

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

ANALYTICKÉ HODNOCENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK  
KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ V.

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2013

Martin Vladař

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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Děkuji doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi CSc. za cenné odborné rady a připomínky při vypracovávání této práce jak v laboratoři, tak při jejím sepisování.

## ABSTRAKT

# ANALYTICKÉ HODNOCENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ V.

Diplomová práce

Martin Vladař

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

Tato práce se zabývala stanovením ibuprofenu v plazmě použitím off-line spojení mikroextrakce tuhou fází (SPME) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pro mikroextrakci bylo využíváno vlákno potažené PDMS-DVB. Mobilní fáze i vzorky měly pH upraveno na 3. Mikroextrakce byla složena z 30 min sorpce a 20 min desorpce v 250  $\mu$ l methanolu. Mobilní fáze byla methanol:voda (75:25, v/v), kolona C18, průtoková rychlost byla 1,2 ml/min. Hodnocení probíhalo při 222 nm. Byl zkoumán vliv těchto podmínek mikroextrakce na výtěžnost: koncentrace ibuprofenu ve vzorku, vysolování, ředění vzorku a násobná mikroextrakce. Jako vnitřní standard byl vybrán naproxen, pomocí vnitřního standardu byla sestrojena kalibrační přímka a ta byla ověřena modelovými vzorky. Byly stanoveny detekční a kvantifikační limity pro ibuprofen i pro naproxen.

## ABSTRACT

# **ANALYTICAL DETERMINATION OF ACTIVE COMPOUNDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY V.**

Diploma Thesis

Martin Vladař

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

This paper focused on determining of ibuprofen in plasma using off-line coupling solid phase microextraction (SPME) and high performance liquid chromatography (HPLC). For microextraction was used fiber coated with PDMS-DVB. The pH of mobile phase and the samples were adjusted to 3. Microextraction was composed of 30 minutes sorption and 20 min desorption to 250 ml of methanol. The mobile phase was methanol:water (75:25, v/v), column C18, flow rate was 1.2 ml / min. Evaluation was carried out at 222 nm. The influence on microextraction yield was examined on these conditions: concentration of ibuprofen in sample, salting out, dilution of sample and multiple microextraction. Naproxen was chosen as internal standard. Using internal standard a calibration line was constructed and it was tested by model samples. Detection and quantification limits were determined for ibuprofen and naproxen.

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Teoretická část.....	10
2.1. Chromatografie.....	11
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	12
2.2.1. Teorie .....	12
2.2.2. Složení kapalinového chromatografu.....	14
2.3. Ultraúčinná kapalinová chromatografie .....	21
2.4. Úprava biologického materiálu .....	22
2.4.1. Deproteinace biologických vzorků.....	22
2.4.2. Extrakce organickými rozpouštědly .....	23
2.4.3. Extrakce na pevné fázi.....	24
2.4.4. Mikroextrakce tuhou fází .....	25
2.5. Nesteroidní antiflogistika .....	29
2.5.1. Ibuprofen.....	29
2.6. Rešerše.....	31
3. Cíl práce.....	35
4. Praktická část.....	37
4.1. Materiál a pomůcky.....	38
4.2. Příprava vzorků a standardů .....	39
4.3. Vlastní provedení extrakce.....	40
4.4. Chromatografické podmínky.....	41
5. Výsledky a diskuse .....	42
5.1. Výběr chromatografických podmínek .....	43
5.2. Výběr podmínek pro SPME .....	45

5.3. Vliv koncentrace ibuprofenu ve vzorku .....	47
5.4. Vliv ředění plazmy .....	48
5.5. Vliv vysolování .....	50
5.6. Vliv násobné extrakce .....	51
5.7. Výběr vnitřního standardu.....	54
5.8. Sestrojení kalibrační přímky .....	57
5.9. Ověření kalibrační přímky .....	61
5.10. Detekční a kvantifikační limit .....	62
6. Závěr .....	64
7. Seznam literatury .....	66

# 1.Úvod



Kapalinová chromatografie je moderní metodou, která v současné době zaujímá hlavní postavení v analytických metodách využívaných nejen ve farmacii. Díky její schopnosti rozdělit látky ve směsi a zároveň je identifikovat a stanovit jejich obsah se stala jednou z nejpoužívanějších metod v analytické chemii. Je to velmi citlivá metoda, a právě proto našla ve farmacii široké využití, protože léčiva se v analyzovaném materiálu vyskytují často ve velmi nízkých, a přesto významných koncentracích.

Metoda mikroextrakce na tuhé fázi je relativně mladou metodou extrakce látek ze vzorku, který nelze z jakéhokoli důvodu analyzovat přímo kapalinovou chromatografií. Je to metoda nenáročná na provedení a šetrná k životnímu prostředí, uplatnění nachází hlavně v ekologii a při monitorování lékových hladin v biologických materiálech. Monitorování lékových hladin je důležitá disciplína, která pomáhá zlepšit bezpečnost a efektivitu terapie. Velký význam má toto monitorování především u léčiv s nízkým terapeutickým indexem. Mimoto je tato metoda využitelná při farmakokinetických studiích, bez kterých se žádné léčivo dnes nemůže dostat do praxe. Proto je důležité obě tyto metody rozvíjet a aplikovat na široké množství látek.

## 2. Teoretická část

## 2.1. Chromatografie

Chromatografie je soubor metod využívajících k rozdělení látek jejich rozdílných fyzikálně chemických vlastností a jejich interakcí s dvěma fázemi, mobilní a stacionární. Stacionární fáze je uložena v koloně nebo na ploché vrstvě a je nepohyblivá. Mobilní fáze je pohyblivá a unáší separované látky ze stacionární fáze. Při styku stacionární a mobilní fáze se separovanými látkami dochází k interakcím těchto látek, které umožňují jejich rozdělení na základě rozdílné rychlosti pohybu v soustavě.<sup>[1]</sup>

### 2.1.1. Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody se dají rozdělit podle několika kritérií, jedním z nich je skupenství mobilní fáze. Kapalinová chromatografie využívá jako mobilní fázi kapalinu a v plynové chromatografii je mobilní fází plyn. Rozsáhlejší dělení umožňuje dělení podle separačního mechanismu. Tím může být:<sup>[1]</sup>

- 1) Adsorpce - stacionární fáze je tuhá a separované látky ulpívají na jejím povrchu, mobilní fáze může být kapalná i plynná.
- 2) Rozdělování - u tohoto mechanismu dochází k rozpouštění dělených látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fází je kapalina na povrchu inertního nosiče. Tento mechanismus může být využit jak v systému kapalina-kapalina, tak v systému kapalina-plyn.
- 3) Výměna iontů - na povrchu stacionární fáze dochází k výměně iontů.
- 4) Síťový efekt - látky se zde rozdělují podle velikosti svých molekul. V systému tuhá fáze - plyn se jedná o plynovou chromatografii na molekulových sítích, v soustavě tuhá látka – kapalina se jedná o gelovou chromatografii. V gelové chromatografii dochází k pronikání dělených látek do pórů gelu, kde látky s menšími molekulami pronikají hlouběji do gelu a jsou proto unášeny mobilní fází pomaleji.

Kapalinová chromatografie může být uspořádána v plošném uspořádání, kdy se jedná o papírovou nebo tenkovrstvou chromatografii nebo v kolonovém uspořádání.<sup>[1]</sup>

## 2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní analytickou metodou umožňující současně kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. Při nástřiku dvojice látek do chromatografické kolony dochází k vytvoření elučního pásu obsahujícího směs obou látek. Ty jsou poté unášeny mobilní fází a na náplni kolony dochází k jejich separaci. Po výstupu první látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu vytvořením eluční křivky (píku) na chromatogramu.<sup>[1]</sup>

### 2.2.1. Teorie

Charakteristickou veličinou pro každou hodnocenou látku je v daném chromatografickém systému retenční (eluční) čas  $t_R$  nebo eluční objem  $V_R$ . Eluční čas je doba od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a eluční objem je objem mobilní fáze za tuto dobu. Veličiny spolu souvisejí vztahem:<sup>[1]</sup>

$$V_R = t_R \times F_m$$

kde  $F_m$  je průtoková rychlost.

Eluční objem  $V_R$  je dán součtem  $V'_R + V_M$ , kde  $V'_R$  je redukovaný eluční objem a  $V_M$  je mrtvý objem, představující objem mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu a po detektor. Většinou je možné zanedbat mimokolonové příspěvky k mrtvému objemu, a tak je  $V_M$  nazýván někdy také mrtvý objem kolony. Mrtvý objem  $V_M$  se zjistí experimentálně nástřikem nesorbující se látky. K hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny pojmy počet teoretických pater  $n$  a výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ . Počet teoretických pater se zjistí dosazením experimentálně naměřených hodnot do vztahu:<sup>[1]</sup>

$$n = 16 \left( \frac{V_R}{Y_V} \right)^2$$

kde  $Y_V$  je šířka píku v základně vyjádřená v jednotkách objemu. Známe tedy  $n$  a celkovou délku kolony a můžeme vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra:<sup>[1]</sup>

$$H = \frac{L}{n}$$

Dalším pojmem je kapacitní poměr  $k$ , to je poměr celkového množství látky ve stacionární fázi k jejímu množství ve fázi mobilní:<sup>[1]</sup>

$$k = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

kde  $K_D$  je distribuční konstanta,  $V_S$  je objem stacionární fáze a  $V_M$  objem mobilní fáze v koloně, neboli mrtvý objem kolony.

K hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny další pojmy jako rozlišení, které udává rozdíl elučnicích objemů separovaných látek dělený průměrnou hodnotou šířky píků. Vypočítá se tedy podle vztahu: <sup>[1]</sup>

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

z tohoto vztahu však není patrné, které veličiny hodnotu  $R$  ovlivňují.

Rozlišení se dá také vyjádřit vztahem: <sup>[2]</sup>

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{K}{K + 1} \right)$$

kde člen před první závorkou představuje účinnost, v první závorce selektivitu a ve druhé kapacitu. Selektivitu je možné vyjádřit pomocí relativní retence: <sup>[2]</sup>

$$\alpha = \frac{t_{R1} - t_M}{t_{R2} - t_M} = \frac{K_1}{K_2}$$

kde  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  a  $t_M$  jsou retenční časy látek 1 a 2 a mobilní fáze,  $K_1$  a  $K_2$  jsou hodnoty kapacitních poměrů obou látek. Účinnost, selektivitu a kapacitu je možné ovlivňovat změnou složení mobilní fáze, změnou pH mobilní fáze, jinou náplní kolony a teplotou kolony. <sup>[2]</sup>

Další hodnotou, která vypovídá o přesnosti stanovení obsahu složek, je poměr signálu k šumu  $S/N$ , který se vypočítá dle vzorce: <sup>[3]</sup>

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

kde  $H$  je výška píku a  $h$  je rozpětí šumu v místě píku měřené na chromatogramu slepého vzorku. Dalším faktorem je faktor symetrie píku  $A_S$ :

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

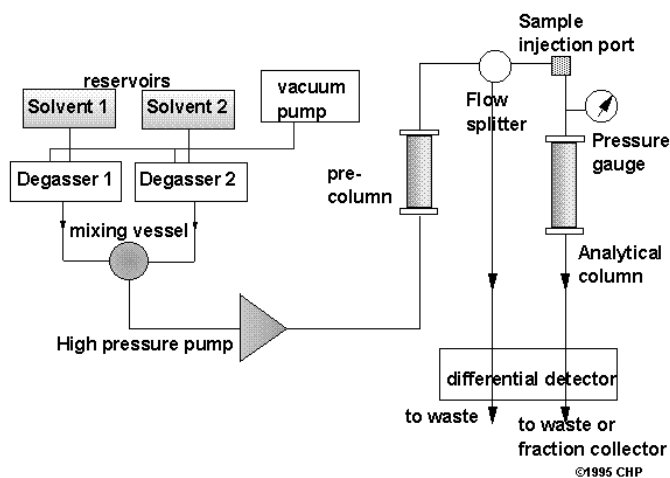
kde  $W_{0,05}$  je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Faktor symetrie píku 1 znamená ideální symetrii píku. <sup>[3]</sup>

Při kvalitativním hodnocení chromatogramu je identifikačním znakem elučnicí čas, jak bylo již popsáno na začátku kapitoly. Úkolem kvantitativního hodnocení je určit

z výšky nebo plochy píku koncentraci dané látky v nastříkovaném médiu. To je možné metodou vnějšího nebo vnitřního standardu při použití jednoho standardního vzorku nebo sestavením kalibrační křivky. Při metodě vnějšího standardu se koncentrace stanovované látky určí porovnáním plochy nebo výšky píku látky ve stanovovaném a porovnávacím roztoku. Při použití metody vnitřního standardu se ke zkoušenému i porovnávacímu roztoku látky přidá stejné množství látky (vnitřního standardu), která jde na chromatogramu od zkoušené látky rozlišit, má podobný retenční čas a nereaguje s ní. Koncentrace látky se stanoví porovnáním poměru ploch stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený a porovnávací roztok.<sup>[3]</sup>

## 2.2.2. Složení kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se většinou skládá ze zásobníků mobilních fází, degaséru, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího ventilu (resp. autosampleru), kolony, detektoru, integrátoru a zapisovače, přičemž funkci integrátoru a zapisovače dnes plní počítač.<sup>[1]</sup> Schéma zapojení je na obr. 1



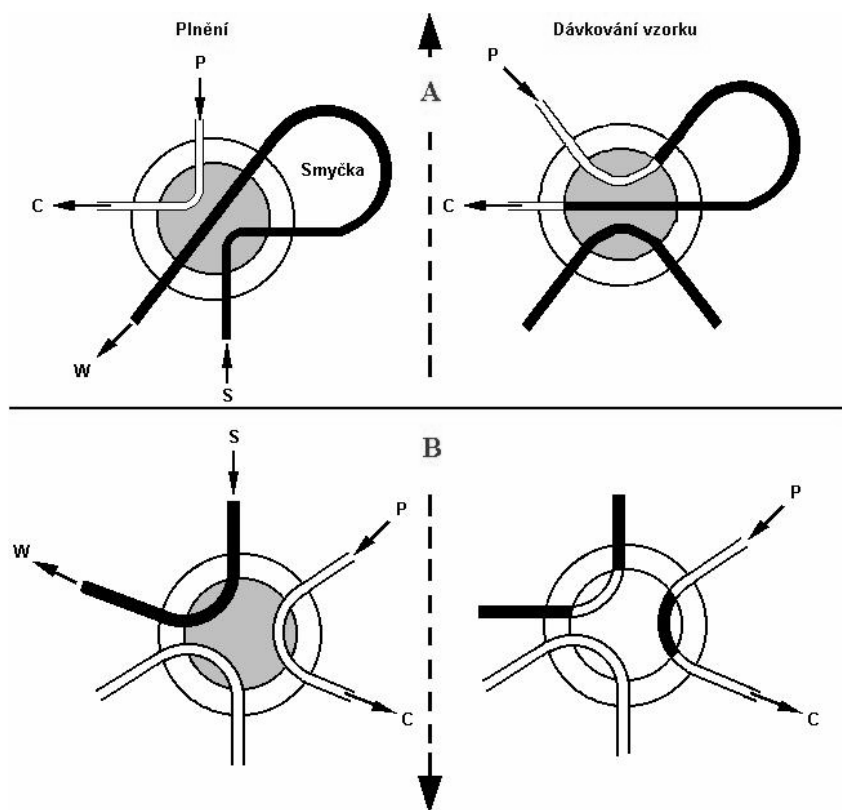
**Obrázek 1: Schematické zapojení HPLC<sup>[4]</sup>**

Zásobníky mobilních fází obsahují buď již hotovou mobilní fázi v případě, že se jedná o isokratickou eluci, při které se složení mobilní fáze během analýzy nemění, nebo jednotlivé složky mobilní fáze, které jsou následně smíchány v příslušném poměru. Toho se využívá hlavně při gradientové eluci, při které se mění složení mobilní fáze v čase podle potřeb analýzy.<sup>[1]</sup>

