

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Využití HPLC analýzy pro stanovení potenciálních léčiv v biologickém
materiálu**
(diplomová práce)

Školitel: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.

Hradec Králové, 2005

Pavla Čechová

Děkuji Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za odbornou pomoc, vedení, ochotu i čas věnovaný k zpracování této diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům katedry biofyziky a fyzikální chemie za spolupráci a dobré rady.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část.....	7
2.1. Chromatografické metody.....	8
2.1.1. Adsorpční chromatografie	9
2.1.2. Rozdělovací chromatografie.....	10
2.1.3. Ionově výměnná chromatografie	11
2.1.4. Gelová chromatografie	12
2.1.5. Frontální chromatografie	13
2.1.6. Vytěšňovací chromatografie	13
2.1.7. Eluční chromatografie.....	13
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	14
2.2.1. Přístroj	15
2.2.1.1. Čerpací systémy	16
2.2.1.2. Dávkovací zařízení	16
2.2.1.3. Mobilní fáze	16
2.2.1.4. Kolony	17
2.2.2. Detektory.....	18
2.2.2.1. Spektrofotometrické detektory	19
2.2.2.2. Fluorimetrické detektory	19
2.2.2.3. Elektrochemické detektory.....	20
2.2.2.4. Refraktometrické detektory.....	20
2.3. Chromatografické charakteristiky.....	20
2.3.1. Chromatogram	20
2.3.2. Retenční data	21
2.3.2.1. Retenční čas a objem.....	21
2.3.2.2. Distribuční konstanta	21
2.3.2.3. Hmotnostní distribuční poměr D_m	21
2.3.3. Test způsobilosti a validace	22
2.3.3.1. Faktor symetrie.....	23
2.3.3.2. Rozlišení.....	23
2.3.3.3. Počet teoretických pater	23
2.3.3.4. Relativní retence.....	24
2.3.3.5. Poměr signálu k šumu	24
2.3.3.6. Opakovatelnost.....	24
2.3.4. Vlastní validace.....	25
2.3.4.1. Přesnost analýzy	25
2.3.4.2. Linearita a rozsah	25
2.3.4.3. Správnost.....	26
2.3.4.4. Detekční a kvantitativní limit.....	26
2.3.4.5. Selektivita.....	26
2.3.4.6. Robustnost.....	27
2.4. Analýza léčiv v biologickém materiálu	27
2.4.1. Deproteinace	28

2.4.2. Extrakce do organických rozpouštědel	28
2.4.3. Extrakce na pevné fázi	29
2.5. Flobufen	30
2.5.1. Základní vlastnosti	30
2.5.2. Syntéza	31
2.5.3. Farmakodynamické vlastnosti	32
2.5.4. Farmakokinetické vlastnosti	32
3. Cíl práce	35
4. Experimentální část	37
4.1. Přístroje a chemikálie	38
4.1.1. Přístroje a pomůcky	38
4.1.2. Chemikálie	38
4.2. Pracovní postup	39
4.2.1. SMART systém	39
4.2.2. Stanovení flobufenu	40
4.2.2.1. Absorpční spektrum	41
4.2.2.2. Metoda v programu SMART Manager	41
4.2.2.3. Kalibrace	44
4.2.2.4. Test opakovatelnosti	44
4.2.3. Izolace flobufenu z biologického materiálu	44
5. Výsledky	46
6. Diskuse	62
7. Závěr	66
8. Použitá literatura	68

1. Úvod

HPLC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography), je významnou analytickou metodou. V posledních letech zažívá velký rozmach, našla uplatnění v řadě farmaceutických analýz, je využívána při identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty, při stabilitních studiích. HPLC je metodou používanou ve všech moderních lékopisech. Důležitou roli hraje též při analýze přírodních léčiv v rostlinném materiálu a při monitorování léčiv v tělních tekutinách.

HPLC představuje separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení a stanovení separovaných složek směsi. Mezi přednosti této metody patří rychlost analýzy, citlivost stanovení a minimální množství vzorku. Moderní chromatografické přístroje je možno též automatizovat a po vhodném nastavení parametrů jsou schopny provádět desítky analýz bez obsluhy operátora.

Při analýze léčiv nebo jejich metabolitů v biologickém materiálu je nutno nejprve vzorky upravit, aby následné stanovení bylo spolehlivé a přesné. Vzorky se zpracovávají extrakčními metodami.

Tato diplomová práce se zabývá extrakcí látek z biologického materiálu a jejich následnou HPLC analýzou.

2. Teoretická část

2.1. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody nelze použít.¹⁾

Chromatografie je založena na dělení analyzovaných látek mezi dvě fáze. Jedna fáze je nepohyblivá, stacionární, a druhá fáze je pohyblivá, mobilní. Stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi (pevná stacionární fáze se nazývá sorbent), mobilní fáze je pak vymývá (eluuje) z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Dochází tedy k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi stacionární fází a mobilní fází, která unáší separované látky. Dělení látek závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá látka je bržděna více, jiná méně. Rychlost postupu látky tedy závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na nepohyblivou fázi, tím pomaleji postupuje.^{1), 2)}

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které lze primárně rozčlenit podle charakteru mobilní fáze na plynovou chromatografii (GC), kde je mobilní fází inertní plyn, a kapalinovou chromatografii (LC), kde je mobilní fází kapalina. Dále se liší z hlediska:

- separačního procesu (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová, afinitní)
- použité techniky (chromatografie v plošném uspořádání- papírová, tenkovrstvá a v kolonovém uspořádání- sloupcová)
- způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální)
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (chromatografie kapalina- tuhá látka, kapalina- kapalina, plyn- kapalina, plyn- tuhá látka)¹⁾

2.1.1. Adsorpční chromatografie

Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu.²⁾ Metoda je založena na zadržení rozpuštěné látky povrchovou sorpcí, která závisí na rovnováze, ustavující se na rozhraní mezi částicemi nepohyblivé fáze a pohyblivé kapalné fáze, a na relativní rozpustnosti látky v kapalné fázi. Konkurence mezi molekulami rozpuštěné látky a rozpouštědla o sorpční místa na povrchu adsorbentu vytváří dynamický proces, ve kterém molekuly rozpuštěné látky i rozpouštědla nepřetržitě přecházejí do styku s povrchem, jsou přechodně zadržovány a znovu přecházejí do pohyblivé fáze.³⁾ Adsorbentem (nepohyblivá fáze) bývá nejčastěji oxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel, prášková celulóza nebo aktivní uhlí.²⁾ Adsorbenty se liší adsorpční kapacitou- množstvím látky, které je schopen sorbovat 1 gram adsorbentu, a adsorpční aktivitou- mírou schopnosti poutat chromatografovanou látku. Adsorbenty musí být nerozpustné v použitých elučních činidlech, nesmí s nimi reagovat, důležitá je chemická inertnost k děleným látkám, dále možnost kvantitativně vymýt všechny dělené látky, možnost regenerace.³⁾ V kapalinové chromatografii

se jedná o separaci pevná fáze- kapalina (LSC), v plynové chromatografii pak pevná fáze- plyn (GSC).²⁾

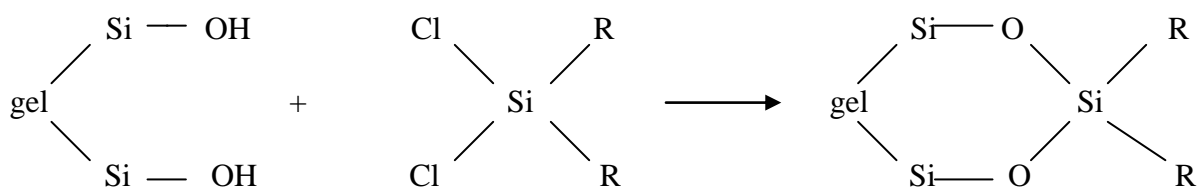
2.1.2. Rozdělovací chromatografie

V kapalinové rozdělovací chromatografii je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC). K dělení látek tedy dochází na základě jejich různých rozdělovacích koeficientů. Kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči. Nosičem nejčastěji bývá silikagel, křemelina, silikáty a celulóza. Nosič zakotvuje účinnou kapalinu na ploše nebo ve sloupci. Po vnesení roztoku dělené směsi dochází při průchodu mobilní fáze (organické rozpouštědlo nemísitelné se stacionární fází) k opakovanému rozdělování (extrakci) součástí směsi mezi obě kapalně fáze.

V plynové rozdělovací chromatografii se jedná o separaci v systému kapalina (zakotvená fáze)- plyn (GLC) a podstatou separačního procesu je rozdílná rozpustnost dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi.^{2), 1)}

Standardní uspořádání rozdělovací chromatografie představuje polární zakotvená kapalina (např. na celulóze nejčastěji voda) a nepolární eluent. Nicméně v praxi se častěji uplatňuje systém obrácených fází- reversed phase, RP, kdy organické hydrofobní (nepolární) rozpouštědlo slouží jako zakotvená fáze a mobilní fází je hydrofilní (polární) rozpouštědlo. Tento systém se v kapalinové chromatografii používá nejčastěji a je vhodný k dělení méně polárních látek.¹⁾

V HPLC se velmi osvědčily chemicky modifikované stacionární fáze. Připravují se silylací silikagelu.



