

Mgr. Martin Raška

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

This rigorous thesis deals with the issue of extracting active compounds from the biological material. It's specifically focused on the extraction of oxazepam from plasma sample (containing 10 percent of plasma) using solid-phase microextraction (SPME) followed by the analysis of extracted compound using high performance liquid chromatography (HPLC). SPME is ideal method for biological material processing. It's simple and effective sample preparation technique integrating sorption, desorption and concentration of an analyte, that doesn't require use of any solvents or complicated apparatus. The basic principle of this method is exposure of liquid or fluid sample to a small amount of extraction phase. Polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB) fiber was used for the extractions from plasma samples undertaken in the practical part of this thesis. Except the quantitative analysis there were plasma samples containing oxazepam in concentration of 0,1 mg/ml used. The optimal conditions of the extraction were determined in the first part of the practical section. Adjusting pH of the plasma sample had no positive effect to improve the extraction. Time schedule sorption/desorption - 30/10 minutes proved to be the most suitable. It was followed by the quantitative analysis of oxazepam, during which calibration curve was obtained. The final part of this thesis was focused on validation of used method. It included precision, accuracy, linearity, selectivity, ruggedness, limit of detection and limit of quantitation.