Degasér je zařízení odstraňující plyny rozpuštěné v mobilní fázi. Bublinky plynů v mobilní fázi mohou působit problémy, například ve vstřikovacím ventilu mohou způsobovat nekonzistentní průtok nebo v detektoru mohou vést k pulzování a nežádoucím signálům. Pokud není degasér součástí HPLC, odplynění se dosahuje vystavením mobilní fáze ultrazvuku, probubláváním He nebo Ar nebo použitím vakua. Nejefektivnější je použití ultrazvuku spolu s vakuem.<sup>[5]</sup>

Vysokotlaké čerpadlo je zařízení zajišťující tok mobilní fáze celým systémem. Dělí se na čerpadla pulsní a bezpulsní. Pulsní čerpadla dosahují požadovaného tlaku mobilní fáze mnohokrát opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory čerpadla a bývají zapojená spolu s tlumiči tlakových pulsů. Čerpadla bezpulsní pracují s velkým objemem pracovní komory a mají hladký tok mobilní fáze bez použití zařízení pro tlumení tlakových pulsů.<sup>[1]</sup>

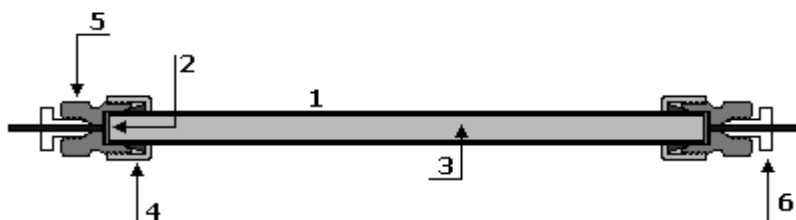
Další součástí kapalinového chronografu je dávkovací ventil. Ten umožňuje dávkování vzorku i při tlacích mobilní fáze 60 až 80 MPa. K dávkování je využito buď vnitřního objemu ventilu, nebo dávkovací smyčky o objemu 0,2 – 2000  $\mu\text{l}$ . oba typy ventilů jsou uvedeny na obr. 2.<sup>[6]</sup>



**Obrázek 2: Dávkovací ventily: A: s využitím smyčky, B: s využitím vnitřního objemu<sup>[6]</sup>**

Autosampler je zařízení pro automatické dávkování vzorků, které nastříkuje nastavený objem vzorku a umožňuje nastříkovat jeden vzorek nebo mnoho vzorků v sobě následující sekvenci. Některé autosamplery mohou vzorky ředit nebo mísit. [20] Díky tomu, že autosampler plní smyčku dávkovacího ventilu směrem od kolony, lze dávkovat libovolné objemy vzorků do velikosti smyčky. [1]

Další částí chromatografu je chromatografická kolona. To je v podstatě dutý válec rovnoměrně naplněný nebo pokrytý stacionární fází. Vnější plášť kolony drží stacionární fázi pohromadě a při tom musí odolávat vysokým tlakům, dále musí být chemicky inertní a musí mít dostatečně hladký vnitřní povrch. Nejpoužívanějším materiálem je nerezová ocel (typ 316), plasty (PEEK) a sklo. [6] Složení klasické HPLC kolony je na obr. 3.

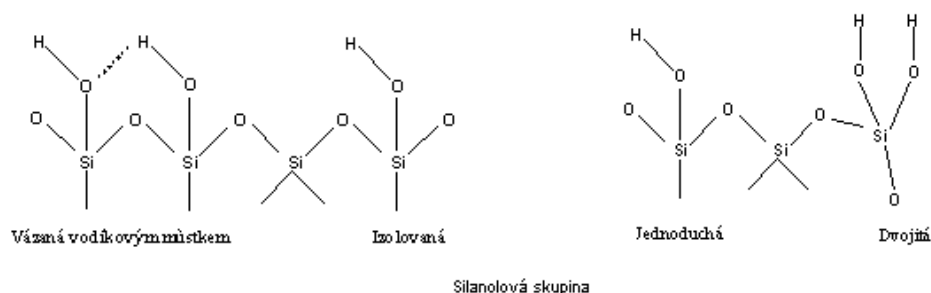


**Obrázek 3: HPLC kolona:** 1-vnější plášť kolony, 2-porézní kovová frit, 3-stacionární fáze, 4-převlečný ochranný kroužek, 5-koncová hlavice, 6-kapilára se šroubem<sup>[6]</sup>

Nejdůležitější součástí chromatografické kolony je její náplň stacionární fází. Podle vlastností stacionární fáze se jedná o normální fázi, kdy stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární, nebo o reverzní fázi, kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární.

Nejužívanější polární fází je silikagel, pro účely HPLC se připravuje silikagel s povrchem až 150 m<sup>2</sup>/g. Nejčastější velikost částic je 3,5 až 10 μm. Aktivními centry jsou silanolové skupiny na povrchu silikagelu. Hydroxylové skupiny silikagelu jsou buď jednoduché, nebo dvojité a mohou být izolované nebo vzájemně vázané vodíkovými můstky viz obr. 4. Rozmístění silanolových skupin závisí na zpracování. [6]





#### **Obrázek 4: Silanolové skupiny**

Dalším polárním sorbentem je oxid hlinitý, používá se v krystalické formě a pro HPLC se aktivuje při teplotě 500-800 °C. Vedle hydroxylových skupin jsou na povrchu oxidu hlinitého centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi, které mohou interagovat se skupinami bohatými na elektrony (Lewisovy báze). Primární použití oxidu hlinitého je v separaci nasycených a nenasyčených alifatických uhlovodíků a polyaromatických uhlovodíků.<sup>[6]</sup>

Jinou možností pro použití normální fáze jsou chemicky vázané polární fáze jako aminopropyl, kyanopropyl, diol a pentafluorfenylpropyl nebo nitrofenyl. Retence na aminopropylu je vyšší zejména pro látky kyselé povahy, nevýhodou je vysoká reaktivita.<sup>[6]</sup>

Sorbentem využitelným pro normální i reverzní mód je oxid zirkoničitý. Jako normální fáze se používá nemodifikovaný oxid zirkoničitý, upravený na monodisperzní porézní kulové částice, který je odolný v celém rozsahu pH a odolný vůči vysokým tlakům i teplotám. Jako reverzní fáze se povrch oxidu zirkoničitého potahuje vrstvou olybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku. Případně lze tyto povrchy modifikovat ligandem C18.<sup>[6]</sup>

V případě reverzní fáze se využívá chemicky vázaných nepolárních stacionárních fází. Ty mohou být vázány na silikagelový základ třemi typy vazeb. První je etherová vazba Si-O-C, ta je však nestabilní ve vodném prostředí a limituje tak použití kolon, další vazbou je vazba Si-N-C, která je vůči hydrolýze stabilnější a je použitelná v rozmezí pH 4-7,5. Nejstabilnější a nejužívanější je vazba Si-O-Si-C, ta je vůči hydrolýze odolná. Vazba probíhá reakcí s alkylchlorsilany a podle alkylu vázaného na silanu se rozlišují jednotlivé reverzní fáze lišící se svými vlastnostmi. Nejvíce se

používají fáze C8, C18, fenyl nebo alkylfenyl. Silikagel s volnými hydroxylovými skupinami obsahuje asi  $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ , ale ze sterických důvodů může zreagovat pouze asi polovina těchto volných silanolových skupin a chemicky lze tak vázat asi  $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  silanu na povrchu silikagelu. Silanizační činidlo je poměrně objemné a čím objemnější je molekula silanu a čím delší ligand obsahuje, tím se dosáhne nižšího pokrytí povrchu nosiče (silikagelu) chemicky vázanou fází. Nezreagované silanolové skupiny jsou tedy částečně stíněny sousedními ligandy nebo mohou být přístupné pro separované molekuly. Napolární fáze jsou zcela hydrofobní, jejich povrch se nesmáčí vodou a nesmí obsahovat žádné silanolové skupiny přístupné molekulám vzorku. Na náplních s nepolární fází musí být retenční objemy polárních látek prakticky rovné mrtvému objemu kolony. Retenční objemy nepolárních látek na nepolárních fázích rostou s rostoucí délkou ligandu (alkylového řetězce) a celkovým obsahem chemicky vázaného uhlíku (zvětšuje se objem stacionární fáze).<sup>[6]</sup>

Vedle klasických kolon, plněných jednotlivými částicemi sorbentu, existují i kolony monolitické, jejichž náplň tvoří jediný kus porézního materiálu. Tento sorbent obsahuje velké a středně velké póry, které umožňují provádět analýzy při vysokém průtoku mobilní fáze bez odpovídajícího zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti.<sup>[6]</sup>

Po průchodu kolonou je mobilní fáze přivedena do detektoru. V současné době je používáno několik typů detektorů, jako jsou např.: UV-VIS detektor, refraktometrický detektor, fluorescenční detektor, vodivostní detektor, elektrochemický detektor, chemiluminiscenční detektor nebo hmotnostní spektrometr.

Spektrofotometrické detektory (UV-VIS) jsou založeny na absorpci záření v oblasti vlnových délek mezi 190 a 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a vlastní velikostí absorpce vyjádřenou jako absorbance. Podle konstrukčního uspořádání je možné rozdělit spektrofotometrické detektory na 4 typy. Detektory s fixní vlnovou délkou, které využívají jako zdroj záření nízkotlakou rtuťovou výbojku. Detektory s nastavitelnou vlnovou délkou, které měří absorbanci při předem nastavené vlnové délce po celou dobu analýzy. Detektory s programovatelnou vlnovou délkou, které umožňují měnit vlnovou délku v průběhu analýzy a Detektory diodového pole (DAD). DAD detektory umožňují měřit absorbanci celého spektra

současně. Tyto detektory umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter a identifikovat tak analyzovanou látku.<sup>[6]</sup>

Refraktometrické detektory měří celkový index lomu, tedy index lomu mobilní fáze i analyzované látky. Citlivost detektoru se tedy zvyšuje s rozdílem indexu lomu látky a mobilní fáze. Z toho důvodu jej nelze používat při gradientové eluci. Nevýhodou je velká závislost indexu lomu na teplotě. Teplota měřící cely se musí udržovat stabilní v rozmezí 0,001 °C. Cely jsou proto umístěny v masivním bloku s vysokou tepelnou kapacitou, který je temperován termostatem.<sup>[1]</sup>

Fluorimetrické detektory využívají principu fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka vydává po absorpci primárního (excitačního) záření. Absorbováním energie přechází látka ze základního do excitovaného energetického stavu, ze kterého se tyto látky opět vrací do stavu základního za uvolnění energie, projevující se jako fluorescence. Čidlo detektoru zachycující emitované záření musí být chráněno před excitačním zářením, které by ovlivňovalo výsledky měření. Toho se docílí měřením emitovaného záření v kolmém směru k excitačnímu záření a odfiltrováním jeho rozptýlených zbytků.<sup>[6]</sup>

Vodivostní detektory měří elektrickou vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami v průtokové cele detektoru. Na elektrody je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci. Nároky jsou u vodivostního detektoru kladené na mobilní fázi. Ta by měla být nevodivá a měla by mít velkou permitivitu, zároveň ale musí dostatečně rozpouštět chromatografované látky. Tyto podmínky splňuje čištěná voda i s příměsí polárních organických rozpouštědel. Neumožňuje ale použití pufrů, protože mají vysokou vodivost a nepatrné zvýšení vodivosti v důsledku malého množství iontů ve vzorku nelze zaznamenat.<sup>[6]</sup>

Elektrochemické detektory se používají pro detekci látek, které jsou schopny elektrochemické reakce. Detektory měří elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud, kapacitu) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím. Elektrochemické detektory je možné rozdělit na amperometrické a coulometrické. Amperometrické měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou. Odezva amperometrických detektorů je závislá na průtokové rychlosti mobilní fáze. Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci celkového

množství látky při jejím průtoku celou. Tyto detektory nemají odezvu závislou na průtokové rychlosti mobilní fáze a dosahují vyšší účinnosti, stability (poměr signálu k šumu) a selektivity.<sup>[6]</sup>

Chemiluminiscenční detektory měří fluorescenční záření vyvolané chemickou reakcí. Univerzální chemiluminiscenční detektor využívá reakce analytu A s činidlem R za vzniku nestabilního produktu  $AR^*$ , který samovolně přechází na AR za uvolnění záření, které je následně detekováno. Tato reakce probíhá za chromatografickou kolonou podobně jako klasické derivatizační reakce.<sup>[6]</sup>

Hmotnostní spektrometrie v tandemu s kapalinovou chromatografií (LC-MS) umožňuje identifikovat látky rozdělené kapalinovou chromatografií na základě poměru hmotnosti a náboje jednotlivých fragmentů molekul. Protože jsou látky rozdělené pomocí HPLC často velmi polární nebo mají vysokou molekulovou hmotnost, musí se používat jiné techniky ionizace než v GC-MS. Nejběžnější je elektronová ionizace a chemická ionizace. Nejčastěji jsou používány hmotnostní spektrometry typu jednoduchý a trojitý kvadrupól a analyzátor doby letu (TOF).<sup>[7]</sup>

Vyhodnocení signálu detektorů provádí počítačová technika, která má funkci integrátoru a záznamového zařízení. Zároveň je pomocí počítače řízen celý systém HPLC chromatografu.

## 2.3. Ultraúčinná kapalinová chromatografie

Ultraúčinná kapalinová chromatografie je metoda analogická k HPLC. UPLC využívá sorbentů připravených technologií „bridged hybrid particle“, které mají větší mechanickou pevnost a vyšší účinnost. Proces separace probíhá za velmi vysokých tlaků okolo 100 MPa. Oproti HPLC dosahuje UPLC kratší doby analýzy, snížení spotřeby rozpouštědel a tím i nákladů, zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti.<sup>[6]</sup>

Sorbenty v UPLC kolonách jsou připravovány technologií „Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology“, která odstraňuje volné hydroxylové skupiny v silikagelu pomocí ethylenových můstků a tím zvyšuje jeho mechanickou odolnost. Velikost částic optimální pro UPLC je 1,7  $\mu\text{m}$ . Další snižování velikosti částic sorbentu již vede pouze ke zvyšování zpětného tlaku kolony a zvýšení separační účinnosti je již zanedbatelné.<sup>[6]</sup>

Kolony Pro UPLC jsou plněny za vysokého tlaku (20 000 psi, tj. asi 138 MPa), což zajišťuje optimální uchování částic v těle sorbentu a jejich stabilitu. Pro UPLC jsou v dostupné 4 druhy stacionárních fází. Jsou to C8, C18, Shield RP18 se zabudovanou karbamátovou skupinou a fenylová stacionární fáze.<sup>[6]</sup>

## 2.4. Úprava biologického materiálu

Biologický materiál obsahuje většinou léčiva nebo jiné analyzované látky v nízkých koncentracích a naopak mnoho endogenních látek, působících nežádoucí signály detektorů a znemožňujících použití některých analytických metod. Výběr metody úpravy vzorku záleží na vlastnostech analyzované látky a na druhu biologického materiálu. V ojedinělých případech se dá nastříknout na kolonu vzorek biologického materiálu bez předchozí úpravy. Tento způsob se využívá např. u léčiv vylučujících se ve vysokých koncentracích močí. Opakovaná aplikace biologických vzorků na chromatografickou kolonu však výrazně zkracuje její životnost neeluovatelnými komponentami vzorku. Tento jev lze zmírnit použitím předkolony, která ale potřebuje častou výměnu. Biologické vzorky se proto upravují deproteinací nebo extrakčními metodami.<sup>[2]</sup>

### 2.4.1. Deproteinace biologických vzorků

Deproteinace biologických vzorků zabraňuje vysrážení obsažených proteinů na chromatografické koloně při styku s mobilní fází. Deproteinace bývá prováděna většinou dvěma způsoby buď za použití deproteinačních činidel, nebo ultrafiltrací.<sup>[2]</sup>

Při použití deproteinačních činidel dojde k precipitaci denaturovaných proteinů a ty jsou poté odstraněny centrifugací. Po centrifugaci se odebere supernatant a ten je možné buď přímo nastříknout, nebo zkoncentrovat odpařením do sucha a rozpuštěním v malém objemu rozpouštědla. Jako deproteinační činidla se používají:<sup>[2]</sup>