Podle vázané skupiny mají chemicky modifikované fáze různou polaritu od nepolárních, vysoce hydrofóbních, používaných pro obrácený systém fází, až po polární. Příklady substituentů R mohou být tyto: přes nepolární oktadecyl $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, oktyl $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, ethyl $-\text{C}_2\text{H}_5$, až k polárnějším substituentům amino $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, cyano $-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ a diol $-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$.¹⁾

2.1.3. Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je realizovaná jen jako kapalinová chromatografie. Stacionární fáze je tvořena iontoměniči, katexy a anexy.²⁾ Částice iontoměničů obsahují trojrozměrně příčně spřažené řetězce tvořící síťovinu, v jejímž prostoru jsou četné funkční skupiny. Ionexové adsorbenty jsou svou povahou polyfunkční- obsahují více druhů funkčních skupin, nebo monofunkční- obsahující jeden typ funkčních skupin. Běžně se používají styrenové pryskyřice, akrylové a fenolické, deriváty celulózy, polydextranové a agarosové polymery, hydroxymethakrylátové gely. Katexy jsou v podstatě vysokomolekulární nerozpustné kyseliny (anionty). Dělí se na silně kyselé (SO_3H), středně kyselé ($\text{PO}(\text{OH})_2$), slabě kyselé (COOH) a velmi slabě kyselé (fenolický OH). Anexy představují vysokomolekulární nerozpustné báze (kationty). Vyrábějí se jako silně bazické (amoniová NR_3^+), slabě bazické (NH_2 , NHR , NH , NR_2) a speciální (fosfoniové, sulfoniové)³⁾ Dělit je

možné pouze elektrolyty schopné existence v iontové formě. Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů.²⁾

2.1.4. Gelová chromatografie

Jedná se kapalinovou chromatografií, při které jsou analyzované látky dělené na základě velikosti molekul. Použitá kolona je naplněna porézním materiálem- gelem (např. dextranový gel Sephadex).²⁾ Sephadex je tvořen polysacharidovým řetězcem s mnoha hydroxylovými skupinami, proto je silně hydrofilní a bobtná ve vodě. Podle účelu práce je možno používat různé druhy gelů, které se od sebe liší svými vlastnostmi. Jednou z důležitých charakteristik daného druhu gelu je stupeň bobtnání. Gely, u nichž vlastní matrix představuje menší složku (tyto gely hodně bobtnají), se používají pro dělení látek o vysoké molekulové hmotnosti, kdežto hustší (méně bobtnající) gely slouží k separaci nízkomolekulárních látek. Velikost pórů v nabobtnalých gelových částicích je pro daný druh gelu typická a určuje jeho dělicí vlastnosti.⁴⁾ Molekuly látky, které jsou nesený protékající mobilní fází, pronikají do pórů gelu. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, větší molekuly jen do větších pórů a velké molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí z kolony bez zadržení. Rychlost eluce je tedy podmíněna velikostí molekul, resp. molekulovou hmotností a je závislá na rozmezí velikosti pórů daného gelu.²⁾

2.1.5. Frontální chromatografie

Frontální chromatografie spočívá na kontinuálním přívodu roztoku vzorku na chromatografickou kolonu. Jednotlivé složky směsi jsou zachycovány adsorbentem až do vytvoření rovnováhy. K výstupu látky dochází v okamžiku, kdy je kolona danou látkou nasycena. První vychází látka o nejnižší distribuční konstantě.³⁾

2.1.6. Vytěšňovací chromatografie

Při této metodě s preparativním cílem, která má nejširší uplatnění v separaci směsí látek, se používá jednorázového dávkování vzorku. Jednotlivé složky jsou na počátku chromatografického lože poutány adsorbentem různou silou. Potom se aplikuje eluční činidlo, které obsahuje látku sorbující se na adsorbent silněji než kterákoli ze složek směsi. Nejméně sorbovaná složka směsi je vytěšněna přiváděným vytěšňovacím činidlem. Zóny migrují těsně za sebou, až nakonec opouštějí lože v pořadí narůstající adsorbovatelnosti.³⁾

2.1.7. Eluční chromatografie

Eluční chromatografie je založena na vymývání látek inertním kapalným nosným médiem, resp. inertním nosným plynem. Analyzovaný vzorek je jednorázově vnesen na začátek chromatografického lože. Při promývání se jednotlivé složky směsi pohybují chromatografickým systémem rychlostí, která je určena zejména jejich distribučními konstantami.³⁾

2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie- high performance liquid chromatography, HPLC, je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv, a proto je využívána ve všech moderních lékopisných monografiích. Vývoj této chromatografické metody začal v sedmdesátých letech, rychlý rozvoj byl umožněn nalezením vhodných vysoce účinných stacionárních fází a citlivých detektorů. Dnes představuje základní analytickou metodu pro tepelně nestálé nebo netěkavé látky, což je většina léčiv. Je to separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Z jednoho nástřiku analyzovaného vzorku léčiva lze určit totožnost, stanovit obsah a zjistit přítomnost případných nečistot. HPLC je výhodné použít při analýze složených lékových přípravků.^{1), 2)}

Hlavní přednosti HPLC spočívají v rychlosti analýzy, citlivosti stanovení při minimálním množství vzorku. Další výhodou představuje možnost automatizace, nejmodernější chromatografy jsou vybavené automatickými dávkovači a po vhodném nastavení parametrů jsou schopné provádět desítky analýz bez obsluhy operátora.²⁾

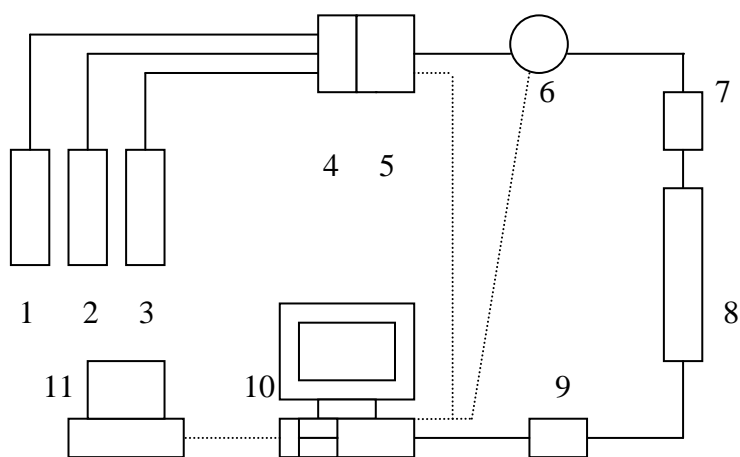
Mezi nejdůležitější oblasti využití HPLC v analýze léčiv patří:

- a) kontrola- identifikace léčiv, stanovení obsahu a čistoty
- b) stabilitní studie- HPLC kvalitativně i kvantitativně hodnotí rozkladný proces a vznikající rozkladné produkty
- c) analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu
- d) monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách- nejčastěji v krevní plazmě, séru a moči.²⁾

2.2.1. Příklad

Chromatograf pro HPLC je tvořen zásobníky mobilní fáze a vysokotlakým čerpadlem, které čerpá mobilní fázi a umožňuje konstantní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1- 10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 MPa.(viz. obr.) Následuje programovací jednotka, na níž se nastavuje požadované složení mobilní fáze. Dále navazuje dávkovací zařízení, sloužící k nástřiku vzorku na kolonu. Poté postupuje vzorek na předkolonu a kolonu, kde dojde k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru. Signály z detektoru jsou přenášeny do počítače, který je zpracuje a umožní vytisknout na tiskárně. Zároveň řídí celý chromatografický proces.²⁾

Obr.: Blokové schéma kapalinového chromatografu^{1), 2)}



1,2,3- zásobníky mobilní fáze, 4- vysokotlaké čerpadlo, 5- programovací jednotka, 6- dávkovací zařízení, 7- předkolona, 8- kolona, 9- detektor, 10- počítač, 11- tiskárna
Plnou čarou je znázorněn tok mobilní fáze, přerušovanou čarou elektrický signál.

2.2.1.1. Čerpací systémy

Čerpací systémy jsou potřebné pro přivádění mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí. Kolísání tlaku má být co nejmenší, čehož se dosahuje např. průchodem tlakovaného rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. Hadičky a všechny spoje musí být schopny odolat tlaku vyvinutému čerpacím systémem. Čerpací systémy mohou být vybaveny zařízením pro odstranění uvolněných bublin vzduchu.