- a) organická rozpouštědla mísitelná s vodou jako např. methanol, ethanol, acetonitril, aceton
- b) silné kyseliny trifluoroctová, trichloroctová, chloristá nebo mravenčí
- c) soli těžkých kovů:  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{OH})_2$

a jejich kombinace. Organická rozpouštědla jsou velmi často používaná k deproteinaci vzorků před analýzou HPLC nebo GC, nejpoužívanějším je pak acetonitril. Dále se využívá také aceton, ten ovšem může interferovat díky své vysoké absorpci v UV oblasti. Velmi dobrými deproteinačními činidly jsou také kys. trichloroctová a chloristá. Soli těžkých kovů se při chromatografických analýzách moc nepoužívá.<sup>[2]</sup>

Druhou možnou deproteinační technikou je ultrafiltrace. Při použití této metody jsou proteiny odděleny ze vzorku pomocí semipermeabilní membrány. Výhodou je, že nedochází k naředění vzorku deproteinačními činidly ani k jiným interakcím s nimi. Tuto metodu je výhodné používat pro analýzu léčiv, která nejsou vázána na proteiny, nebo k určení poměru volné a vázané frakce u léčiv s vazbou na plazmatické bílkoviny. Nevýhodou deproteinačních technik je vysoký obsah endogenních látek ve vzorku.<sup>[2]</sup>

## 2.4.2. Extrakce organickými rozpouštědly

Metoda extrakce látky z biologického vzorku kapalnými rozpouštědly (LLE-liquid-liquid extraction) spočívá v jejím přechodu mezi vodnou a organickou fází, které jsou vzájemně nemísitelné. Ustanoví se rovnovážný stav v rozdělovacím poměru  $K$  podle Nernstova zákona:

$$K = \frac{\text{celková koncentrace v organické fázi (mg/ml)}}{\text{celková koncentrace ve vodné fázi (mg/ml)}}$$

Pokud  $K$  je vyšší než 1, přechází látka spontánně z roztoku do rozpouštědla, pokud je  $K$  nižší než 1, je třeba provést vícečetnou extrakci.<sup>[2]</sup>

Extrakční proces závisí na více faktorech, jsou to:<sup>[8]</sup>

- a) fyzikálně chemické vlastnosti rozpouštědla
- b) pH vodné fáze
- c) vzájemný poměr fází
- d) způsob a doba trvání extrakce
- e) způsob předchozího zpracování vzorku

Důležitou vlastností rozpouštědla je jeho dielektrická konstanta. Je-li dielektrická konstanta nízká, rozpouštědlo je nepolární a budou se do něj snadno extrahovat hydrofobní látky. Je-li vysoká, je rozpouštědlo polární a budou se do něj extrahovat především hydrofilní látky. Důležitá je také nemísitelnost obou fází. Rozpouštědlo zároveň nesmí reagovat ani s vodnou fází, ani s extrahovanou látkou. V případě spektrofotometrického stanovení je třeba brát v úvahu i absorpci rozpouštědla. Další vlastností je těkavost rozpouštědla, která je nutná pro zkoncentrování extraktu odpařením do sucha a rozpouštěním v přesném objemu mobilní fáze nebo jiného rozpouštědla.<sup>[8]</sup>

Hodnota pH má vliv na poměr disociované a nedisociované formy léčiva, které chceme ze vzorku extrahovat. Aby léčivo přecházelo do organického rozpouštědla, musí být v nedisociované formě, toho se u kyselých látek docílí snížením pH vodné fáze a u bazických zvýšením pH vodné fáze. [8]

Vhodně zvolený poměr vodné a organické fáze může zvýšit extrahovatelnost látky a zpracovatelnost extrakční směsi. Vyšší podíl organického rozpouštědla znamená vyšší výtěžnost a nižší možnost tvorby emulzí. Na druhou stranu je ve větším objemu nižší koncentrace léčiva a to může prodloužit dobu odpařování. Vhodný je poměr vodné:organické fázi 1:5-10. [8]

Způsob, intenzita a doba třepání jsou velmi důležitými faktory pro reprodukovatelnost metody. Intenzita a doba třepání musí být dostatečné k co nejúplnějšímu přechodu extrahované látky, ale nesmí být příliš dlouhá jak z praktického hlediska, tak aby se zabránilo vzniku těžko dělitelných emulzí. [8]

Předchozí zpracování vzorku může ovlivnit extrakci příznivě i nepříznivě. Deproteinace silnými kyselinami má za následek snížení pH vzorku a tedy snížení extrakce bazických látek nebo se extrahovaná látka může adsorbovat na precipitované proteiny. Naopak vhodně zvolená deproteinační technika může zvýšit výtěžnost extrakce léčiv s vysokou vazbou na bílkoviny. [8]

### 2.4.3. Extrakce na pevné fázi

Metoda extrakce na pevné fázi (SPE- solid phase extraction) využívá mechanismu sorpce a zpětného vymývání extrahovaných látek z tuhých sorbentů, podobně jako kapalínová chromatografie. Vzorek biologického materiálu se po naředění vodou nechá projít extrakční kolonkou, analyzovaná látka se nasorbuje na sorbent uvnitř kolonky, ta se pak promyje od zbytků biologického materiálu a nakonec se analyzovaná látka vymyje z kolonky vhodným rozpouštědlem. Získaný extrakt se odpaří do sucha a rozpustí se v přesném množství mob. fáze nebo požadovaného rozpouštědla. Tyto sorbenty musí být nerozpustné v používaných elučních systémech, nesmí s nimi reagovat, nesmí reagovat s analyzovanými látkami a musí mít velkou adsorpční kapacitu při zachování reverzibility adsorpce. Sorbenty se dělí na polární a nepolární. Používají se sorbenty podobné těm chromatografickým, jako oxid hlinitý, hořečnatý, silikagel a chemicky vázané fáze a to normální i reverzní fáze C8, C18 atd.



Metoda extrakce na pevné fázi je jednoduchá, rychlá a vykazuje dobrou výtěžnost i reprodukovatelnost. Proti LLE se při SPE snižuje spotřeba organických rozpouštědel a přináší možnost automatizace.<sup>[2]</sup>

#### 2.4.4. Mikroextrakce tuhou fází

Metodu mikroextrakce tuhou fází, neboli solid phase micro-extraction (SPME), vyvinul Janusz Pawliszin na Univerzity of Waterloo Ontario v Kanadě. SPME je možné používat u vzorků hodnocených jak GC, tak HPLC.<sup>[9]</sup>

Principem této metody je sorpce analytu na 1 nebo 2 cm dlouhé křemenné vlákno pokryté polymerem. Toto vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté jehle, která chrání vlákno před mechanickým poškozením. Po propíchnutí septa vialky jehlou se vlákno vysune do vzorku, případně do prostoru nad hladinou v případě head-space SPME. Analyt se sorbuje do vrstvy polymeru. Poté je vlákno zataženo do jehly a vytaženo z vialky se vzorkem. Následně je analyt z vlákna desorbován do rozpouštědla a nastříknut na HPLC.<sup>[9]</sup>

SPME je metodou rovnovážnou, to znamená, že ze vzorku je extrahováno pouze malé množství látky vzhledem k jejímu celkovému obsahu. Rovnovážný stav SPME je závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a tloušťce polymeru pokrývajícího SPME vlákno. Množství sorbovaného analytu závisí na distribuční konstantě a tloušťce vrstvy polymeru. Doba extrakce je dána časem potřebným k ustálení rovnováhy ( $t_e$ ), nebo časem potřebným k extrakci dostatečného množství analytu. Extrakční proces je selektivní a je potřeba zvolit vhodný polymer pokrývající vlákno a sílu jeho vrstvy. Množství analytu na vláknech je při dosažení rovnováhy přímo úměrné množství analytu ve vzorku:<sup>[9]</sup>

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

kde  $n$  je množství analytu sorbovaného na vláknu,  $C_0$  je počáteční koncentrace analytu ve vzorku,  $K_{fs}$  je rozdělovací koeficient polymer-vzorek,  $V_f$  je objem polymeru,  $V_s$  je objem vzorku. Polymery použité k extrakci se vybírají s ohledem na co nejvyšší konstantu  $K_{fs}$ , což způsobuje vysokou sorpční schopnost vlákna se selektivním efektem. Hodnota  $K_{fs}$  není dostatečně vysoká, aby se sorbent extrahoval v úplné míře, to neumožňuje ani kapacita vlákna. V případě dostatečně velkého objemu vzorku nezávisí

množství navázané látky na objemu vzorku, což umožňuje odebrání vzorků životního prostředí metodou SPME například ponořením přímo do řeky.<sup>[9]</sup>

V praxi se dá použít několik možných variant uspořádání SPME. Sorbent je na povrchu vlákna, na vnitřní stěně duté jehly, nebo na vnitřní stěně kapiláry.<sup>[10]</sup>

Klasické uspořádání SPME vlákna bylo popsáno na začátku této kapitoly.

V případě polymerem pokryté jehly se jedná o tzv. solid phase dynamic extraction (SPDE), která je využívána hlavně při head-space vzorkování v plynové chromatografii. To se provádí opětovným nasáváním a vytlačováním vzorku z head-space prostoru pomocí plynotěsné stříkačky.<sup>[10]</sup>

In-tube SPME, kdy je sorbent navázaný na vnitřní stěnu kapiláry, se používá k analýze pouze kapalných vzorků. Pro tuto metodu se nevyrábí hromadně žádné kapiláry, používají se proto segmenty kapilár pro plynovou chromatografii s originální náplní nebo se povrch kapiláry připravuje individuálně. V zájmu zvýšení extrakční účinnosti snížením objemu kapiláry může být do kapiláry vložen ocelový drátek (wire-in-tube uspořádání). In-tube SPME může být kompletně automatizována zapojením kapiláry s autosamplerm. Kapiláru lze umístit mezi jehlu autosampleru a vstřikovací ventil nebo místo dávkovací smyčky ventilu. Vzorek je opakovaně nasáván a vytlačován z kapiláry, dokud se neustálí rovnováha nebo se neextrahuje dostatečné množství analytu. Desorpce může být statická, kdy se do kapiláry nasaje rozpouštědlo a poté je s rozpuštěnou látkou nastříknuto na kolonu nebo při dynamické desorpci je kapilára promývána mobilní fází, která pokračuje přímo na kolonu. Metoda je limitována čistotou a homogenitou vzorků, vzhledem k možné kontaminaci HPLC systému nečistotami.<sup>[10]</sup>

Faktorů, které ovlivňují extrakční účinnost SPME, je mnoho. Velký význam má beze sporu složení sorbentu, kterým je vlákno pokryto. Sorbent se může skládat z jednoho, popř. více polymerů. Běžně se používají vlákna pokrytá vrstvou polydimethylsiloxanu (PDMS), polyakrylátu (PA), Carboxen-PDMS, PDMS-polydivinylbenzen (PDMS-DVB) a Carbowax-DVB). Sorbenty obsahující DVB se skládají z porézních částic DVB, které jsou drženy pohromadě pojídlem PDMS, nebo Carbowaxem. Byl připraven i povlak DVB-Carboxen-PDMS. Síla vrstev je různá pro jednotlivé sorbenty. PDMS povlak bývá o síle 7, 30 a 100  $\mu\text{m}$ , PA 85  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  pro

Carboxen-PDMS a 65  $\mu\text{m}$  pro PDMS-DVB a Carbowax-DVB. Důležitou vlastností při výběru sorbentu je jeho polarita, ta by se měla shodovat s polaritou látky, kterou chceme extrahovat. Nepochárné látky se dobře vážou na nepolární PDMS vlákna. PDMS je zároveň nejodolnější krytí vláken pro mikroextrakci a má dobrou účinnost i po mnoha opakovaných sorpcích a desorpcích. Vlákna pokrytá PA jsou vhodná pro mírně polárnější látky, jako jsou chlorfenoly nebo benzodiazepiny. PA vrstva také extrahuje balastní látky, což nepříznivě ovlivňuje analýzy biologických vzorků. Výběr z dalších typů vláken více záleží na zkušenostech, PDMS-DVB a Carbowax-DVB jsou vhodná pro těkavější analyty, díky jejich sorpci na porézní částice. Také rozsah linearit je menší pro vlákna krytá PDMS-DVB a Carbowax-DVB.<sup>[11]</sup>

Dalšími faktory, které mají vliv na účinnost extrakce, jsou míchání vzorku, teplota, pH nebo přídavek soli. Míchání vzorku snižuje čas potřebný k dosažení rovnováhy. Při analýze biologických vzorků je nejčastěji používáno míchání magnetickou míchačkou, jeho nevýhodou je však obtížná automatizace. Při HS-SPME je výhodné použít k míchání ultrazvuk, který zlepšuje extrakci těkavých látek.<sup>[11]</sup>

Zvyšující se teplota má nepříznivý vliv na  $K_{fs}$ , to při dosažení rovnováhy snižuje citlivost metody. Na druhou stranu zvýšení teploty urychluje extrakci. Toho může být využito při extrakcích s dobou sorpce kratší, než je doba potřebná k dosažení rovnováhy. Pozitivní vliv může mít zvýšení teploty vzorku pro vzorky s vyšší viskozitou, jako jsou například vzorky plazmy. Zvýšení teploty má pozitivní vliv na extrakci látek z HS prostoru.<sup>[11]</sup>

Hodnota pH je zásadní při SPME kyselin nebo bází, podobně jako při LLE. Kyseliny se lépe extrahují ze vzorků s nízkou hodnotou pH a baze ze vzorků s vysokou hodnotou pH.<sup>[11]</sup>

V případě přídavku soli ke vzorku se literatura neshoduje. Např. Ulrich<sup>[11]</sup> ve své práci uvádí, že přídavek soli nemá žádný pozitivní vliv na množství extrahované látky a zároveň nedoporučuje překračovat 10% obsah soli ve vzorku. Jiní autoři, například Padron<sup>[12]</sup>, Moeder<sup>[13]</sup> však ve svých pracích přidávají 20-30% NaCl do vzorku.

Výhody v použití metody SPME jsou možnost používání bez organických rozpouštědel, jednoduché provedení, malá náročnost na vybavení, snadná automatizace,

vysoká citlivost a také dobrá linearita. Na druhou stranu u některých látek je čas dosažení rovnováhy delší než u LLE nebo SPE, musí se proto provádět při extrakčních časech nižších než  $t_e$ . Dále je po každé mikroextrakci nutné vlákno čistit, což také prodlužuje čas analýzy. Také recovery není příliš vysoká a může se měnit v důsledku opakovaného používání SPME vlákna. Kvantifikace je náchylná k chybám v důsledku změn v matrix vzorku, a to i při použití vnitřního standardu.<sup>[11]</sup>

## 2.5. Nesteroidní antiflogistika

Jako nesteroidní antiflogistika se označují látky, které mají protizánětlivý, analgetický a antipyretický účinek a nemají steroidní strukturu. Mechanismem účinku těchto látek je inhibice syntézy prostaglandinů, které jsou mediátory zánětu a bolesti, prostřednictvím inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX). Cyklooxygenáza katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na cyklický endoperoxid a vyskytuje se v několika izofotech. Nesteroidní antiflogistika inhibují COX I a COX II. Inhibice COX II je zodpovědná za antiflogistický, antipyretický i analgetický účinek. Inhibice COX I je zodpovědná za nežádoucí účinky těchto léčiv, mezi které patří např. poškození žaludeční a střevní sliznice, nebo poruchy prokrvení ledvin. Z hlediska selektivity se dají inhibitory cyklooxygenázy rozdělit na COX neselektivní, COX II preferenční a COX II selektivní. Z hlediska chemické struktury se tato skupina dělí na butylpyrazolidiny, deriváty kyseliny octové, oxikamy, deriváty kyseliny propionové, fenamáty, koxiby a ostatní.<sup>[14]</sup>

### 2.5.1. Ibuprofen

Ibuprofen, chemicky 2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina, je bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, acetonu, etheru a dichlormethanu.<sup>[3]</sup> Uhlík v poloze 2 je chirální, z čehož vyplývá existence dvou enantiomerů. Antiflogistický účinek je vázán na S-formu, v praxi se však používá racemická směs, protože po podání ibuprofenu je vlivem isomeráz neaktivní R-forma přeměněna na aktivní S-formu.<sup>[15]</sup>

Momentálně je ibuprofen v ČR registrován v několika lékových formách, a to v potažených tabletách, obsahujících 200, 400, 600 a 800 mg, v orodisperzních tabletách s obsahem 100 mg, v effervescentních tabletách obsahujících 400 mg, v effervescentním prášku se 600 mg v jednom sáčku, dále jako měkké tobolky s obsahem 200 a 400mg, perorální suspenze obsahující 20 nebo 40 mg/ml, čípky s obsahem 60 nebo 125 mg a pro lokální aplikaci jako 5% gel nebo krém. Dále je registrován injekční roztok v koncentraci 5 mg/ml pro léčbu hemodynamicky významného otevřeného ductus arteriosus u předčasně narozených dětí. Jako ibuprofen-lysinát jsou registrovány obalené tablety se 683,246 mg ibuprofen-lysinátu, což odpovídá 400 mg ibuprofenu a prášek pro přípravu perorálního roztoku o stejném

obsahu. V kombinaci je ibuprofen registrován v tabletách s pseudoefedrinem o obsahu 200 mg ibuprofenu a 30 mg pseudoefedrinu ve formě hydrochloridu, které jsou určeny pro symptomatickou léčbu akutních infekčních onemocnění horních cest dýchacích. V kombinaci s heparinem k lokální aplikaci jako gel obsahující 5% ibuprofenu a 0,2% heparinu (100 m.j./mg) určený pro terapii poúrazových stavů, zánětů šlach a svalů, tromboflebitidy a jiných lokálních projevů akutních a chronických forem revmatických onemocnění.<sup>[16]</sup>

## 2.6. Rešerše

### **Validace a použití in vivo SPME pro detekci vznikajících kontaminantů v rybách<sup>[17]</sup>**

Studie se zabývala in vivo stanovením hladin karbamazepinu, diklofenaku, ibuprofenu, naproxenu, fluoxetinu a bisfenolu A v rybách pomocí LLE a in vivo SPME a ve vodě pomocí SPME a SPE. Koncentrace ibuprofenu ve vodě zjištěné metodou SPME byly vyšší než koncentrace zjištěné metodou SPE a ve vzorcích rybího svalu se koncentrace zjištěné metodou SPME a LLE téměř nelišily. Hodnocení probíhalo pomocí LC-MS.