Systémy ovládané mikroprocesory jsou schopny přesně přivádět mobilní fázi buď s konstantním složením (izokratická eluce), nebo se složením, které se mění podle předem daného programu (gradientová eluce). V případě gradientové eluce se používají čerpací systémy, které dodávají rozpouštědla z více zásobníků a mísení rozpouštědel se dosahuje buď před natlakováním, nebo v tlakové části čerpadla.⁵⁾

2.2.1.2. Dávkovací zařízení

Roztok vzorku se dávkuje do protékající mobilní fáze na horní konec kolony nebo blízko něj pomocí dávkovacího zařízení, které je schopno pracovat při vysokém tlaku. Používají se zařízení s dávkovací smyčkou o konstantním nebo proměnném objemu pro ruční nebo automatické dávkovače. Ruční dávkování s částečně naplněnou smyčkou může způsobit horší přesnost nastříkovaného objemu.⁵⁾

2.2.1.3. Mobilní fáze

V chromatografii s normálními fázemi se používají méně polární rozpouštědla. Aby se dosáhlo reprodukovatelných výsledků, je nutné přísně kontrolovat přítomnost vody v mobilní fázi. V chromatografii s obrácenými fázemi se používají vodné mobilní fáze, jak s organickým rozpouštědlem, tak bez něj.⁵⁾

Při HPLC analýze se často používá jako eluent mobilní fáze, jejíž složení se během chromatografie nemění. Tato eluce se poté nazývá izokratická. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zvláště, jestliže se jednotlivé složky směsi významně liší svými elučními parametry. Pak je na místě použít gradientovou eluci, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává druhá mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak koncentrační gradient. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH.¹⁾

Složky mobilní fáze se obvykle filtrují, aby z nich byly odstraněny částice větší než 0,45 μm . Vícesložkové mobilní fáze se připravují odměřením požadovaných objemů a jejich smícháním. Jinou možností je přivádět rozpouštědla pomocí jednotlivých čerpadel ovládaných ventily, které umožňují míchání složek v požadovaném poměru. Rozpouštědla jsou před čerpáním do systému odplynována probubláváním heliem nebo se používají membránová či vakuová zařízení zařazená přímo do systému, která zabraňují tvorbě bublin v cele detektoru. Rozpouštědla mají mít vhodnou kvalitu, hlavně musí být propustná pro vlnovou délku používanou při detekci v UV oblasti spektra.⁵⁾

2.2.1.4. Kolony

Kolony pro HPLC jsou ocelové nebo skleněné trubice, jsou nejčastěji dlouhé 10- 25 cm o vnitřním průměru 3- 5 mm. Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. Pro většinu HPLC analýz se používají nemodifikované nebo chemicky modifikované mikročástice silikagelu (velikosti 3, 5 nebo 10 μm) nebo oxid hlinitý. Silikagel a oxid hlinitý představují polární sorbenty. Více se uplatňují chemicky modifikované stacionární fáze, kdy jsou na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrněk vhodnou reakcí (silylací) zavedeny různé radikály.^{1),2)} Takto získané stacionární fáze mohou být nepolární- radikálem bývá

uhlovodíkový řetězec oktadecyl: $-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ (C_{18}), či oktyl: $-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$ (C_8). V tomto případě se jedná o obrácený systém fází (reversed phase). Nebo mohou být středně polární-fenyl: $-(\text{CH}_2)_n\text{-C}_6\text{H}_5$ (C_6H_5), kyanpropyl: $-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$ (CN), aminopropyl: $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ (NH_2). Nejvíce polární modifikovaná báze se získá zavedením diolu: $-(\text{CH}_2)_3\text{-OCH(OH)-CH}_2\text{-OH}$.⁵⁾

Pro dělení látek iontového charakteru (iontovýměnná chromatografie) jsou určeny sorbenty s vlastnostmi iontoměničů- stacionární fáze se modifikuje zaváděním různých substituentů, které mají vlastnosti anexů nebo katexů. V současné době je zvláštní pozornost věnována též chirálním stacionárním fázím, které umožňují analýzu enantiomerů léčiv.²⁾

K parametrům stacionárních fází patří velikost částic a jejich tvar, porozita a specifický povrch. V případě obrácených fází jsou doplňujícími charakteristikami stacionární fáze její druh, stupeň navázání vyjádřený např. jako obsah vázaného uhlíku, údaj o případném odstranění povrchových silanolových skupin. Jestliže stacionární fáze obsahuje zbytkové povrchové silanolové skupiny, mohou analyzované látky, zejména bazické, vykazovat chvostování píků.⁵⁾

Kolony pro chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0- 8,0. Většina separací se provádí při pokojové teplotě, ale kolony mohou být také zahřívány na vyšší teplotu pro dosažení vyšší účinnosti. Doporučuje se, aby kolony nebyly zahřívány na teplotu vyšší než 60°C, vzhledem k nebezpečí degradace stacionární fáze.⁵⁾

2.2.2. Detektory

Výsledná analýza je značně závislá na použitém detektoru. Proto jsou na detektory kladeny mimořádné požadavky. Především je to vysoká citlivost, detektor musí detekovat

látky ve stopových množstvích (ng- $\mu\text{g/ml}$), dále reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a v neposlední řadě univerzálnost nutnou pro detekci všech oddělených složek vzorku.¹⁾

Nejčastěji používané detektory v HPLC jsou spektrofotometrické, dále nalézají uplatnění fluorimetrické, elektrochemické a refraktometrické detektory. Vysoce selektivní a citlivou analýzu představuje spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC- MS).

2.2.2.1. Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory registrují absorpční eluátu protékajícího celou detektoru. K detekci se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná. Jednodušší detektory umožňují měřit pouze při daných vlnových délkách, nejčastěji 254 a 280 nm, dokonalejší UV- VIS detektory jsou nastavitelné na libovolnou vlnovou délku v oblasti 200- 800 nm. Nejvíce informací poskytne spektrofotometr s diodovým polem (diode array), který je řízen počítačem, snímá celé absorpční spektrum a porovnává poměry absorpčních. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase.

Tyto detektory jsou značně citlivé (10^{-9} - 10^{-10} g/ml), je možné je použít při gradientové eluci, proto bývají nejčastěji součástí HPLC chromatografů.^{1), 2)}

2.2.2.2. Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory se dají využít v případě, kdy analyzovaná látka vykazuje fluorescenci. Látky nefluoreskující lze někdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou tedy méně univerzální, zato jsou více citlivé (10^{-9} - 10^{-12} g/ml). Též jsou použitelné při gradientové eluci.²⁾

2.2.2.3. Elektrochemické detektory

Tyto detektory lze využít při analýze látek, které vykazují redoxní vlastnosti (jsou schopny se redukovat, či oxidovat). Za použití elektrod se měří elektrochemická veličina, charakterizující reakci, která probíhá na rozhraní: elektroda- eluent. Hodnota veličiny je závislá na koncentraci analyzované látky. Využívají se voltamperické, amperometrické a polarografické detektory. Detektory jsou citlivé, ale nelze je užít při gradientové eluci.

2.2.2.4. Refraktometrické detektory

Tento typ detektoru proměřuje index lomu a zaznamenává rozdíl mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony. Detektory jsou sice univerzální, ale málo citlivé (10^{-6} g/ml). Další nevýhodou oproti ostatním detektorům je nutnost termostátování, protože odezva detektoru je závislá na teplotě. Také nejsou vhodné pro gradientovou eluci.^{1), 2)}

2.3. Chromatografické charakteristiky

2.3.1. Chromatogram

Chromatogram představuje grafický záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii.⁵⁾

Pík může být definován plochou píku (A) nebo výškou píku (h) a šířkou píku v poloviční výšce (w_h) nebo výškou píku a šířkou píku mezi body inflexe (w_i).⁵⁾

2.3.2. Retenční data

2.3.2.1. Retenční čas a objem

Měření retence v eluční chromatografii může být vyjádřeno retenčním časem (t_R) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. Z retenčního času může být vypočítán retenční objem (V_R) podle vzorce: $V_R = t_R v$, v němž značí t_R - retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce, v - průtoková rychlost mobilní fáze.⁵⁾

V planární (papírové a tenkovrstvé) chromatografii slouží k identifikaci chromatografovaných látek retenční faktor R_f :¹⁾

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost, které dosáhla rozpuštěná látka od startu (střed skvrny)}}{\text{vzdálenost dosažená čelem pohyblivé fáze od startu}} \quad 3)$$

2.3.2.2. Distribuční konstanta

Koncentrace látky koexistující v obou fázích je dána distribuční konstantou K_D :

$$K_D = \frac{A_S}{A_M} \quad A_S \text{ molární koncentrace látky A ve stacionární fázi}$$
$$A_m \text{ molární koncentrace látky A v mobilní fázi} \quad 3)$$

2.3.2.3. Hmotnostní distribuční poměr D_m

Je též známý jako kapacitní faktor k . Kapacitní faktor je měřítkem interakce látky se stacionární fází a je pro určitou látku v daném separačním systému konstantní.³⁾

$$D_m = \frac{\text{množství látky ve stacionární fázi}}{\text{množství látky v mobilní fázi}} = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