Chromatografické podmínky: mob. fáze A: octan amonný, mob. fáze B: methanol. Kolona C18.

Podmínky SPME: PDMS vlákno bylo 20 min ponecháno v rybím svalu a poté desorbováno ve 100 ml methanolu po dobu 1 h.

### **Nová in-tube SPME pro velmi nízké koncentrace hydrofobních látek<sup>[18]</sup>**

Studie zkoumala spojení in-tube SPME s kapilární elektroforézou a využití této metody pro velmi nízké koncentrace hydrofobních látek. Metoda byla validována na ibuprofenu, indometacinu, loratadinu a doxazosinu. Byla vyvinuta metoda pro stanovení loratadinu v králičí krvi.

Vodný roztok analyzovaných látek byl pumpován průtokovou rychlostí 2 ml/min přes kapiláru pokrytou (35%-phenyl)-methylpolysiloxanu o tloušťce vrstvy 0,25  $\mu\text{m}$  po dobu 30 min, poté byla voda vytlačena vzduchem a kapilára byla naplněna prostředím pro elektroforézu. Bylo provedeno rozdělení elektroforézou a detekce UV-VIS detektorem.

### **Stanovení vazby léčiv na plazmatické bílkoviny pomocí SPME<sup>[19]</sup>**

Studie se zabývala stanovením volné a vázané frakce léčiv v plazmě a to u ibuprofenu, verapamilu, warfarinu, propranololu a kofeinu. Zjišťovala vliv ředění plazmy fosfátovým stabilizačním roztokem a vliv inkubace s 10%  $\text{CO}_2$  na rovnováhu mezi vázanou a nevázanou frakcí. Pro extrakce byla využívána vlákna pokrytá vrstvou

polydimethylsiloxanu (PDMS) a polypyrolu (PPY). Rovnovážného stavu sorpce dosahovaly látky u PPY již do 10 min, u PDMS vlákna za 3 h. Desorpční médium byla směs acetonitril:voda(50:49) s přidavkem jednoho dílu kys. octové nebo amoniaku podle acidobazické povahy analyzovaného léčiva. Analýza vzorků probíhala za použití LC-MS.

Chromatografické podmínky: kolona RP18, mob. fáze A: acetonitril/voda (10:90) s 0.1% kys. octovou, mob. fáze B: acetonitril/voda (90:10) ) s 0.1% kys. octovou.

### **Optimalizace SPME pro in-vivo stanovení vybraných léčiv v rybím svalu pomocí LC-MS<sup>[20]</sup>**

Studie se zabývala srovnáním klasické SPME a nové thin film microextraction (TFME) pro stanovení karbamazepinu, fluoxetinu, diazepamu, venlafaxinu, ibuprofenu a gemfibrozilu v rybím svalu. Ibuprofen byl stanoven pouze v odpadní vodě, v rybím svalu nebyl detekován pro velmi rychlou exkreci a nízkou biokoncentraci. Pro mikroextrakci byl použit sorbent C 18 o síle vrstvy 45 µm a délce 1,5 cm, a to na kulatém vlákně o průměru 200 µm a délce 40 mm nebo na tyčince o rozměrech 40×2,1×0,07 mm. Sorbenty byly vkládány do ryb na dobu 30 min, poté následovala 90 min desorpce ve směsi methanol:voda (60:40). Výsledky ukázaly až desetinásobně větší extrahované množství léčiv při použití metody TFME.

Chromatografické podmínky: kolona C 18, mob. fáze - gradient voda:methanol, detekce MS

### **SPME a chirální HPLC analýza ibuprofenu v moči<sup>[21]</sup>**

Práce se zabývala analýzou enantiomerů ibuprofenu v lidské moči. SPME vlákno bylo pokryto vrstvou PDMS-DVB a extrakční schéma bylo 30 min sorpce a 5 min desorpce ve 200 µl mobilní fáze, nastříkováno bylo 50 µl vzorku. Bylo dosaženo výtěžností kolem 19,8% pro R-ibuprofen a 19,1% pro S-ibuprofen. Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací 0,25-25 µg/ml. Metoda testovala vzorky čisté moči s přidavkem ibuprofenu a vzorky moči dobrovolníka po podání 200 mg racemického ibuprofenu.

Chromatografické podmínky: chirální kolona, mobilní fáze - methanol:kys. fosforečná o pH 3(75:25), průtoková rychlost 0,45 ml/min, detekce 230 nm



## **Spojení SPME a micelární desorpce s HPLC pro analýzu farmaceutických zbytků v kapalných vzorcích životního prostředí<sup>[12]</sup>**

V této práci byla vyvinuta metoda pro analýzu ibuprofenu, ketoprofenu, naproxenu, fenazonu, betafibrátu a karbamazepinu ve vodných vzorcích pomocí SPME a micelární desorpce. Pro SPME bylo využíváno vlákno pokryté 65 µm vrstvou PDMS-DVB. Doba sorpce byla 60 min, micelární desorpce probíhala po dobu 10 min v kónickém 100 µl insertu obsahujícím 60 µl desorpčního média, který obsahoval jako surfaktant 5 % (v/v) polyoxyethylene 10 lauryl ether. Vzorky byly nasyceny NaCl (30% w/v) a pH bylo upraveno na 2,5 amonno-formiátovým pufrém. Pro ibuprofen bylo dosaženo výtěžností 96±2 % ve vzorcích odpadní vody 104±10 % ve vzorcích mořské vody a 107±7 % ve vzorcích povrchové vody. Kvantifikace byla provedena v rozsahu 0,25-2 µg/ml pro zkoušené látky.

Chromatografické podmínky: kolona C18, mob fáze- methanol:voda gradient, pH 3 upravené kys. octovou, průt. rychlost 1ml/min

## **Optimalizace derivatizační reakce a SPME podmínek při stanovení NSAIDs v hovězím mléku pomocí GC-MS<sup>[22]</sup>**

Tato práce se soustředila na optimalizaci derivatizační reakce ibuprofenu, naproxenu, ketoprofenu, flufenamové kyseliny, diklofenaku, tolfenamové kys. a meklofenamové kys. Tyto látky byly převáděny na jejich ethyl estery. Dále byly optimalizovány podmínky mikroextrakce tuhou fází. Byla zkoušena vlákna pokrytá PDMS, PDMS-DVB a PA. Jako nejlepší bylo zvoleno PDMS vlákno pro nejkratší rovnovážný stav extrakce a nejspolehlivější výsledky. Doba sorpce byla zvolena 30 min. SPME byla prováděna pomocí autosampleru s SPME modulem, jako nosný plyn bylo použito helium.

## **Kombinace statistických a analytických vyhodnocovacích metod jako nová optimalizační strategie pro kvantifikaci farmaceutických zbytků ve splaškových odpadních vodách<sup>[23]</sup>**

V této studii byla zkoušena metoda současné extrakce léčiv s kyselou a bazickou povahou (ibuprofen, fenoprofen, diklofenak, diazepam a loratadin). Při tomto postupu byla zahájena extrakce ve vzorku s pH 2,5 po dobu 35 min, poté bylo pH zvýšeno na 7 přidáním 0,4 M hydrogenfosforečnanu disodného bez přerušování extrakce a bylo pokračováno dalších 20 min, desorpce probíhala během 5 min při 270 °C. Bylo provedeno srovnání s postupem odděleným pro každou skupinu látek zvlášť. Bylo zkoušeno 5 různých vláken: PDMS-DVB-CAR, PDMS, CAR-PDMS, CW-DVB, PA. U ibuprofenu bylo dosaženo výtěžnosti přes 70%. Metoda změny pH se ukázala jako vhodná pro současnou extrakci kyselých a bazických látek. Hodnocení probíhalo pomocí GC s FID detekcí.

## **SPME-GC-MS analýza biologicky aktivních látek ve vodných vzorcích<sup>[13]</sup>**

V této práci byla vyvinuta metoda SPME pro analýzu stopových množství biologicky aktivních látek ve vodě a byla porovnána s metodou SPE následovanou derivatizací a hodnocením pomocí GC-MS. SPME byla zkoušena s ohledem na současné stanovení ibuprofenu, paracetamolu, fenazonu, karbamazepinu a nonylfenolu. Zkoumaná vlákna byla pokryta PA o síle 85 μm, PDMS-DVB 65 μm a CW-DVB 65 μm. Jako nejvhodnější bylo vyhodnoceno vlákno pokryté CW-DVB. Jako optimální doba sorpce byla zvolena doba 30 min, vlákna byla desorbována po dobu 2 min při 280 °C. Ke všem vzorkům o objemu 4 ml byl přidán 1 g NaCl a pH bylo upraveno na 2 30% kys. sírovou. Jedním z významných kontaminantů v povrchové a říční vodě byl ibuprofen s koncentrací v řádu ng/l.

### 3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vypracovat metodu mikroextrakce na tuhé fázi pro hodnocení ibuprofenu v plazmě. Při optimalizaci zhodnotit vliv jednotlivých podmínek mikroextrakce. Z podmínek byl sledován vliv ředění vzorku před mikroextrakcí, vliv vysolování a vhodnost násobné mikroextrakce oproti mikroextrakci jednoduché. Dalším úkolem bylo stanovit ibuprofen v plazmě metodou vnitřního standardu, použít tuto metodu pro sestavení kalibrační přímky, ověřit ji na modelových vzorcích a stanovit detekční a kvantitativní limit.

## 4. Experimentální část

## 4.1. Materiál a pomůcky

### Chemikálie a biol. materiál:

Ibuprofen, Sigma, St. Louis, USA

Naproxen, Sigma, St. Louis, USA

kyselina chloristá, Merck, Darmstadt, NSR

methanol, Merck, Darmstadt, NSR

králíčí plazma, Eldoret s.r.o., Praha, ČR

### Pomůcky:

držák pro SPME vlákna - Supelco, Bellefonte, USA

SPME vlákno PDMS-DVB 60  $\mu\text{m}$  - Supelco, Bellefonte, USA

mikropipeta - Eppendorf Research, Německo

analytická kolona Separon SGX C 18, 7  $\mu\text{m}$ , 150x4 mm I.D., Tessek Ltd., Praha, ČR

### Přístroje:

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

počítačový program ChromQuest 4.2.34 – Thermo Electron 2003, USA

analytické váhy HR-120-A&D Company ltd. Japonsko

pH metr Acidimetr 333 - Druopta Praha, Česká republika

ultrazvuková lázeň K 10 – Krainek s.r.o., Nové Zámky, Slovensko

magnetická míchačka MM2A – Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

## 4.2. Příprava vzorků a standardů

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0100 g ibuprofenu do odměrné baňky o objemu 10 ml. Ibuprofen byl rozpuštěn v methanolu a po rozpuštění byla baňka doplněna methanolem po rysku. Tím vznikl základní roztok o koncentraci 1 mg/ml. Tento roztok byl použit pro přípravu standardů. Postupně byl tento roztok zředěn 100x, 1000x a 10 000x a byly získány roztoky standardů o obsahu 0,01mg/ml, 0,001mg/ml a 0,0001mg/ml.

Při přípravě vzorků plazmy bylo přidáváno mikropipetou požadované množství methanolickeho roztoku o koncentraci ibuprofenu 1 mg/ml k plazmě, která byla následně ředěna vodou. U takto naředěné plazmy byla ještě upravena hodnota pH na 3 kyselinou chloristou o koncentraci 5%.

Pro úpravu mobilní fáze byla připravena 20% kys. chloristá přidáním 8 ml 70% kys. chloristé do 20 ml vody. Pro úpravu vzorků byla kys. chloristá naředěna na 5% přidáním 5 ml 20% kys. chloristé k 15 ml vody.

### 4.3. Vlastní provedení extrakce

PDMS-DVB vlákno bylo 30 min aktivováno ponořením do methanolu za stálého míchání. Vzorek po úpravě pH byl přelit do 7 ml vialky, která umožňovala použití míchadla a umístěn na magnetickou míchačku. Magnetická míchačka stála na laboratorním stojanu, na kterém byl uchycen i držák SPME vlákna. Vlákno bylo ponořeno do vzorku a necháno za stálého míchání ibuprofen sorbovat na křemenné vlákno po dobu 30 min. v případě jednoduché extrakce, a nebo 3x10 min, nebo 2x15 min. v případě násobné extrakce. Po ukončení sorpce následovala vždy desorpce do insertu obsahujícího 250  $\mu$ l methanolu, která trvala 20 min, případně 3x7 min nebo 2x10min. Insert ve vialce byl uzavřen septem a po promíchání bylo desorpční médium hodnoceno HPLC. Vlákno po desorpci bylo vymýváno v methanolu za stálého míchání po dobu 30 min a bylo tak připraveno pro další mikroextrakci.



## 4.4. Chromatografické podmínky

Vzorky byly hodnoceny na koloně Separon C18 o průměru zrn  $7\mu\text{m}$ . Dávkování vzorku zajišťoval autosampler, který nastříkoval objem  $20\mu\text{l}$  vzorku.

Analýza byla prováděna detektorem při vlnové délce  $222\text{ nm}$ .

Mobilní fáze byla směs methanolu a vody v poměru 75:25 s upravenou hodnotou pH na 3 pomocí 20% kyseliny chloristé. Průtok mobilní fáze byl  $1,2\text{ ml/min}$ . Odplynění mobilní fáze probíhalo 10 min v ultrazvukové lázni.

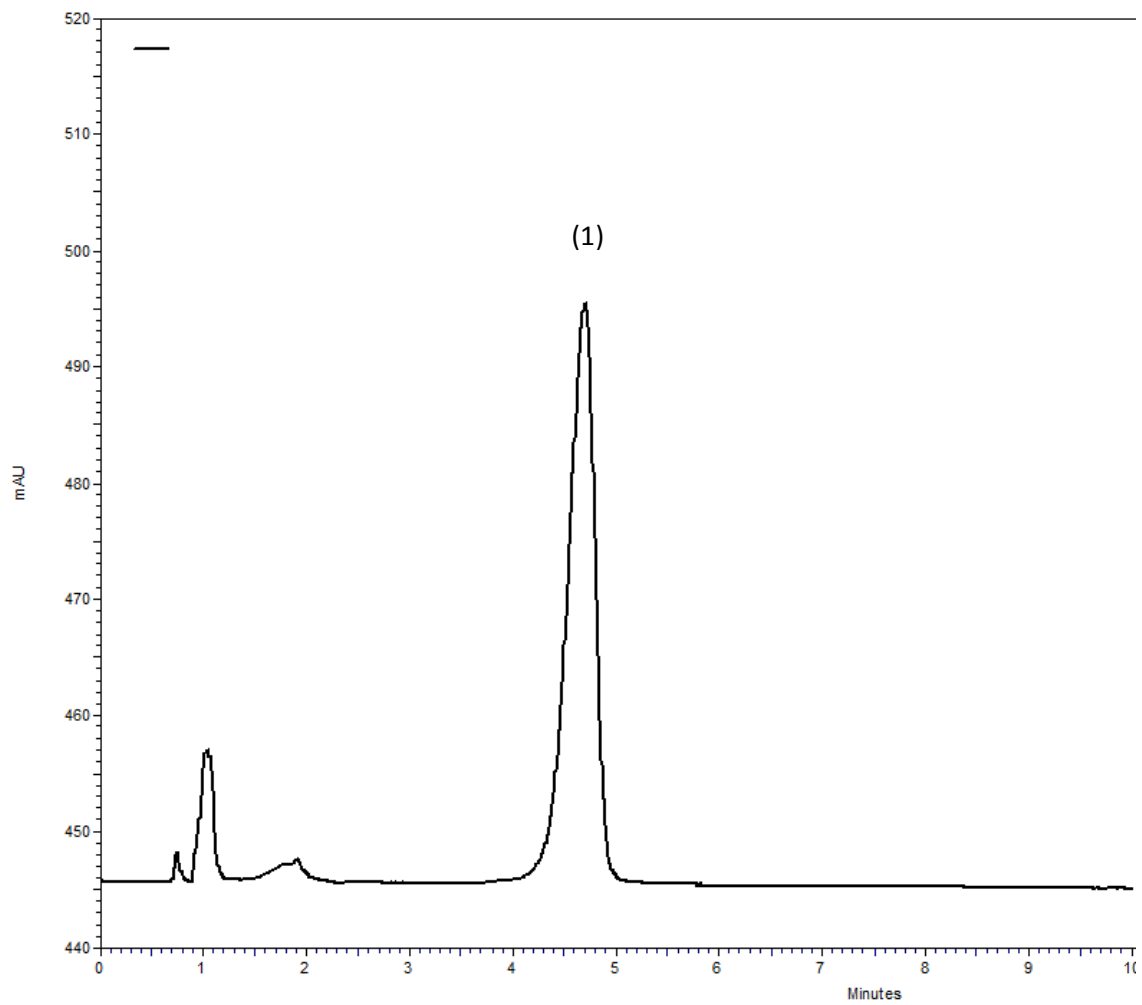
## 5. Výsledky a diskuse

## 5.1. Výběr chromatografických podmínek

Chromatografické podmínky byly převzaty z práce Lady Lukšíkové<sup>[24]</sup>. V těchto podmínkách bylo složení mobilní fáze methanol:voda 50:25 s úpravou pH na hodnotu 3 a průtokem 0,8 ml/min. Za těchto podmínek došlo k eluci ibuprofenu v čase 9 min, což je vzhledem k 10 min trvání analýz těsně před koncem, a proto není tento retenční čas příliš vhodný. Úpravy retenčního času bylo docíleno zvýšením průtoku mobilní fáze na 1,2 ml/min. Retenční čas ibuprofenu se tak posunul na hodnoty 4,5 min, což je již čas vyhovující.

Tvary píků ibuprofenu ale nebyly ideální, a proto bylo potřeba podmínky chromatografické analýzy dále upravit. Dalším krokem v úpravě podmínek byla změna složení mobilní fáze. Oproti původnímu složení mobilní fáze byl navýšen obsah methanolu na poměr methanol:voda 75:25. Hodnota pH byla zachována. Vzhled píků se zlepšil (obr. 5) a tyto podmínky byly zachovány pro hodnocení vzorků v průběhu celé práce.

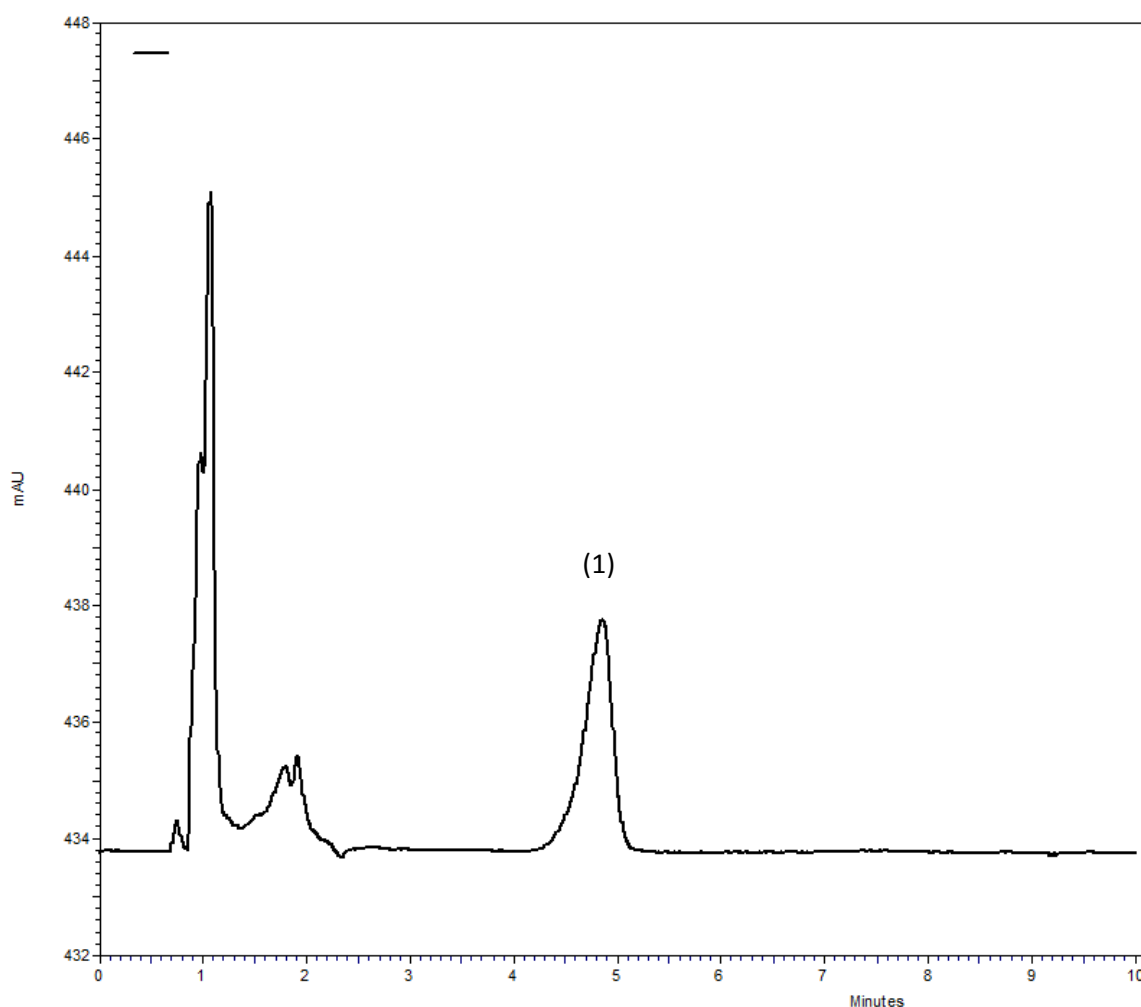
Hodnocení vzorků probíhalo UV detektorem při vlnové délce 222 nm, která byla rovněž převzata z práce Lukšíkové<sup>[24]</sup>.



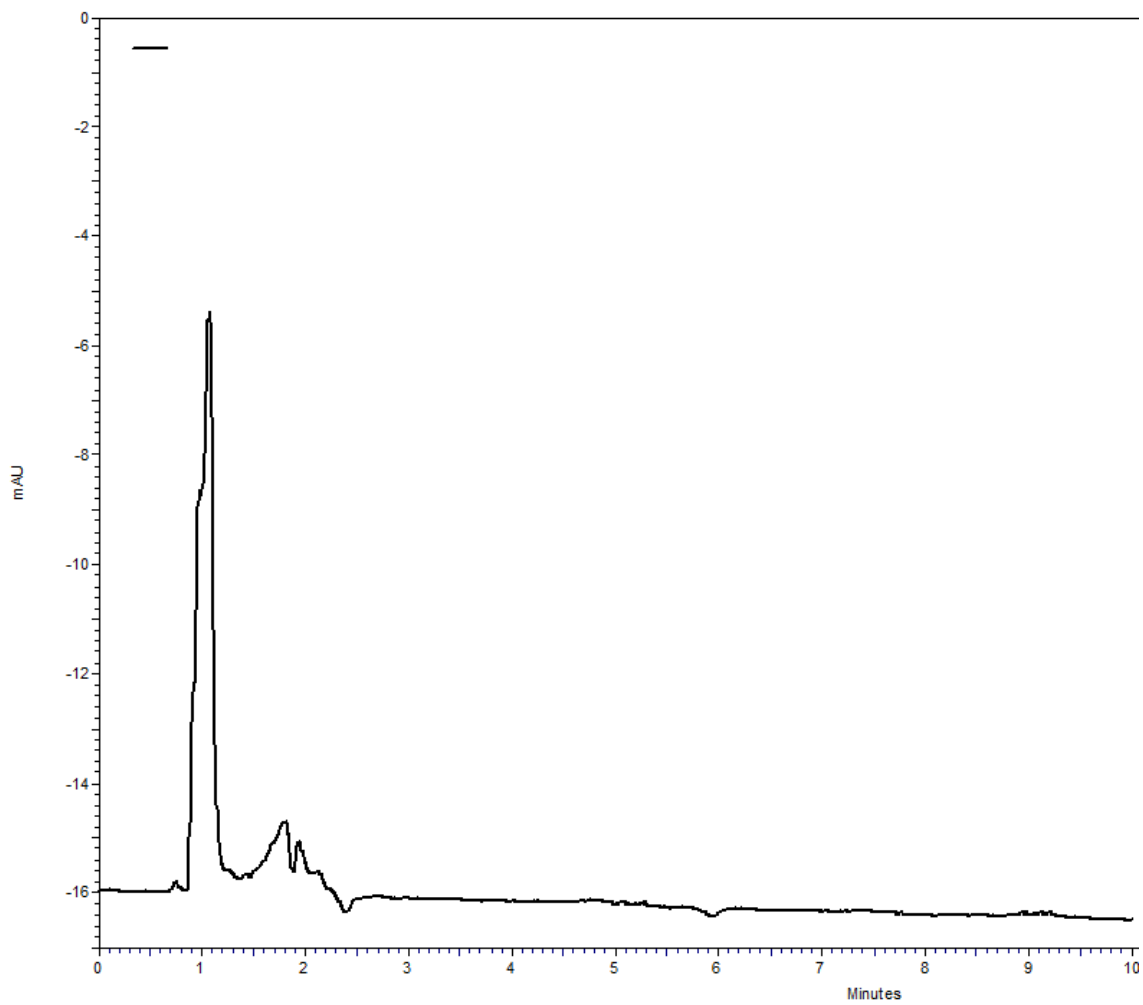
**Obrázek 5:** *Chromatogram standardu ibuprofenu: koncentrace ibuprofenu (1) 0,01mg/ml, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.*

## 5.2. Výběr podmínek pro SPME

Časové rozvržení mikroextrakce bylo převzato z diplomové práce Lucie Štichové<sup>[25]</sup>, která zkoušela extrahovat ibuprofen ze vzorků plné krve. Z téže práce byla převzata i úprava pH vzorku na hodnotu 3 kyselinou chloristou 5%. Chromatogram vzorku extrahovaného za těchto podmínek je na obr. 6. Tyto zvolené podmínky byly vyzkoušeny na různých koncentracích ibuprofenu v plazmě viz kapitola 5.3. Extrakce byla provedena i na vzorku čisté plazmy bez přídavku ibuprofenu. Na chromatogramu tohoto vzorku (obr. 7) nebyly žádné interferující píky. Postup byl dále optimalizován v kapitolách 5.4. - 5.6. Žádná z úprav ale nepřinesla výrazné zlepšení výtěžnosti, a proto byl původní postup využit i pro kvantifikaci ibuprofenu ve vzorku plazmy.



**Obrázek 6:** Chromatogram mikroextrakce ibuprofenu: koncentrace ibuprofenu (1) byla 3 µg/ml naředěného vzorku, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.



**Obrázek 7:** Chromatogram mikroextrakce prázdné plazmy: chromatografické podmínky viz kap. 4.4.

### 5.3. Vliv koncentrace ibuprofenu

Vliv koncentrace ibuprofenu na recovery metody extrakce ibuprofenu z plazmy byl zkoušen na několika vzorcích, které byly připraveny podle bodu 4.2. V tomto případě bylo 0,5 ml plazmy naředěno 4,5 ml vody. Ke vzorkům bylo přidáváno 5-50 $\mu$ g ibuprofenu a následně extrahováno podle kapitoly 4.3. jednoduchou mikroextrakcí. Výsledky těchto extrakcí jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1: Vliv koncentrace ibuprofenu**

Množství přidaného ibuprofenu [ $\mu$ g]	Koncentrace ibuprofenu v naředěném vzorku [ $\mu$ g/ml]	Plocha píku	Průměr ploch píků	Recovery [%]
5	1	2303	3365	4,2
		4427		
15	3	23516	23794	5,8
		24072		
25	5	37013	36151	5,4
		35289		
50	10	41227	41578	4,4
		41929		

Z výsledků vyplývá, že koncentrace ibuprofenu má vliv na výtěžnost mikroextrakce. Koncentrace 1  $\mu$ g/ml se pohybovala na hranici detekovatelnosti a nebyla vhodná pro další měření. Koncentrace 3 a 5  $\mu$ g/ml měly výtěžnost vyšší. Výtěžnost u koncentrace 10  $\mu$ g/ml ibuprofenu ve vzorku byla ale opět nižší. Důvodem mohlo být pravděpodobně překročení sorpční kapacity vlákna, což znamenalo sorpci relativně menšího množství ibuprofenu, a tím došlo ke snížení výtěžnosti.