K_D distribuční konstanta

V_S objem stacionární fáze

V_M objem mobilní fáze ⁵⁾

Hmotnostní distribuční poměr složky může být určen z chromatogramu použitím

vzorce:
$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R retenční čas

t_M mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce. ⁵⁾

2.3.3. Test způsobilosti a validace

Součástí všech chromatografických metod musí být test způsobilosti chromatografického systému. Analytické metody musí být vhodné, přesné a spolehlivé pro daný účel. Vhodnost, přesnost a spolehlivost musí být experimentálně ověřena a doložena a tento proces se nazývá validace analytické metody. Nejprve se vyvine metoda, najdou se optimální podmínky a provede se validace, tj. pomocí experimentálních dat se prokáže, že je metoda vhodná pro daný účel, že splňuje na začátku definované požadavky. Současně je nutné přesně definovat podmínky, za kterých se má metoda použít, musí být takové, aby byla zajištěna účinnost a separační schopnost konkrétního chromatografického systému. Aby bylo možné snadno, rychle a s jistotou nalézt vhodné podmínky, musí být součástí chromatografické metody test způsobilosti, který se provádí při každé změně chromatografického systému, před každou novou sérií měření nebo před použitím metody v jiné laboratoři. ⁶⁾

Dvěma základními údaji testu způsobilosti jsou požadavky na reprodukovatelnost chromatografického systému a na rozlišení dvou vybraných píků. ⁶⁾ Mezi další používané parametry patří: faktor symetrie, kapacitní faktor, počet teoretických pater, relativní retence, mez detekce píku- poměr signálu k šumu. ⁵⁾

2.3.3.1. Faktor symetrie

Ve vzdálenosti 5% výšky píku se vede rovnoběžka se základní linií. Úsečka $w_{0,05}$, která vznikne protnutím ramen píku je rozdělena kolmicí spuštěnou z vrcholu na dvě části. Menší část se označí d a faktor symetrie A_S (nebo faktor chvostování píku) se vypočte dle vzorce:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (5), 7)$$

Pro symetrický pík je $A_S = 1$ a tato hodnota se zvětšuje s rostoucí asymetrií. Požadavek je $A_S < 1,2$ ⁷⁾

2.3.3.2. Rozlišení

Rozlišení R_S mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, se vypočítá ze vzorce:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{h_1} + w_{h_2}}, \text{ kde } t_{R_2} > t_{R_1}$$

t_R retenční čas

w_{h_1}, w_{h_2} šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. ⁵⁾

2.3.3.3. Počet teoretických pater

Zdánlivý počet teoretických pater (N) vyjadřuje účinnost kolony. Použije se následující vzorec, v němž hodnoty t_R a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách:

$$N = 5,54 \left(t_R / w_h \right)^2$$

t_R retenční čas

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem. ⁵⁾

2.3.3.4. Relativní retence

Relativní retence se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M}$$

t_{R_2} retenční čas sledovaného píku

t_{R_1} retenční čas referenčního píku

t_M mrtvý čas: čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce. ⁵⁾

2.3.3.5. Poměr signálu k šumu

Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}, \text{ v němž značí}$$

H výšku píku

h rozpětí šumu pozadí chromatogramu získaného při slepé zkoušce ⁵⁾

2.3.3.6. Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky (RSD_%) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum (y_i - y)^2}{n - 1}}, \text{ v němž značí}$$

y_i jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku

y průměr jednotlivých hodnot

n počet jednotlivých hodnot

Maximální dovolená relativní standardní odchylka (RSD_{max}) je uvedena v ČL 2002 v závislosti na počtu jednotlivých nástřiků. ⁵⁾

2.3.4. Vlastní validace

Obecně analytické parametry, ověřované při validaci metod, jsou:

- přesnost (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- linearita, rozsah
- správnost
- detekční a kvantitativní limit
- selektivita
- robustnost ⁶⁾

2.3.4.1. Přesnost analýzy

Tento test hodnotí míru shody mezi jednotlivými výsledky měření. Má dvě složky:

- opakovatelnost, kdy se opakovaně měří stejný vzorek jedním pracovníkem na stejném zařízení
- reprodukovatelnost, kdy se stejný vzorek analyzuje různými pracovníky na různých zařízeních v různých laboratořích

Na základě měření se vypočítá relativní směrodatná odchylka (viz. výše). Požadavek pro HPLC je relativní směrodatná odchylka < 1% pro hlavní látku a < 5% pro vedlejší látky. ⁷⁾

2.3.4.2. Linearita a rozsah

Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Linearita analytické metody se doloží buď graficky, jako závislost výsledků

na koncentraci, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační faktor, který je mírou linearity, a směrnice.

Dalším parametrem je rozsah. To je interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky, v němž je látka stanovena s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace. Tento rozsah se experimentálně ověřuje- pro hodnoty extrémní i uvnitř intervalu. ⁶⁾

2.3.4.3. Správnost

Tato zkouška udává odchylku výsledku metody C_i od správné hodnoty C_0 . Problémem je zjištění správné hodnoty. Správnou hodnotou může být skutečný známý obsah látky, nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena, nebo analýzou vzorku s přidavkem standardní látky. Statisticky se správnost testuje pomocí výtěžnosti (R), která se vypočítá podle vzorce:

$$R = \frac{100C_i}{C_o} (\%)^{6), 7)}$$

2.3.4.4. Detekční a kvantitativní limit

Detekční limit je parametr pro limitní testy. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. Kvantitativní limit má využití při kvantitativním stanovení obsahu nečistot. Představuje nejnižší koncentraci látky, stanovitelnou s přijatelnou přesností a správností. ⁶⁾

2.3.4.5. Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody kvantitativně stanovit analyt v přítomnosti možných vedlejších látek. Přesnost stanovení analyzované látky nesmí být ovlivněna

přítomností látek vedlejších (výchozích látek, nečistot, rozkladných produktů, látek pomocných, zbytkových rozpouštědel).⁷⁾ Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidávanými rozkladnými produkty, nečistotami atd.⁶⁾

2.3.4.6. Robustnost

Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek.⁷⁾ Je to vlastně míra reprodukovatelnosti výsledků získaných analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Robustnost tedy znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky.⁶⁾

2.4. *Analýza léčiv v biologickém materiálu*

Analýza léčiv v biologickém materiálu představuje v současnosti nejdynamičtěji se rozvíjející směr. Jedná se o monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách – v krevní plazmě, séru a moči. Monitorování se využívá při farmakokinetických studiích, metabolických studiích, při řízené terapii, v toxikologii, při bioekvivalenčních studiích.²⁾

Před vlastní HPLC analýzou je zpravidla nutné izolovat léčivo a jeho metabolity z analyzované tělní tekutiny. Cílem úprav biologických vzorků je odstranit endogenní látky rušící vlastní stanovení, aby analýza hodnocené látky byla co nejpřesnější.⁸⁾ Používá se deproteinace, extrakce do organického rozpouštědla a extrakce na pevné fázi.

2.4.1. Deproteinace

Deproteinace slouží k odstranění bílkovin ve vzorku. Neodstraněné bílkoviny by mohly zanést kolonu chromatografu. Odstranění bílkovin je možné provést precipitací, ultrafiltrací a enzymovou deproteinací.

Při precipitaci se ke vzorku přidá deproteinační činidlo- soli těžkých kovů (ZnSO_4 , CuSO_4), silné kyseliny (HCl , trichloroctová) nebo organická rozpouštědla (methanol, aceton). Nevýhodou je nebezpečí vazby analyzované látky na precipitát, který se poté odstraňuje pomocí centrifugy.

Při ultrafiltraci se používá semipermeabilní membrána o určité velikosti pórů, kterými projde frakce léčiva nevázaná na bílkoviny, zatímco vysokomolekulární proteiny a léčiva na ně navázaná jsou odděleny.

Při enzymové deproteinaci se používají proteolytické enzymy (pepsin, trypsin).⁸⁾

2.4.2. Extrakce do organických rozpouštědel

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid- liquid extraction, LLE) je separační metoda založená na přenosu látky z jedné kapalně fáze do druhé kapalně fáze. Obě kapalně fáze jsou přitom vzájemně nemísitelné. Tato jednoduchá extrakce se též označuje jako vytřepávání: stanovovaná složka se převádí z vodné polární fáze do druhé nepolární fáze- organického rozpouštědla. Pro hodnocení extrakčního dělení má význam rozdělovací poměr D - poměr celkových analytických koncentrací dané látky rozdělené mezi obě fáze:

$$D = \frac{c(A)_{org}}{c(A)_{vod}}$$

Výtěžek extrakce lze zvýšit zvětšením objemu organické fáze nebo lépe opakovanými extrakcemi menšími objemy organického rozpouštědla. Přitom platí, že pro účinnou extrakci slabé kyseliny z vodného roztoku do málo polárního rozpouštědla je nutné disociaci kyseliny potlačit okyselením vodné fáze.¹⁾ Proto léčiva typu kyselin se extrahují z krevního séra po úpravě na pH 2- 6 fosfátovým nebo acetátovým tlumivým roztokem.⁹⁾ Slabé zásady se dobře extrahují z alkalizovaných vodných roztoků, kde je jejich ionizace potlačena. Proto při extrakci bazických léčiv se např. krevní sérum nejdříve zalkalizuje přidávkem hydroxidu.¹⁾