## 5.4. Vliv ředění plazmy

Tato část práce je zaměřena na hodnocení vlivu ředění plazmy čištěnou vodou. Vzorky plazmy ve zbylých částech této práce byly připravovány ředěním 0,5 ml plazmy 4,5 ml čištěné vody, takže plazma byla naředěna 10x. Pro tuto část práce byly připraveny vzorky plazmy naředěné 3x a 2x. Pro 3x ředěnou plazmu byl připraven vzorek 1,5 ml plazmy s přídavkem 45 µg ibuprofenu naředěný 3 ml vody, druhý vzorek s přídavkem 15µg ibuprofenu a třetí s přídavkem 3 µg ibuprofenu. Další 3x ředěný vzorek se skládal z 0,5 ml plazmy s přídavkem 5 µg ibuprofenu naředěný 1 ml vody. Pro 2x ředěnou plazmu byl připraven vzorek ze 2 ml plazmy s 20 µg ibuprofenu naředěný 2 ml vody. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2: Vliv ředění plazmy**

Ředění	Celkový objem [ml]	Množství ibuprofenu [µg]	Koncentrace ibuprofenu v naředěném vzorku [µg/ml]	Plocha píku	Průměrná plocha píku	Recovery [%]
3x	4,5	45	10	98662	98306	5,2
				97951		
3x	4,5	15	3,3	79202	78566	12,7
				77929		
3x	4,5	3	0,7	14604	14880	11,3
				15155		
3x	1,5	5	3,3	48300	47774	7,8
				47248		
2x	4	20	5	37957	37941	4,0
				37925		

Z výsledků uvedených v tabulce 2. lze vysledovat, že ředění plazmy má vliv na účinnost SPME. Ve vzorku s přídavkem 45 µg ibuprofenu byla výtěžnost sice vyšší než ve vzorku s 50 µg ibuprofenu v kapitole 5.2., avšak ne příliš významně. Pravděpodobně je to ze stejného důvodu jako v kapitole 5.2., tedy nasycení sorpční kapacity vlákna. U vzorku s přídavkem 15µg ibuprofenu ale již bylo dosaženo zvýšení recovery



téměř o 7 %. Tento nárůst dokazuje, že ve vzorcích s koncentrovanější plazmou dochází k sorpci na vlákno ve zvýšené míře oproti desetinásobnému zředění. Při trojnásobném zředění plazmy jsou zároveň lépe hodnotitelné vzorky o nízkých koncentracích. Vzorek s přídatkem 3  $\mu\text{g}$  ibuprofenu byl analyzován s výtěžností 11,3%, oproti 4,2 % u vzorku s podobnou koncentrací ale desetinásobně zředěnou plazmou v kapitole 5.2. Pozitivní vliv na výtěžnost je zřejmý, nevýhodou ale je potřeba většího množství analyzované plazmy. Dále byla zkoušena extrakce vzorku s přídatkem 5  $\mu\text{g}$  ibuprofenu, kde byla koncentrace stejná jako u vzorku s přídatkem 15  $\mu\text{g}$ , ale v menším celkovém objemu vzorku. To by mohlo odstranit tuto nevýhodu a umožnilo použít objem 0,5 ml plazmy, naředěný 3x na 1,5 ml. Tato extrakce však nedosáhla takové výtěžnosti, to mohlo být způsobeno technickou náročností provedení mikroextrakce. Celkový objem 1,5 ml vzorku vyžadoval provedení extrakce ve velmi úzké zkumavce, která zároveň neumožňovala míchání vzorku na stejné úrovni jako u objemnějších vzorků, u kterých byla mikroextrakce prováděna ve velké vialce s plochým dnem. U vzorku s dvakrát zředěnou plazmou a přídatkem 20  $\mu\text{g}$  ibuprofenu bylo dosaženo výtěžnosti nižší než u vzorku o stejné koncentraci ibuprofenu v kapitole 5.2. Tento výsledek je ve shodě s výsledky mikroextrakcí ze vzorků neředěné plazmy, které byly prováděny na stejném pracovišti a byly při nich získány velmi nízké výtěžky. Přestože používání vzorků s koncentrovanější plazmou bylo přínosné pro výtěžnost, velká spotřeba plazmy je významnou nevýhodou. Výsledky potvrdily, že ředění 0,5 ml plazmy na celkový objem 5 ml umožňuje nejjednodušší a nejspolehlivější metodu extrakce, a proto bylo základní desetinásobné ředění využíváno i ve zbytku této práce.

## 5.5. Vliv vysolování

V další části práce bylo ověřováno, zda bude mít vliv přidavek chloridu sodného ke vzorku, jak uvádí Padron<sup>[12]</sup>, Moeder<sup>[13]</sup> a Ulrich<sup>[11]</sup>. V této kapitole byl ověřován přidavek 0,5 g a 1,0 g NaCl ke vzorku s 0,5 ml plazmy s 15 $\mu$ g ibuprofenu a 4,5 ml vody. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3: Vliv vysolování**

Množství přidaného NaCl [g]	Plocha píku	Průměrná plocha píku	Výtěžnost [%]
0	24270	24597	6,1
	24923		
0,5	22066	22708	5,7
	23350		
1	3757	3912	0,1
	4066		

Z výsledků vyplývá, že vysolování nemělo žádný pozitivní vliv na výtěžnost ibuprofenu při mikroextrakci. Podle práce Ulricha<sup>[11]</sup> je efekt vysolování zanedbatelný z hlediska výtěžnosti, ale mohl by mít efekt ve standardizaci obsahu solí ve vzorku. Dále nedoporučuje přidávat do vzorku více než 10% soli. Výtěžnost vzorku bez přídavku soli byla lehce vyšší než u vzorku s přídavkem 0,5 g soli. Tento přídavek odpovídal 10 % koncentraci obsahu soli ve vzorku. Ze vzorku s přídavkem 1 g soli bylo vyextrahováno jen velmi malé množství ibuprofenu, což jen potvrzuje doporučení<sup>[11]</sup> nepřidávat ke vzorkům množství, které by znamenalo překročení hranice 10 % obsahu soli.

## 5.6. Vliv násobné mikroextrakce

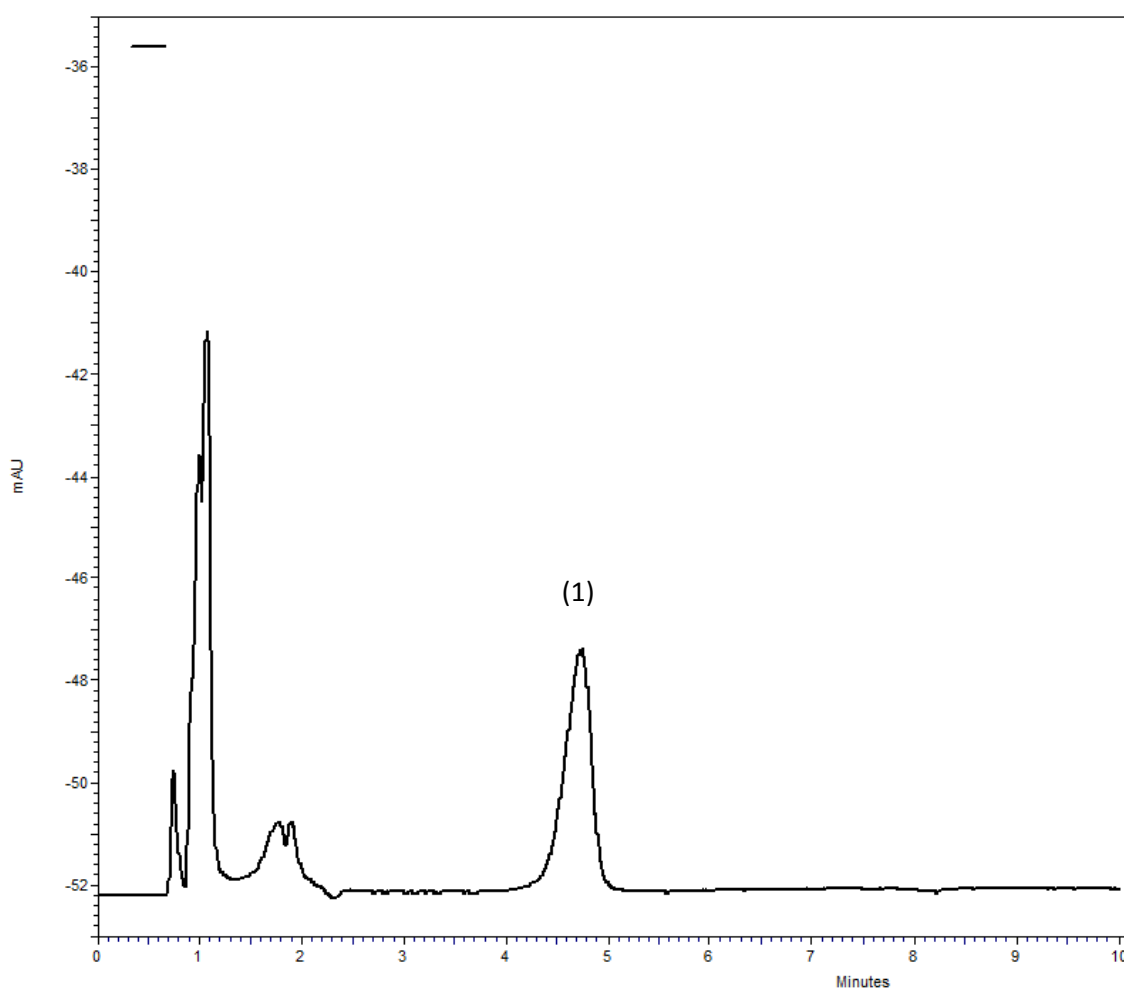
V této části práce byly ověřovány výsledky publikované de Jongem<sup>[26]</sup> a Theodoridisem<sup>[27]</sup>. V jejich pracích byla zkoušena několikanásobná extrakce různých léčiv z vodného roztoku. Práce prokázaly nárůst extrahovaného množství látek při stejném celkovém čase extrakce a zkrácení času potřebného pro dosažení extrakce stejného množství, jako v případě extrakce jednoduché.

V této práci bylo ověřováno zmíněné tvrzení na vzorcích obsahujících 25 µg ibuprofenu v 0,5 ml plazmy naředěné 4,5 ml čištěné vody. Byla provedena jednoduchá extrakce (A) trvající 30 min s následnou 20 min desorpcí. Následně byla provedena dvojnásobná extrakce (B) ze stejného vzorku trvající 15 min s následnou 10 min desorpcí a tento postup byl ještě jednou zopakován, takže celkový čas analýzy zůstal stejný. Na dalším vzorku, připraveném následující den stejným postupem, byla provedena jednoduchá extrakce s celkovým časem 50 min (obr. 8) a trojnásobná extrakce složená ze tří sorpcí trvajících 10 min a tří desorpcí trvajících 7 min s celkovým časem 51 min (obr.9). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

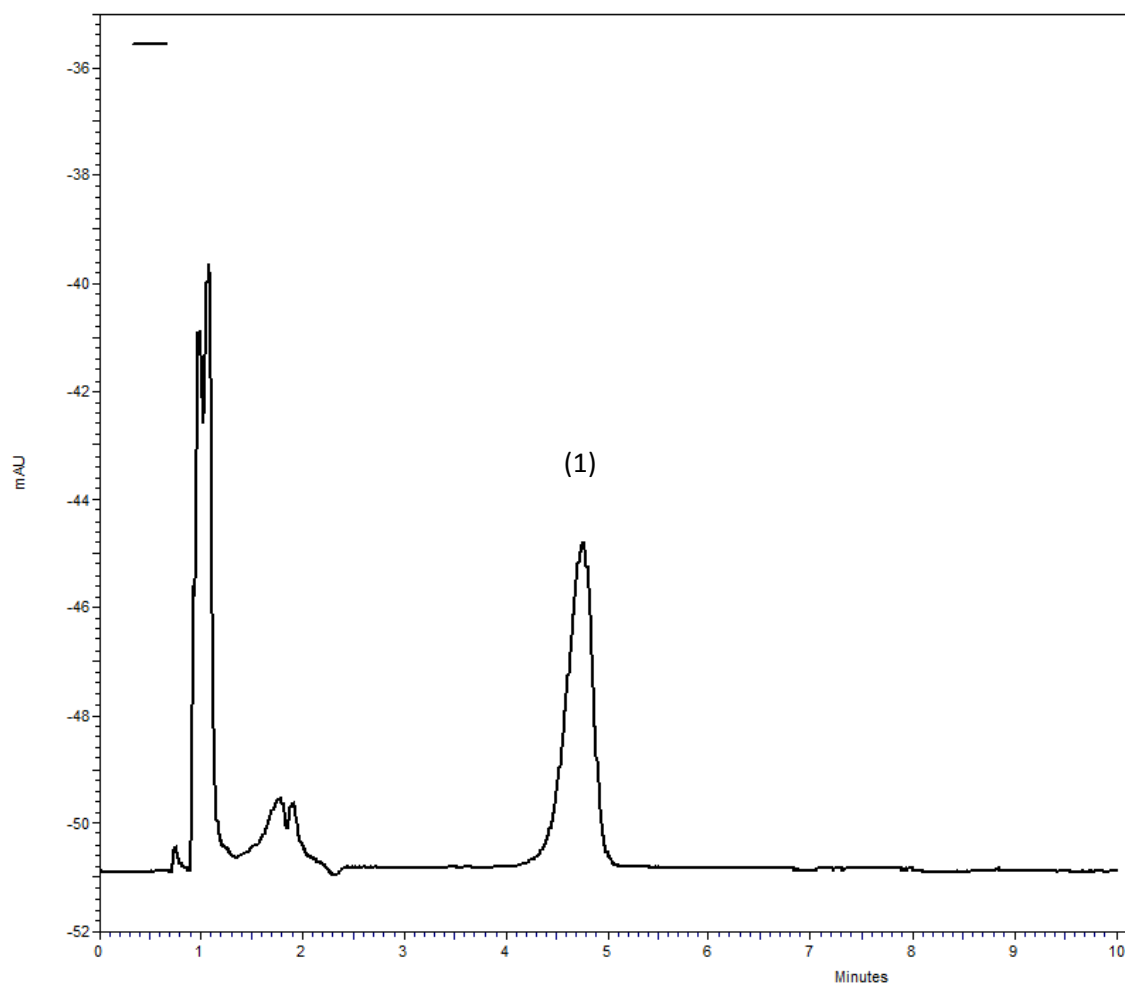
**Tabulka 4: Vliv násobné mikroextrakce A: 30 min sorpce + 20 min deorpce, B: 2x(15 min sorpce + 10 min desorpce), C: 30 min sorpce + 20 min desorpce, D: 3x(10 min sorpce + 7 min desorpce)**

Časové složení extrakce	Plocha píku	Průměrná plocha píku	Recovery [%]
A	185194	181165	15,3
	177136		
B	203525	202164	17,0
	200803		
C	90417	89122	7,1
	87826		
D	115268	113732	9,1
	112196		

Z tabulky je vidět, že násobná mikroextrakce je určitým přínosem. U dvojnásobné mikroextrakce byl nárůst recovery 1,7%. Při trojnásobné extrakci byl nárůst recovery 2%, což v porovnání s dvojnásobnou mikroextrakcí nepůsobí jako velký nárůst výtěžnosti. Násobná mikroextrakce se ukázala jako vhodná metoda k částečnému zvýšení výtěžků SPME, přičemž byl prokázán rostoucí vliv dílčích mikroextrakcí s jejich rostoucím počtem. Přestože došlo ke zvýšení výtěžků mikroextrakce, nebylo zvýšení o 2% tak významné, aby byla násobná mikroextrakce využita pro kvantifikaci vzorků



**Obrázek 8: Jednoduchá mikroextrakce: vzorek ibuprofenu (1) o koncentraci 5 µg/ml naředěného vzorku, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.**

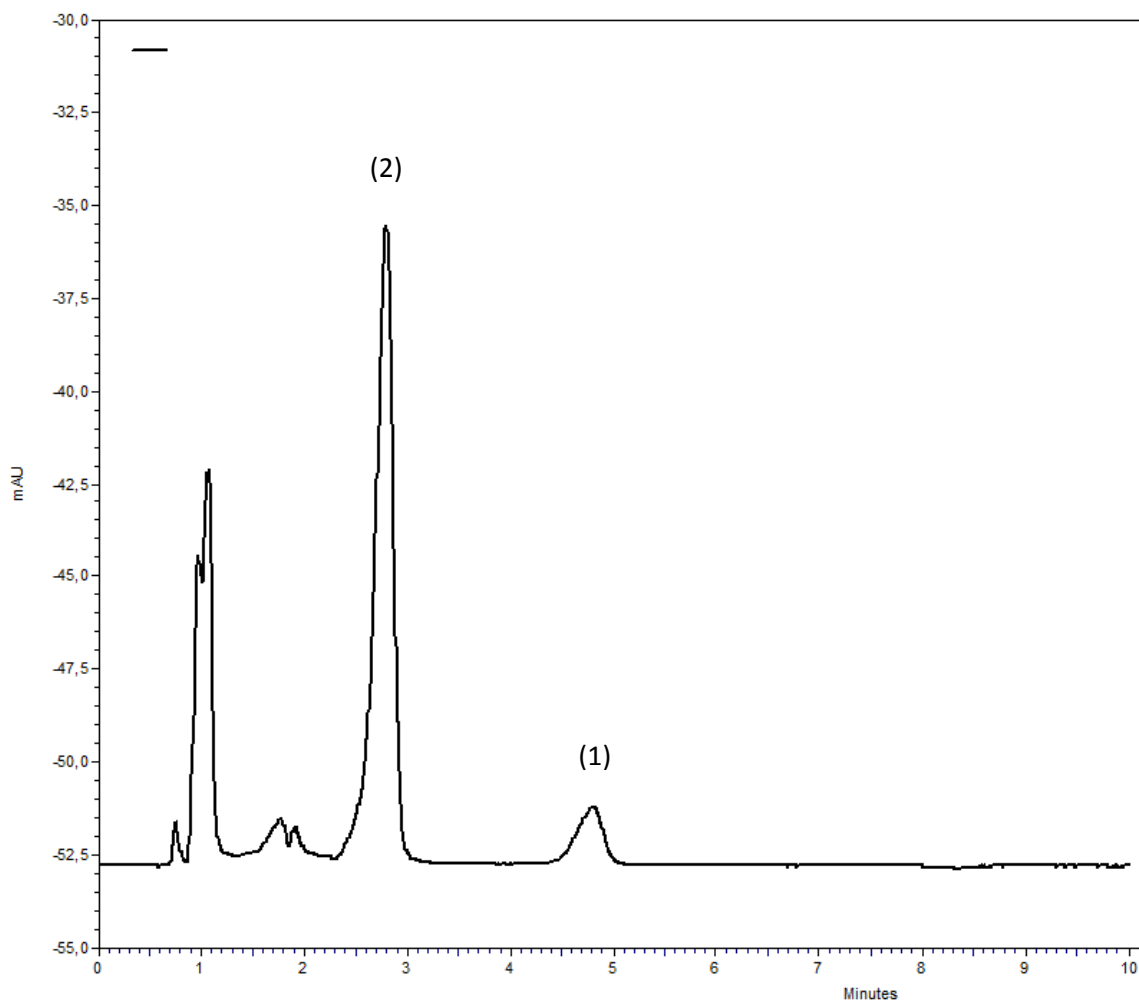


**Obrázek 9: Trojnásobná mikroextrakce: vzorek ibuprofenu (1) o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  naředěného vzorku, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.**