Vlastní postup je takový, že se vzorek napipetuje do centrifugační zkumavky, přidá se dané množství organického rozpouštědla, např. aceton, dichlormethan, chloroform- experimentálně se vybírá rozpouštědlo, které má pro dané léčivo nejlepší extrakční schopnosti.⁹⁾ Směs se ve zkumavce 5 minut protřepává, následuje 5 minut centrifugace, kdy se od sebe oddělí organická a vodná fáze. Supernatant (organická fáze) se separuje a zahustí se na menší objem nebo se odpaří do sucha mírným proudem dusíku. Tento zbytek se rozpustí v mobilní fázi a část se nastříkuje do HPLC kolony.^{10), 11)}

2.4.3. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) je metoda pro rychlou přípravu vzorků. Používá se pro zakoncentrování a vyčištění hodnoceného vzorku před vlastní analýzou. SPE se realizuje pomocí kolonek naplněných sorbentem- pevnou stacionární fází. Sorbenty se liší chemickým složením (modifikovaný silikagel, polymerní sorbenty), velikostí částic a velikostí pórů. Výběr optimálního sorbentu pro danou extrakci závisí na vlastnostech hodnocené látky a na extrakční účinnosti sorbentu. Cílem SPE je, aby sorbent vázal a zadržel analyzovanou látku bez jakýchkoliv nečistot, které jsou naopak vyplaveny. Mechanismus SPE

je totožný s principem kapalinové chromatografie (stacionární fáze, mobilní fáze, retence a eluce). Nicméně při SPE je analyt plně zadržen na kolonce.¹²⁾

Před vlastní analýzou se kolonka nejprve promyje methanolem, vodou, někdy i pufrem, aby se odstranil vzduch v náplni kolonky. Poté se nanese vzorek ve vhodném rozpouštědle a analyzovaná látka se sorbuje. Následuje promývání kolonky, které má za cíl odstranit balasty (vodou, pufrem). Po vymytí nečistot se kolonka vysuší ve vakuu. Dalším krokem je vyplavení zadržené látky vhodným elučním rozpouštědlem (dichlormethan). Získaný eluát se odpaří do sucha proudem dusíku, odparek se rozpustí v mobilní fázi a je připraven k nástřiku na HPLC kolonu.^{8), 9), 13)}

2.5. Flobufen

Flobufen je potenciální léčivo objevené Výzkumným ústavem pro farmacii a biochemii (VÚFB) v České republice. Patří do skupiny nesteroidních antiflogistik. Má kombinovaný inhibiční účinek na lipooxygenázu a cyklooxygenázu, prodloužený protizánětlivý a antiartritický efekt.¹⁴⁾

2.5.1. Základní vlastnosti

Strukturní vzorec:

15)

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄F₂O₃

Chemický název: 4- (2',4'- difluorbifenyl- 4-yl) -4- oxo-2- methylbutanová kyselina¹⁶⁾

Molekulová hmotnost: 304,2

Teplota varu: 160- 161°C

Rozpustnost: rozpustné v alkoholech, etheru a dimethylsulfoxidu, ve vodě rozpustné za alkalických podmínek (pH > 8,5)

pK: 6,52

Vzhled: bílé krystaly

Formulace: tobolky s 10 nebo 25 mg flobufenu

Flobufen existuje ve dvou optických izomerech.¹⁴⁾

2.5.2. Syntéza

Flobufen byl objeven použitím QSAR analýzy. Byl objeven optimalizací molekuly fenbufenu (4-(4-bifenylyl)-4-oxobutanová kyselina) zavedením substituentů fluoru na fenyl a zavedením methylu. Získaný 2,4- difluoro analog vykazuje zvýšenou lipofilitu, prodloužený účinek a signifikantní protizánětlivou aktivitu až 48 hodin. Flobufen se připravuje Friedel-Craftsovou acylací 2,4- difluorbifenyly s anhydridem kyseliny methyljantarové. Bifenyl se připravuje Gombergovou reakcí benzenu s diazoniovou solí odvozenou od 2,4- difluoranilinu. Anhydrid kyseliny methyljantarové se připravuje kondenzací ethylesteru kyseliny 2-bromopropionové s ethylesterem kyseliny kyanoctové.^{17),18)}

2.5.3. Farmakodynamické vlastnosti

Flobufen má protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti. Inhibuje cyklooxygenázu a 5-lipoxygenázu.¹⁴⁾ Působí též antagonisticky na LTB₄ receptorech.¹⁹⁾ Snižuje produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6) a potlačuje buněčnou imunitu.¹⁴⁾ Při pokusech na potkanech (karagenanové injekce do tlapky) bylo demonstrováno, že flobufen při akutním zánětu redukuje edémy a hyperémie, snižuje tvorbu exsudátu a potlačuje migraci imunokompetentních buněk do místa zánětu. V porovnání s fenbufenem má delší působení, redukuje edém ještě 48 hodin po indukci zánětu. Flobufen byl tedy navržen k léčbě artritidy. Zároveň se zkouší jeho imunomodulační vlastnosti.¹⁷⁾

Ukazuje se, že ve srovnání s klasickými nesteroidními antiflogistiky, vykazuje flobufen velmi dobrou gastrickou snášenlivost.¹⁴⁾ Při hodnocení ulcerózního poškození žaludku v bodech 0-4, získal flobufen skóre 0,5, v porovnání s indometacinem: 2,8.¹⁷⁾ Nižší gastrotoxicita se vysvětluje buďto kombinovaným inhibičním účinkem na prostaglandiny i leukotrieny, kdy se vytváří rovnováha mezi protektivními prostaglandiny a proulcerózními leukotrieny.¹⁴⁾ Nebo je gastrická snášenlivost vysvětlována faktem, že je flobufen proléčivo. Tomu odpovídá též, že in vitro vykazuje velmi slabou inhibiční aktivitu na cyklooxygenázu.¹⁷⁾

2.5.4. Farmakokinetické vlastnosti

Flobufen je rychle absorbován z gastrointestinálního traktu.¹⁴⁾ Účinek flobufenu je zprostředkován aktivním metabolitem 2'4'-difluorbifenyl-4-yl octová kyselina:¹⁸⁾

Aktivní metabolit vzniká redukcí 4- keto skupiny na alkoholovou a následnou eliminací a oxidací na octovou kyselinu.^{15), 17)} Transformace flobufenu je téměř úplná. V moči byl identifikován hlavní metabolit a mnoho dalších metabolitů, přičemž množství nemetabolizovaného flobufenu bylo zanedbatelné.¹⁸⁾ Flobufen má odlišný metabolický profil od strukturně příbuzného fenbufenu, který se postupně transformuje až na 2',4'-dihydroxybifenyl-4-yl octovou kyselinu. Metabolit flobufenu se tímto způsobem transformovat nemůže, protože rozhodující polohy jsou substituovány fluorem. Z toho vyplývá, že je vylučován hlavně v nezměněné podobě s velmi dlouhým poločasem.¹⁸⁾ Biologický poločas je u zdravých dobrovolníků kolem 15 hodin. Biologický poločas hlavního metabolitu je výrazně delší (okolo 50 hodin). Biologický poločas flobufenu a jeho metabolitů u pacientů během opakovaného podávání se ukázal delší- okolo 40- 160 hodin.¹⁴⁾ Biodistribuce je podobná jako u jiných nesteroidních antiflogistik. Má silnou vazbu na bílkoviny plazmy, a proto je přítomen ve vysoce prokrvených tkáních (plazma, ledviny, játra, zažívací trakt). Navíc byly nalezeny vyšší koncentrace v zánětlivých ložiscích a pojivových tkáních.¹⁸⁾

Z výsledků speciálních toxikologických testů vyplývá, že flobufen neindukuje genovou mutaci a morfologickou transformaci buněk in vitro. Ani podání nejméně 100krát

větší jednotlivé dávky, než je předpokládaná terapeutická dávka, nezavinilo žádné toxické nebo genotoxické účinky.¹⁴⁾

Flobufen se nyní nachází v 3. fázi klinických studií. Studie se odehrává v patnácti centrech s 300 pacienty. Flobufen jakožto nové antirevmatické a antiartritické léčivo vykazuje tyto přednosti: dlouhotrvající účinek při podávání jedenkrát denně, vysoká gastrická snášenlivost a nižší výskyt nežádoucích účinků (nejčastěji dyspepsie), nový mechanismus účinku: kromě inhibice cyklooxygenázy, též inhibice 5- lipooxygenázy.^{14), 19)}

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Seznámit se s chodem práce HPLC systému SMART
- Seznámit se s pracovními návyky, podmínkami práce, údržbou
- Změřit absorpční spektrum flobufenu
- Nalézt vhodné podmínky pro stanovení flobufenu HPLC analýzou
- Sestavit kalibrační křivku
- Provést test opakovatelnosti
- Izolovat flobufen z potkaní plazmy pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny
- Izolovat flobufen z lidské moči pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny
- Zhodnocení

4. Experimentální část

4.1. Přístroje a chemikálie

4.1.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy: Santorius analytic

Centrifuga: Janetzki T 24

Filtr: MILLEX®- GP, 0,22 µm Filter Unit, MILLIPORE, Bedford

Hamiltonova stříkačka, 20 µl

HPLC SMART systém, Amersham Biosciences

Injekční stříkačky: B. Braun Meisungen AG

Kádinky

pH- metr: PerpHecT log R meter, model 350

Ultrazvuková lázeň: Bandelin SONOREX RK 31

UV- VIS spektrofotometr: HP 8453

Váhy: Kern 440- 33

Vakuum: Vacc- space 20

Vařič

Zkumavky se zábrusem, 10 ml

4.1.2. Chemikálie

Acetonitril Prepsolv® for preparatic chromatography, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Dichlormethan p.a., Lach- Ner, s.r.o., Neratovice

Dichlormethan 99,6% A.C.S. spectrophotometric grade, Sigma- Aldrich Chemie GmbH

Dimethylsulfoxid Sigma®, Sigma- Aldrich Chemie GmbH

Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Lachema a.s., Neratovice

Methanol Riedel- de Haën®

CHROMASOL V® for HPLC, Sigma- Aldrich, Laborchemikalien GmbH

Octan sodný krystalický, Lachema n.p. Brno, závod Neratovice

Racemický flobufen, FaF UK Hradec Králové

4.2. Pracovní postup

4.2.1. SMART systém

SMART systém představuje vysokoúčinný kapalinový chromatograf, vhodný ke stanovení látek v minimálním množství. Skládá se z vlastního chromatografu a počítače, jehož prostřednictvím se řídí obsluha chromatografu, zadávají se podmínky, vyhodnocují se naměřená data.