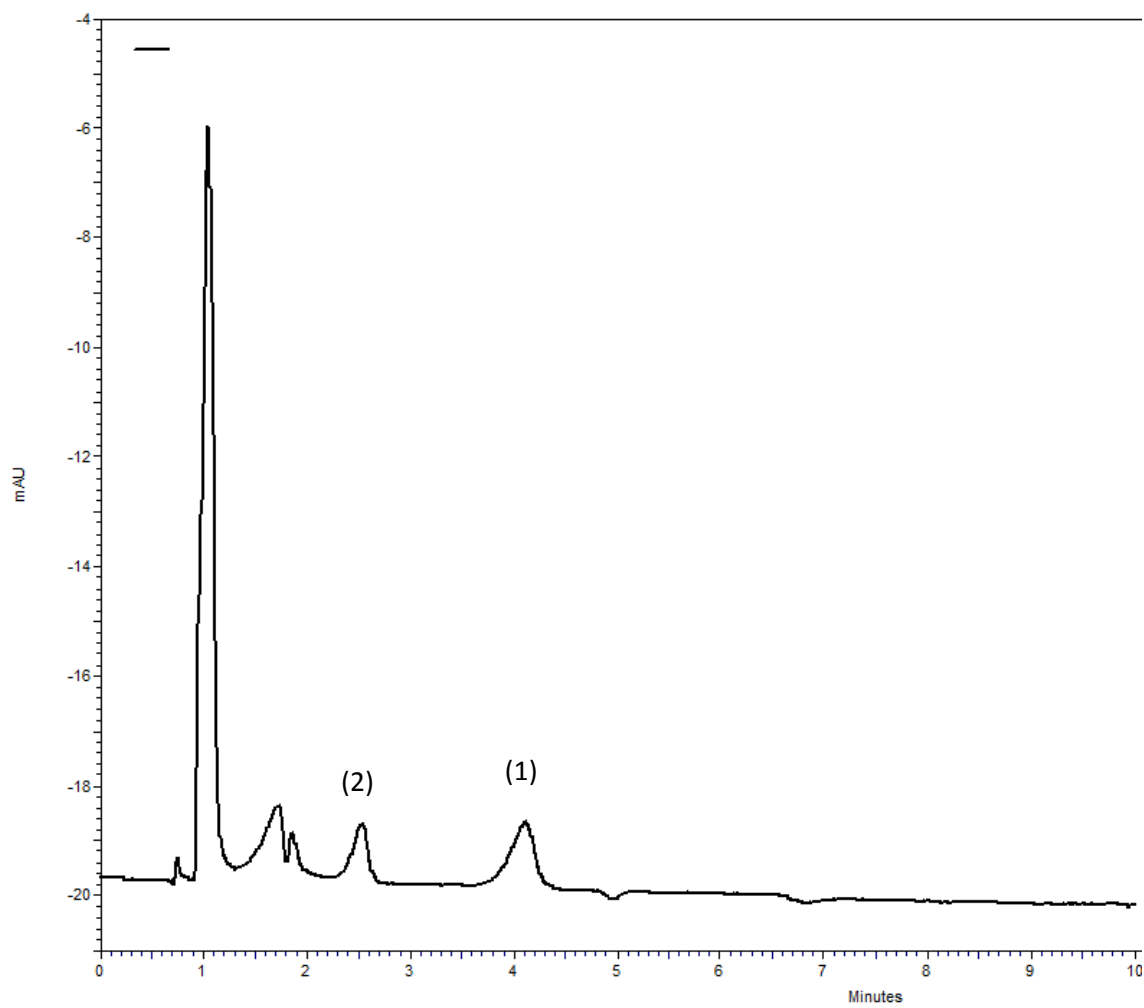
## 5.7. Výběr vnitřního standardu

Při výběru vnitřního standardu byl zkoušen naproxen a kyselina tiaprofenová. Retenční čas ibuprofenu byl za zvolených chromatografických podmínek 4,5 minuty. Kyselina tiaprofenová měla velmi nízký retenční čas a její pík nebyl zcela oddělen od základního píku na chromatogramu. Naproxen měl při zvolených chromatografických podmínkách retenční čas 2,8 minuty. V tomto čase se při extrakci prázdné plazmy nezobrazovaly žádné interferující píky, naproxen byl proto zvolen jako vnitřní standard.

Odezva detektoru byla při nástřicích standardů podobná na naproxen i ibuprofen. Při použití stejného množství 25  $\mu\text{g}$  ibuprofenu a 25  $\mu\text{g}$  naproxenu ve vzorku plazmy byla však po mikroextrakci odezva naproxenu několikanásobně vyšší než odezva ibuprofenu (obr. 10). To bylo pravděpodobně způsobeno vyšší afinitou naproxenu k PDMS-DVB vrstvě na křemenném vlákně, v důsledku čehož docházelo k sorpci většího množství naproxenu, než ibuprofenu. V dalším vzorku byl proto zkoušen poměr 5  $\mu\text{g}$  naproxenu a 30  $\mu\text{g}$  ibuprofenu. Při tomto poměru látek byla však plocha píku naproxenu stále téměř o 25 % větší. Přidané množství 2  $\mu\text{g}$  naproxenu k 0,5 ml plazmy se ukázalo jako přiměřené pro použití při hodnocení ibuprofenu metodou vnitřního standardu (obr. 11).



**Obrázek 10:** Chromatogram mikroextrakce vzorku naproxenu a ibuprofenu: koncentrace naproxenu (2) i ibuprofenu (1) byla 5 µg/ml naředěného vorku, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.



**Obrázek 11:** Chromatogram mikroextrakce naproxenu a ibuprofenu: koncentrace naproxenu (2) byla 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace ibuprofenu byla 4  $\mu\text{g/ml}$  v naředěném vzorku plazmy chromatografické podmínky viz kap. 4.4.

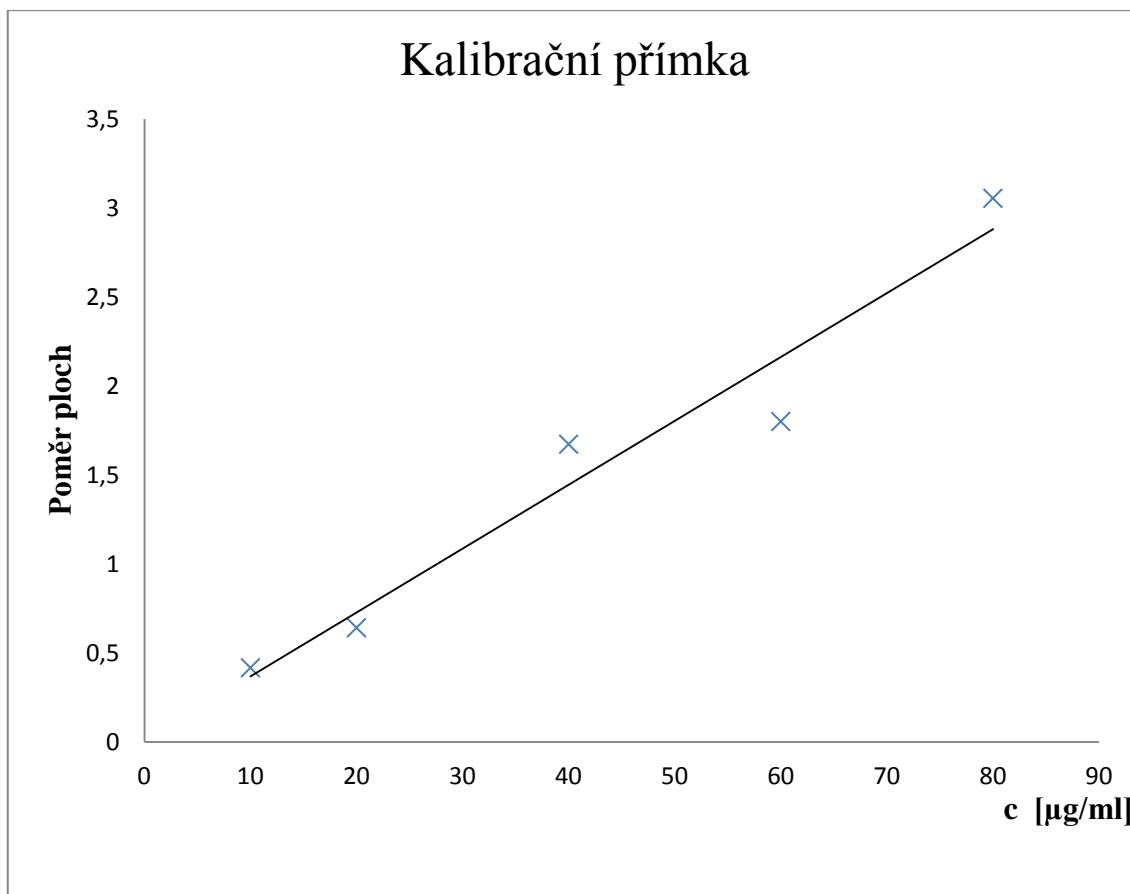


## 5.8. Sestrojení kalibrační přímky

Pro sestrojení kalibrační přímky byl použit standartní přídavek 2 µg naproxenu ke všem vzorkům ibuprofenu. Vzorky byly připraveny z 0,5 ml plazmy s přídavkem 5, 10, 20, 30 a 40 µg ibuprofenu a 2 µg naproxenu naředěné na 5 ml. Byla prováděna jednoduchá extrakce složená z 30 min sorpce a 20 min desorpce do methanolu. Vzorky byly hodnoceny HPLC za podmínek uvedených v kapitole 4.4. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Byla sestavena kalibrační přímka viz graf 1.

**Tabulka 5: Kalibrační přímka**

Koncentrace ibuprofenu [µg/ml]	Plocha píku ibuprofenu	Plocha píku naproxenu	Poměr ploch ibuprofenu a naproxenu	Průměrný poměr ploch
10	11324	29255	0,3871	0,4173
	12751	28491	0,4475	
20	11277	17149	0,6573	0,6419
	10038	16025	0,6264	
40	20348	13465	1,5112	1,6731
	20618	11236	1,8350	
60	43537	24380	1,7858	1,8008
	43942	24200	1,8158	
80	87257	27701	3,1500	3,0547
	82857	27999	2,9593	