Čerpací systém je řízen počítačem, který umožňuje nastavit průtok mobilní fáze v rozsahu 10- 2000 μ l a rovněž umožňuje gradientovou eluci. Maximální konstrukční tlak systému je 25 MPa, skutečně použitelný maximální tlak je ale omezen konstrukčním tlakem kolony.

Pro analýzu byla používána kolona μ RPC C2/C18, PC 3.2/3 (Amersham Biosciences), pro níž činí maximální tlak 15 MPa. Náplň této kolony je tvořena chemicky modifikovaným

silikagelem s vázanými oktadecylovými a ethylovými řetězci. Předkolona je tvořena titanovou fritou s velikostí pórů 0,22 μm .

Dávkování je prováděno pomocí automatického dávkovače, jehož součástí je dávkovací smyčka o objemu 10 μl . Nastříkuje se Hamiltonovou stříkačkou o objemu 20 μl .

Detekce je zajištěna spektrofotometrickým detektorem. Zdrojem záření je xenonová lampa s rozsahem vlnových délek 190- 600 nm.

Chod SMART systému je zajištěn programem SMART Manager. Tento program řídí všechny prováděné operace a také vyhodnocování získaných záznamů. Díky SMART Manageru je možno si předem naprogramovat separační metodu, kterou bude analýza probíhat. Zadává se rychlost průtoku mobilní fáze, složení mobilní fáze a gradient, vlnová délka pro detekci, čas nástřiku a celková doba eluce aj. Ve SMART Manageru lze tyto parametry zadávat ve formě grafu, nebo pomocí písemných příkazů.

4.2.2. Stanovení flobufenu

Flobufen, potenciální léčivo ze skupiny nesteroidních antiflogistik, je jako ostatní látky této skupiny kyselinou. Zároveň se jedná o látku lipofilní. Jako metoda pro stanovení flobufenu byla zvolena chromatografie na reverzních fázích. V tomto případě kolona obsahovala nepolární stacionární fázi tvořenou modifikovaným silikagelem- s uhlovodíkovými řetězci C_{18} a C_2 .

Prvním úkolem bylo připravit si roztok flobufenu. Flobufen se rozpouštěl ve vodě, která však musela být zalkalizována přidavkem NaOH. Výhodnější se ukázalo rozpouštění přímo v methanolu. S výhodou jsem použila ultrazvukovou lázeň (5 minut), která rozpouštění urychlila.

Jako mobilní fáze byla použita soustava methanol- voda. Vyzkoušela jsem metodu s izokratickou elucí, kdy se nemění složení rozpouštědla, i s gradientovou elucí, kdy se předem naprogramuje procentuální zastoupení rozpouštědel A a B a jejich změny ve složení v průběhu eluce. Rozpouštědlo A obsahovalo 10% methanol, rozpouštědlo B 90% methanol. Rozpouštědla jsem připravila smísením vody a methanolu v daném poměru, následovala nutná filtrace přes membránový filtr za pomoci vakua. Filtrace slouží k zabránění možnosti vnesení nečistot do kolony a tím brání jejímu ucpaní.

4.2.2.1. Absorpční spektrum

Před vlastní analýzou muselo být změřeno absorpční spektrum flobufenu, aby se do SMART systému mohla zadat správná vlnová délka, při které má probíhat detekce. Spektrum bylo změřeno na UV- VIS spektrofotometru. Použila jsem methanolickeý roztok flobufenu o koncentraci 10 µg/ml. Roztok byl připraven rozpuštěním 10 mg flobufenu v 10 ml methanolu. Z tohoto výchozího roztoku jsem pipetovala 10 µl a naředila methanolem na 1 ml. Absorpční maxima byla naměřena při vlnové délce 203 a 280 nm. Pro detekci UV detektorem byla vybrána jako prioritní vlnová délka 280 nm. (viz. graf č. 1)

4.2.2.2. Metoda v programu SMART Manager

Parametry analýzy je možné nastavit předem v programu SMART Manager a poté přístroj pracuje takřka automaticky, nebo lze nastavit jen část parametrů (např. rychlost průtoku mobilní fáze, složení mobilní fáze, změny složení v čase- gradient, dobu celkového měření) a další v průběhu chodu libovolně ručně doplňovat (kalibrace vlnové délky, autozero, nástřik, pozice Load).

Před zahájením měření musí být nastavena daná vlnová délka a následně provedena její kalibrace. Metoda se spouští příkazem Run. Je vhodné použít příkaz Autozero, kdy se hodnoty před vlastním měřením vynulují. Poté se Hamiltonovou stříkačkou (objem 20 μ l) nastříkne vzorek do dávkovací smyčky. V programu se navolí příkaz Inject a dojde k nástřiku na kolonu. Po určité době se poloha dávkovacího ventilu přepne opět do výchozí polohy Load. Tento čas by měl být u jednotlivých nástřiků shodný (např. 1 minuta).

Vyzkoušené metody:

- a) 0,00 min FLOW 100,0
0- 1,5 min CONC B 0%
1,5- 5 min CONC B 0- 100%
5- 25 min CONC B 100%
25- 30 min CONC B 100- 0%
- b) 0,00 min FLOW 100,0
0- 5 min CONC B 0%
5- 7 min CONC B 0- 100%
7- 15 min CONC B 100%
15- 20 min CONC B 100- 0%
- c) 0,00 min FLOW 100,0
0- 3 min CONC B 0%
1,00 min autozero
3- 7 min CONC B 0- 100%
7- 20 min CONC B 100%
- d) 0,00 min FLOW 100,0
0- 1,5 min CONC B 0%

0,50 min autozero

1,00 min Inject

2,00 min Load

1,50- 5 min CONC B 0- 100%

5- 15 min CONC B 100%

15- 20 min CONC B 100- 0%

e) 0,00 min FLOW 100,0

0- 30 min CONC B 100%

0,50 min autozero

1,00 min Inject

2,00 min Load

f) 0,00 min FLOW 100,0

0,50 min autozero

0- 80 min CONC B 100%

V čase 0,00 minut byl nastaven průtok mobilní fáze 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (FLOW 100,0). Poté mohlo být nastaveno autozero- vynulování, Inject- nástřik, Load- klidová poloha ventilu (u metod bez tohoto přednastavení se provádí ručně v průběhu chodu). V metodách bylo navoleno složení mobilní fáze: buďto pouze rozpouštědlo B (CONC B 100%), nebo u metod s gradientem byla mobilní fáze složena z rozpouštědla A, ke kterému bylo v zadaném čase přimícháváno rozpouštědlo B (CONC B 0- 100%), a poté byla mobilní fáze tvořena pouze rozpouštědlem B (CONC B 100%), ke konci mohlo být naopak rozpouštědlo B ubíráno (CONC B 100- 0%).

4.2.2.3. Kalibrace

Ke kalibraci byl použit základní roztok připravený rozpuštěním 10 mg flobufenu v 20 ml methanolu s využitím ultrazvukové lázně. Takto získaný roztok měl koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Z tohoto roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Roztoky jsem získala napipetováním daného množství základního roztoku (10 μl , 20 μl , 100 μl , 200 μl a 500 μl) a doředěním methanolem na 1 ml. K měření byla použita izokratická metoda f). Roztoky jsem připravila třikrát, též měření jsem několikrát opakovala. Mezi nanášením jednotlivých vzorků musela být vždy důkladně promyta Hamiltonova stříkačka (40x promytí methanolem). Na základě výsledků těchto měření byla sestavena kalibrační křivka, podle níž jsem poté porovnávala výsledky stanovení flobufenu separovaného z plazmy a moči (viz. tabulka č. 1 a graf č. 2).

4.2.2.4. Test opakovatelnosti

Ze základního roztoku o koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byl připraven roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. S tímto roztokem jsem šestkrát za sebou provedla nástřik. Měření bylo zhodnoceno prostřednictvím ploch jednotlivých píků. Test poukazuje na schopnost přístroje změřit stejné hodnoty a na schopnost pracovníků pečlivě pracovat. Viz. tabulka č. 2.

4.2.3. Izolace flobufenu z biologického materiálu

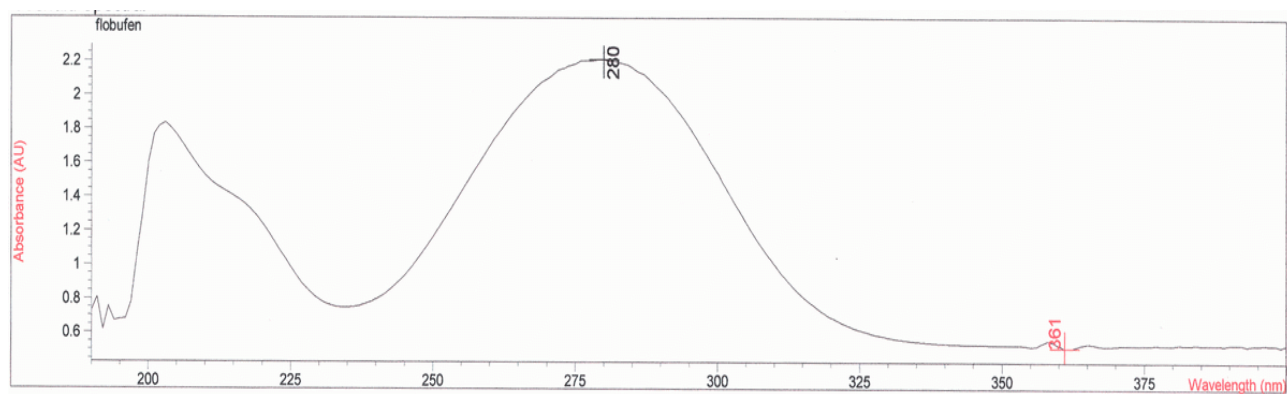
Byla provedena separace flobufenu z potkaní plazmy a z lidské moči extrakcí z kapaliny do kapaliny. U obou biologických materiálů byla použita shodná metoda přípravy vzorku. Do šesti zábrusových centrifugačních zkumavek (10 ml) jsem pipetovala 0,5 ml potkaní plazmy nebo moči. Moč ovšem musela být předtím přefiltrována přes filtr- 0,22 μm

kvůli možným nečistotám (epitelové buňky). K biologickému materiálu bylo přidáno dané množství methanického roztoku flobufenu, aby se získaly vzorky o koncentracích: 5 µg/ ml, 10 µg/ ml, 50 µg/ ml, 100 µg/ ml, 250 µg/ ml a 500 µg/ ml. Jako základní roztok jsem použila roztok o koncentraci 10 mg/ ml- použit byl koncentrovanější roztok, aby se do biologických materiálů nevnášel methanol. Do zkumavek jsem tedy pipetovala 0,5 µl, 1 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl a 50 µl roztoku flobufenu. Poté bylo do zkumavek přidáno 0,9 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Po protřepání jsem přidala 0,2 ml 3M kyseliny chlorovodíkové. Následovalo 5 minut třepání. V plazmě došlo k deproteinaci. Poté se přidala vlastní extrakční kapalina: 6 ml dichlormethanu. Vzorky s dichlormethanem se 5 minut protřepávaly. Potom jsem zkumavky umístila do centrifugy (15 minut), kde došlo k oddělení vodné a nepolární fáze.¹¹⁾ Zkumavky jsem přemístila do mrazáku, vodná fáze zmrzla. To usnadnilo získání dichlormethanové vrstvy, která byla vespod. Pomocí injekční stříkačky jsem separovala dichlormethan a přenesla ho do zkumavek. Dichlormethan se odpařil na vodní lázni. Odparek ve zkumavkách byl rozpuštěn v 1 ml přefiltrovaného methanolu a připraven k nástřiku (10 µl). Mezi nanášením jednotlivých vzorků se Hamiltonova stříkačka promývala methanolem. Chromatografické měření jsem provedla třikrát. Ve výsledcích se zapisovala plocha píků a retenční časy. Viz. tabulka č. 3 a č. 4, graf č. 3 a č. 4, chromatogram č. 1 a 2.

Pro srovnání, jakým způsobem ovlivňuje případný zbylý biologický materiál analýzu flobufenu a zda vytváří nějaké pozadí, byl nástříknut na kolonu slepý roztok- roztok získaný separací z plazmy a z moči, kdy tyto biologické materiály neobsahovaly přidávaný flobufen, a roztok flobufenu o koncentraci 50 µg/ ml separovaný z plazmy a z moči. Viz. chromatogram č. 3 a 4.

5. Výsledky

Graf č. 1: Absorpční spektrum flobufenu

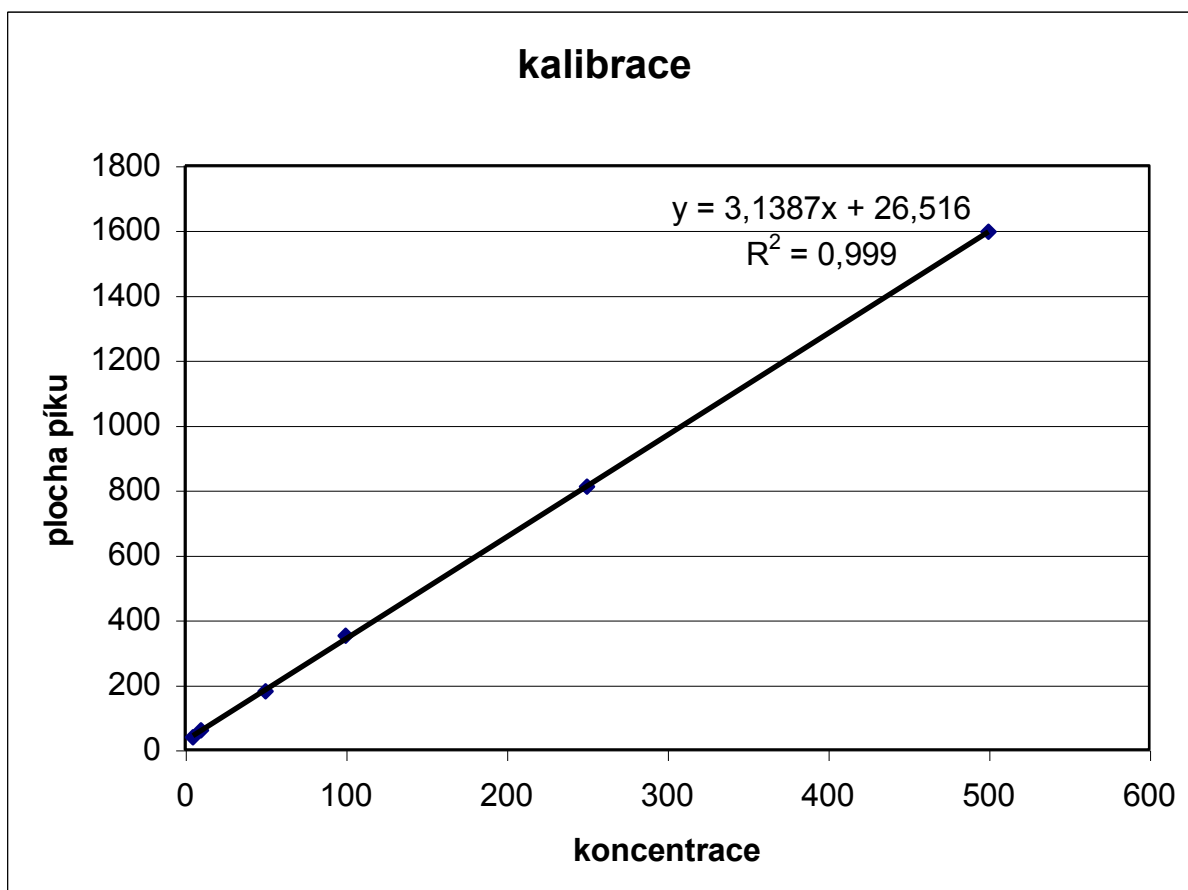


Tabulka č. 1: Kalibrace

Výsledky chromatografického měření, na základě kterých byla sestrojena kalibrační křivka.