**Graf 1: Kalibrační přímka**

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

Směrnice  $k = 0,0359 \pm 0,0048$

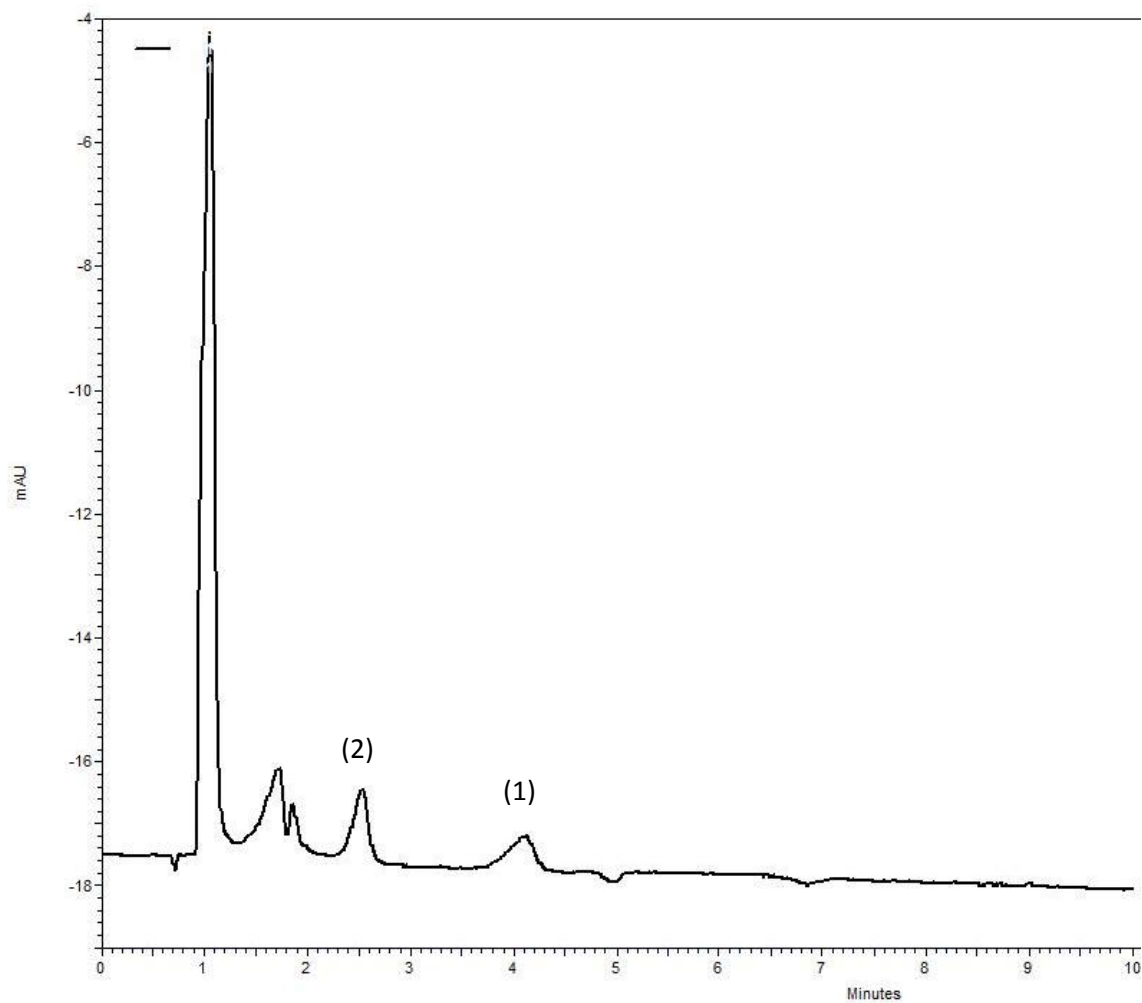
absolutní člen  $q = 0,01 \pm 0,23$

koeficient korelace  $R = 0,975$

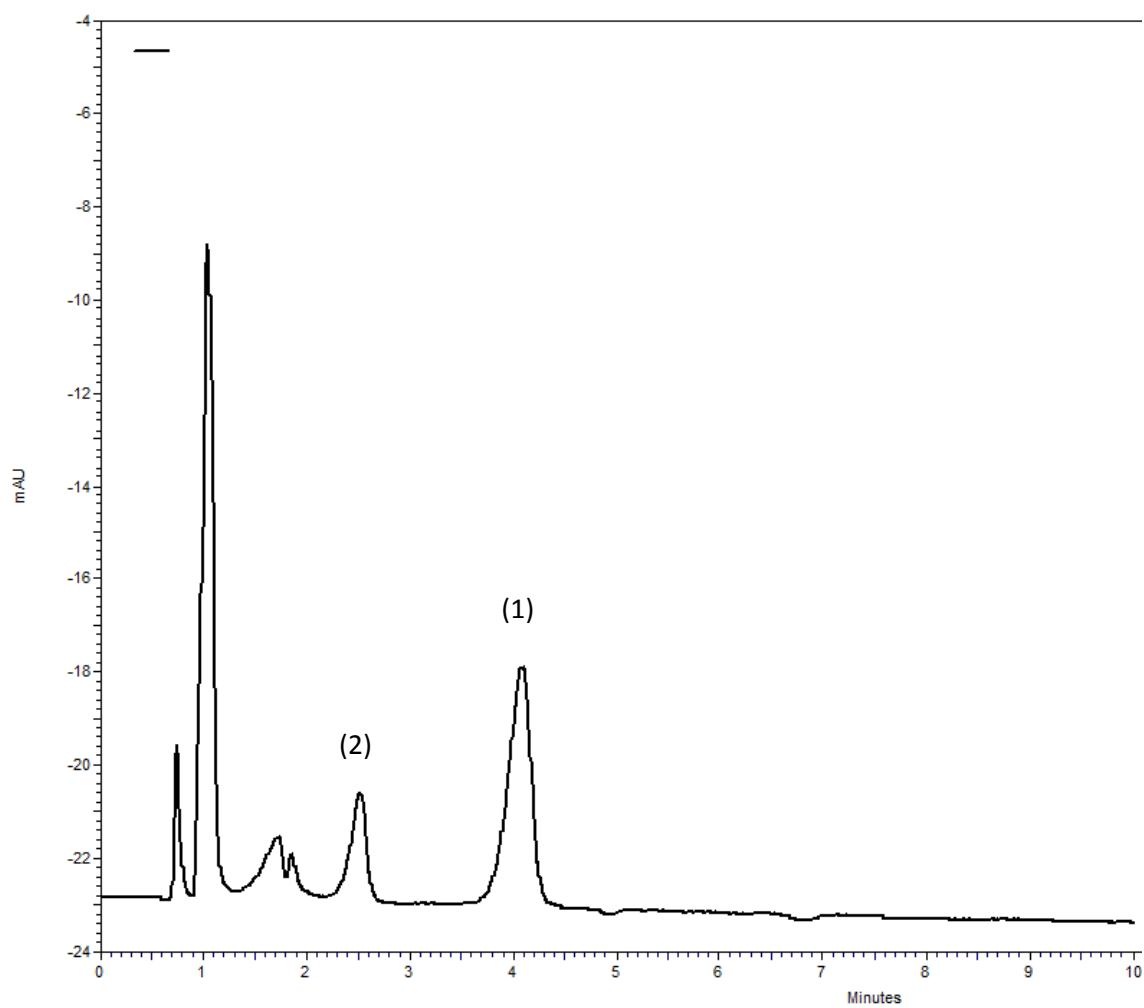
reziduální odchylka  $s_{\text{rez}} = 0,273$

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

Rovnice kalibrační přímky pro mikroextraakci ibuprofenu z plazmy je  $y = 0,0359x + 0,01$ , korelační koeficient je 0,975.



**Obrázek 12:** Chromatogram mikroextrakce kalibrační přímky: koncentrace naproxenu (2) v neředěné plazmě byla 4  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace ibuprofenu (1) byla 20  $\mu\text{g/ml}$ , chromatografické podmínky viz kap. 4.4.



**Obrázek 13:** Chromatogram mikroextrakce kalibrační přímky: koncentrace naproxenu (2) byla 4  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace ibuprofenu (1) byla 80  $\mu\text{g/ml}$  v neředěné plazmě, chromatografické podmínky viz kap. 4.4.

## 5.9. Ověření kalibrační přímky

Ověření kalibrační přímky bylo provedeno na třech modelových vzorcích 0,5 ml plazmy ředěné 4,5 ml vody s přidavkem 15, 25 a 35 µg ibuprofenu a 2 µg naproxenu. U těchto vzorků byl zjištěn poměr ploch píků ibuprofenu a naproxenu a následně dosazen do regresní rovnice kalibrační přímky. Vypočítaná koncentrace byla porovnána s přidanou podle vzorce:

$$\frac{100c_p}{c_p}$$

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6: Modelové vzorky**

Přidaná koncentrace ibuprofenu ( $c_p$ ) [µg/ml]	Plocha píku ibuprofenu	Plocha píku naproxenu	Poměr ploch	Průměrný poměr ploch	Vypočtená koncentrace ibuprofenu ( $c_v$ ) [µg/ml]	Zjištěné množství ibuprofenu [%]
30	19833	14857	1,3350	1,3287	34,0	113,3
	18337	13867	1,3223			
50	54778	30789	1,7791	1,7443	45,6	91,2
	50963	29812	1,7095			
70	83078	31867	2,6070	2,6323	70,3	100,4
	82618	31088	2,6576			

Zjištěné množství ibuprofenu v modelových vzorcích bylo v rozmezí 91,2-113,3%.

## 5.10. Detekční a kvantitativní limit

Detekční limit (LOD) je nejnižší koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně, která se definuje jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu ve slepém pokusu. <sup>[28]</sup>

Kvantitativní limit (LOQ) je nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností, která se definuje jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu ve slepém pokusu. <sup>[28]</sup>

Směrodatná odchylka šumu se odhadne:

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

kde  $r^+$  je kladná amplituda šumu a  $r^-$  je záporná amplituda šumu.

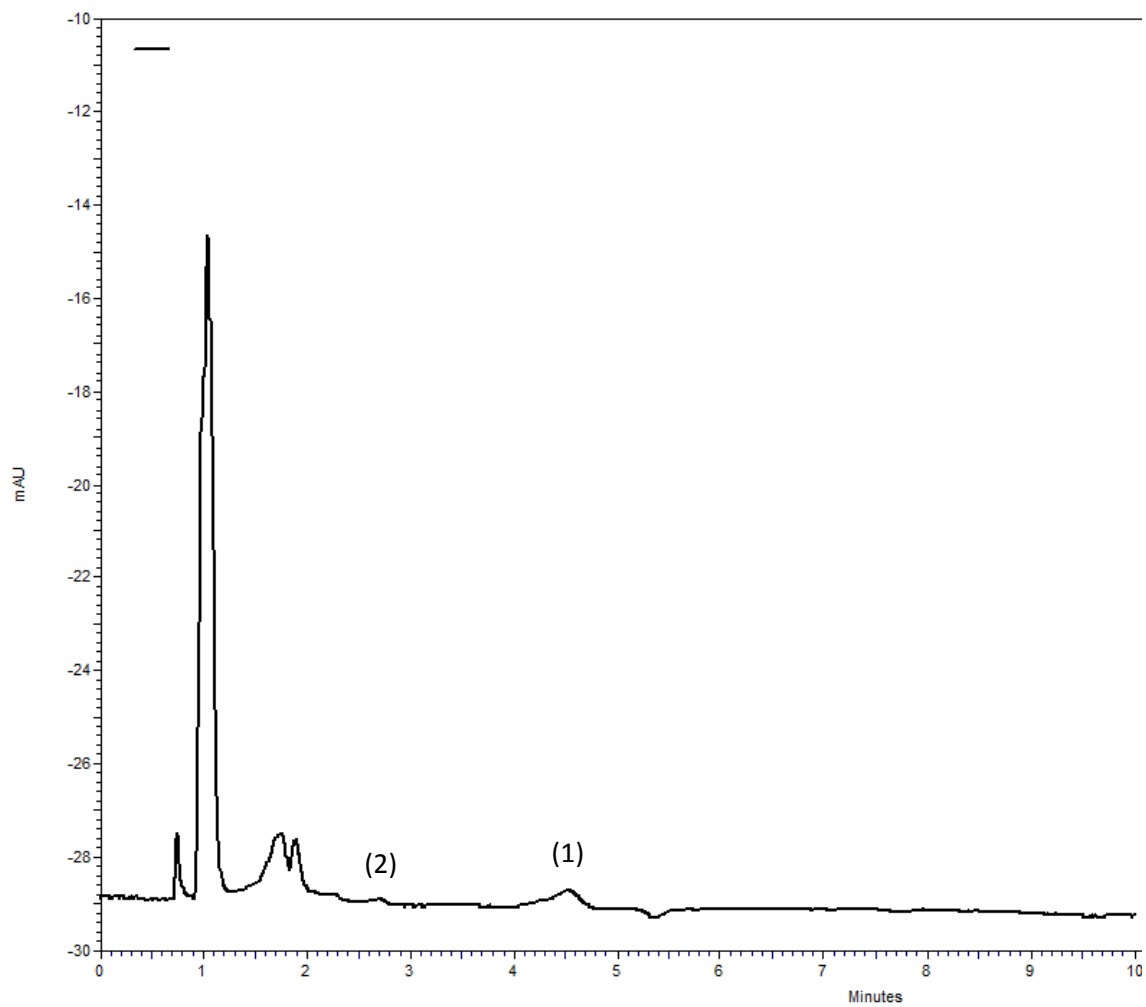
Detekční a kvantitativní limit <sup>[28]</sup> se vypočítají podle vzorců:

$$LOD = 3 \times s_n \times \frac{K}{b_1}$$

$$LOQ = 10 \times s_n \times \frac{K}{b_1}$$

kde  $K$  je poměr plocha/výška píku a  $b_1$  je poměr plocha píku/koncentrace analytu.

Limit detekce ibuprofenu je za zvolených chromatografických podmínek 0,0041 µg/ml a limit kvantifikace je 0,0147 µg/ml. Limit detekce naproxenu je 0,0014 µg/ml a limit kvantifikace je 0,0045 µg/ml. Byly připraveny roztoky obou látek v těchto koncentracích a nastříknuty na HPLC.



**Obrázek 14:** Limit kvantifikace ibuprofenu a naproxenu: koncentrace ibuprofenu (1) byla 0,015  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace naproxenu (2) byla 0,005  $\mu\text{g/ml}$ , chromatografické podmínky viz kap. 4.4.

## 6. Závěr



V této práci byly hodnoceny vzorky ibuprofenu v plazmě metodou mikroextrakce na tuhé fázi pomocí polydimethylsiloxanového PDMS-DVB vlákna a následnou HPLC analýzou.

Mikroextrakce probíhala ponořením vlákna do vzorku ředěné plazmy s upraveným pH na hodnotu 3, kde se během 30 minut sorboval ibuprofen na vlákno, a poté následovala 20 minutová eluce ibuprofenu do methanolu. Tento methanolický extrakt byl následně hodnocen HPLC. Mobilní fáze byla směs metanol:voda (75:25) s hodnotou pH upravenou na 3 a průtoková rychlost byla 1,2 ml/min. Separace probíhala na koloně s reverzní fází C18. Detekce probíhala při vlnové délce 222 nm.

V úvodu práce byl hodnocen vliv koncentrace ibuprofenu v plazmě při desetinasobném zředění na koncentracích 10, 30, 50 a 100 µg/ml. Výtěžnost byla nejvyšší u vzorku s koncentrací 30 µg/ml. Ve vzorcích s plazmou ředěnou pouze třikrát byla vyšší výtěžnost, než ve vzorcích s plazmou zředěnou desetkrát. Vyšší spotřeba plazmy, případně malý objem vzorku při stejné spotřebě, převážily přínos této úpravy vzorku. Ke vzorku s koncentrací 30 µg/ml bylo přidáno 0,5 a 1 g NaCl. Vzorek s 0,5 g soli dosáhl nepatrně menší výtěžnosti, zatímco při množství 1 g přidané soli se již ze vzorku neextrahoval žádný ibuprofen. Při postupu, kdy se jednoduchá mikroextrakce rozdělila na 2, případně 3 dílčí mikroextrakce, skládající se z kratších časových intervalů sorpce a desorpce se stejným celkovým časem, došlo ke zlepšení výtěžnosti mikroextrakce o 2 %. Žádná z úprav podmínek mikroextrakce nepřinesla výrazné zvýšení výtěžnosti, a proto byla pro kvantifikaci ibuprofenu vybrána jednoduchá mikroextrakce, tedy vzorek desetkrát zředěné plazmy upravený na pH 3 a délkou sorpce 30 minut a desorpce 20 minut.

Pro kvantifikaci ibuprofenu v plazmě byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl zvolen naproxen. Ze vzorků s přídavkem 5, 10, 20, 30, 40 µg ibuprofenu byla sestrojena kalibrační přímka. Zjištěná regresní funkce přímky je  $y=0,0359x+0,01$ , korelační koeficient je 0,975. Kalibrační přímka byla ověřena modelovými vzorky. Byly vypočteny detekční a kvantitativní limity a to: limit detekce ibuprofenu 0,0041 µg/ml, limit kvantifikace ibuprofenu 0,0147 µg/ml, limit detekce naproxenu 0,0014 µg/ml a limit kvantifikace naproxenu 0,0045 µg/ml.

## 7. Seznam literatury

- 1) Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie; SNTL; Praha 1984
- 2) Klíma J. a kol.: Pokroky ve farmacii 7: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii; Avicenum; Praha 1987
- 3) Český lékopis 2009; Grada; Praha 2009
- 4) <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/hplc.html> citováno 4/2013
- 5) Sadek, Paul Charles. Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography; Wiley; Hoboken 2004
- 6) Douša M.: HPLC.CZ [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) citováno 4/2013
- 7) Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P.: Handbook of HPLC; Marcel Dekker; New York 1998
- 8) Babjuk j., Perlík F., Šídlo Z.: Bioanalytika léků; Avicenum; Praha 1990
- 9) Mikroextrakce tuhou fází; Sigma Aldrich; Praha 1998
- 10) Pragst F.: Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology; *Anal. Boanal. Chem.* 2007, 388, 1393-1414
- 11) Ulrich S.: Solid-phase microextraction in biomedical analysis; *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 167-194
- 12) Padron M.E.T., Ferrera Z.S., Rodriguez J.J.S., Coupling of solid-phase microextraction with micellar desorption and high performance liquid chromatography for the determination of pharmaceutical residues in environmental liquid samples; *Biomed. Chromatogr.* 2009, 23, 1175-1185.
- 13) Moeder M., Schrader S., Winkler M., Popp P., Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples; *J. Chromatogr. A* 2000, 873, 95-106.
- 14) Slíva J., Votava M.: Farmakologie; Triton; Praha 2011
- 15) Hartl J. a kol.: Farmaceutická chemie II; Karolinum; Praha 1994
- 16) Mikro-verze AISLP 2012.2 pro MS Windows
- 17) Wang S., Oakes K. D., Bragg L.M., Pawliszyn J., Dixon G., Servos M.R.: Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish; *Chemosphere* 2011, 85, 1472-1480
- 18) Xia Z., Gan T.T., Chen H., Lv R., Wei W.L., Yang F.Q.: A new open tubular capillary microextraction and sweeping for the analysis of super low concentration of hydrophobic compounds; *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3221–3230

- 19) Musteata F.M., Pawliszyn J., Qian M.G., Wu J.T., Miwa, G. T.: Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction; *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 1712–1722
- 20) Togunde O.P., Oakes K.D., Servos M.R., Pawliszyn J.: Optimization of solid phase microextraction for non-lethal in vivo determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* 2012, 1261, 99-106
- 21) de Oliveira A.R.M., Cesarino E.J., Bonato P.S.: Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine; *J. Chromatogr. B* 2005, 818, 285-291.
- 22) Arroyo D., Ortiz M.C., Sarabia L.A.: Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 4487-4497.
- 23) Suchara E., Budziak D., Martendal E., Costa L.L.F., Carasek E.: A combination of statistical and analytical evaluation methods as a new optimization strategy for the quantification of pharmaceutical residues in sewage effluent; *Anal Chim. Acta* 2008, 613, 169-176.
- 24) Lukšíková L.: HPLC analýza léčiv; Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009
- 25) Štichová L.: HPLC analýza léčiv IV. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2012
- 26) de Jong G.J., Koster E.H.M.: Multiple solid-phase microextraction; *J. Chromatogr. A* 2000, 878, 27-33
- 27) Theodoridis G., Lontou M.A., Michopoulos F., Sucha M., Gondova T.: Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography. Application in the analysis of pharmaceuticals in urine; *Anal Chim. Acta* 2004, 516, 197-204
- 28) Holík M.: Validace analytických metod; Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno 1995