Koncentrace flobufenu [µg/ ml]	Retenční čas[min]	Plocha píku [min*mAU]	Průměrná plocha	Směrodatná odchylka
5	2,57	38,9344	38,3650	1,83
	2,52	36,3161		
	2,58	39,8445		
10	2,62	62,5121	59,2450	2,99
	2,58	56,6399		
	2,59	58,5830		
50	2,54	178,9698	179,5683	2,16
	2,51	177,7667		
	2,59	181,9684		
100	2,62	344,4972	350,2345	5,05
	2,67	352,1965		
	2,61	354,0098		
250	2,65	814,4579	810,6880	3,40
	2,68	809,7640		
	2,61	807,8421		
500	2,63	1591,9214	1595,4112	5,35
	2,58	1601,5673		
	2,65	1592,7449		

Graf č. 2: Kalibrační přímka flobufenu



Tabulka č. 2: Opakovatelnost

Koncentrace flobufenu 100 µg/ ml

	Plocha píku flobufenu [min*mAU]	Retenční čas[min]
1.	342,5671	2,67
2.	350,1440	2,62
3	347,1731	2,65
4.	352,3852	2,63
5.	344,2506	2,67
6.	348,5830	2,64

Průměrná plocha píku flobufenu: 347,5172 (y)

$$\text{Vzorec: } RSD_{\%} = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum (y_i - y)^2}{n - 1}}$$

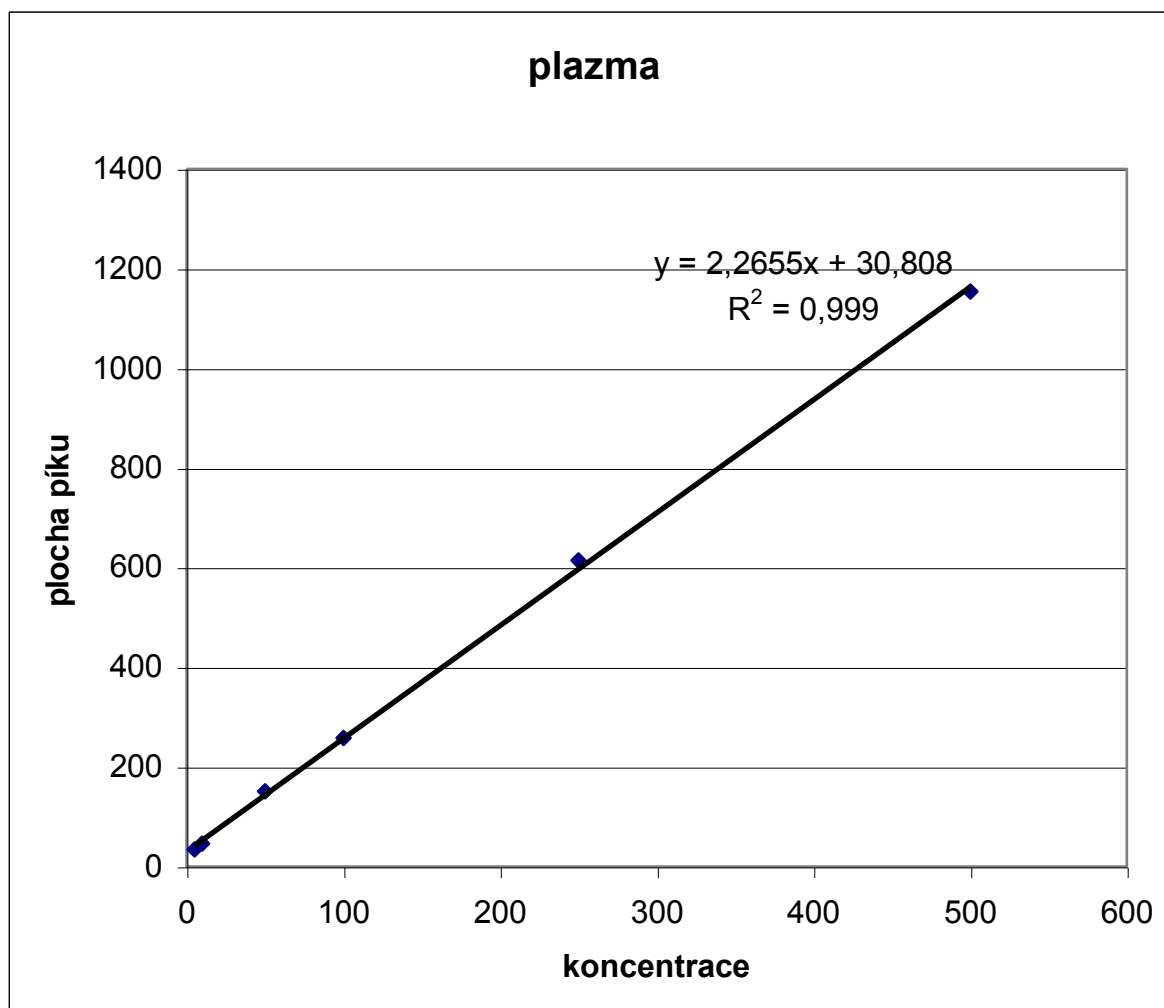
$$RSD_{\%} = 1,05 \%$$

Tabulka č. 3: Separace z plazmy

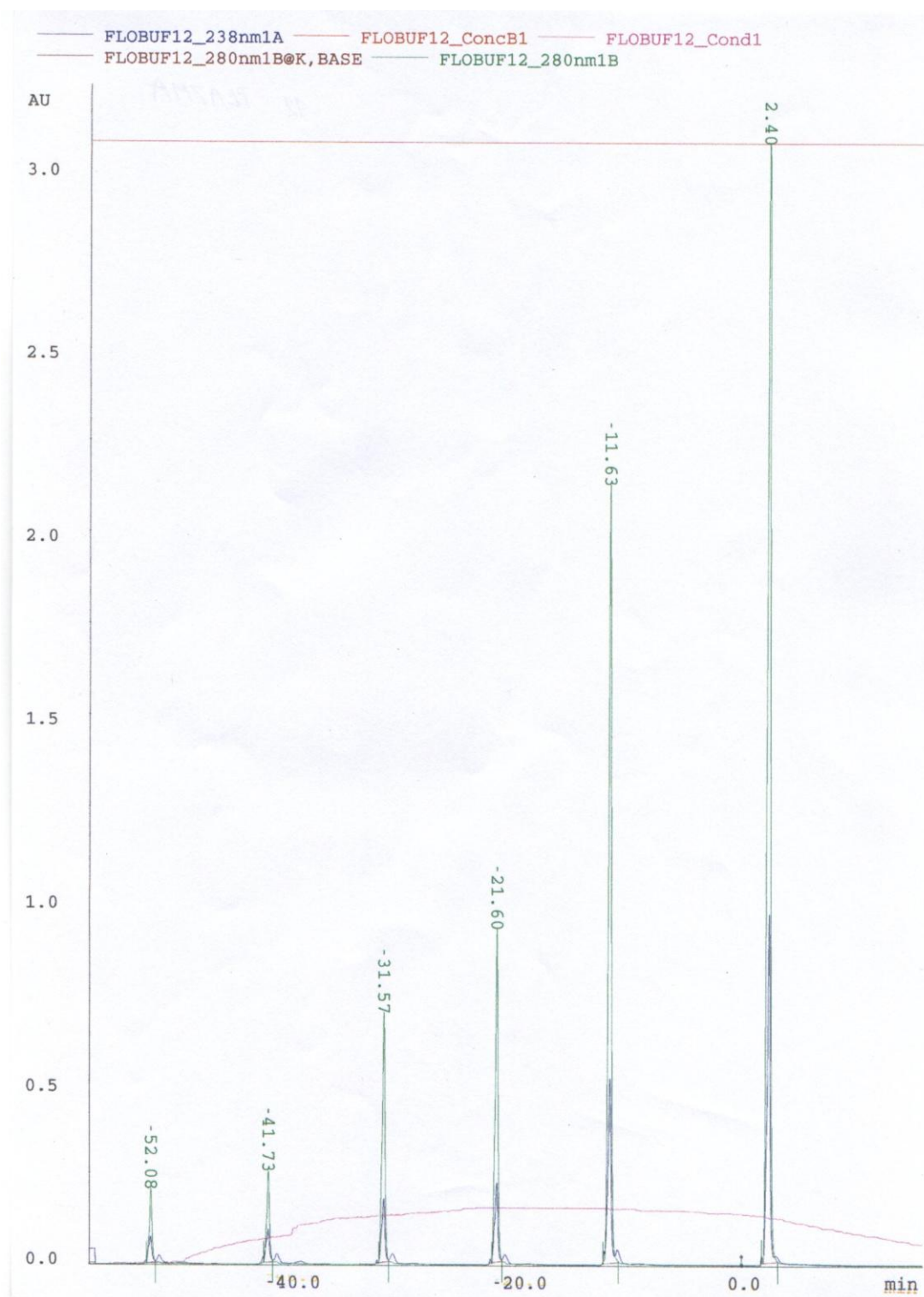
Výsledky měření flobufenu izolovaného z plazmy

Koncentrace flobufenu [µg/ ml]	Retenční čas[min]	Plocha píku [min*mAU]	Průměrná plocha	Směrodatná odchylka
5	2,37	35,3266	33,8125	1,81
	2,35	34,2983		
	2,32	31,8126		
10	2,41	49,0084	46,2360	4,68
	2,37	48,8706		
	2,40	40,8290		
50	2,36	147,0530	150,5990	3,60
	2,37	150,4991		
	2,37	154,2449		
100	2,38	256,7246	258,3201	4,02
	2,35	262,8976		
	2,40	255,3381		
250	2,35	618,7723	614,5399	4,69
	2,37	609,5010		
	2,34	615,3464		
500	2,43	1151,3167	1154,2363	3,47
	2,37	1158,0705		
	2,40	1153,3217		

Graf č. 3: Regresní přímka flobufenu izolovaného z plazmy



Chromatogram č. 1: Flobufen separovaný z plazmy

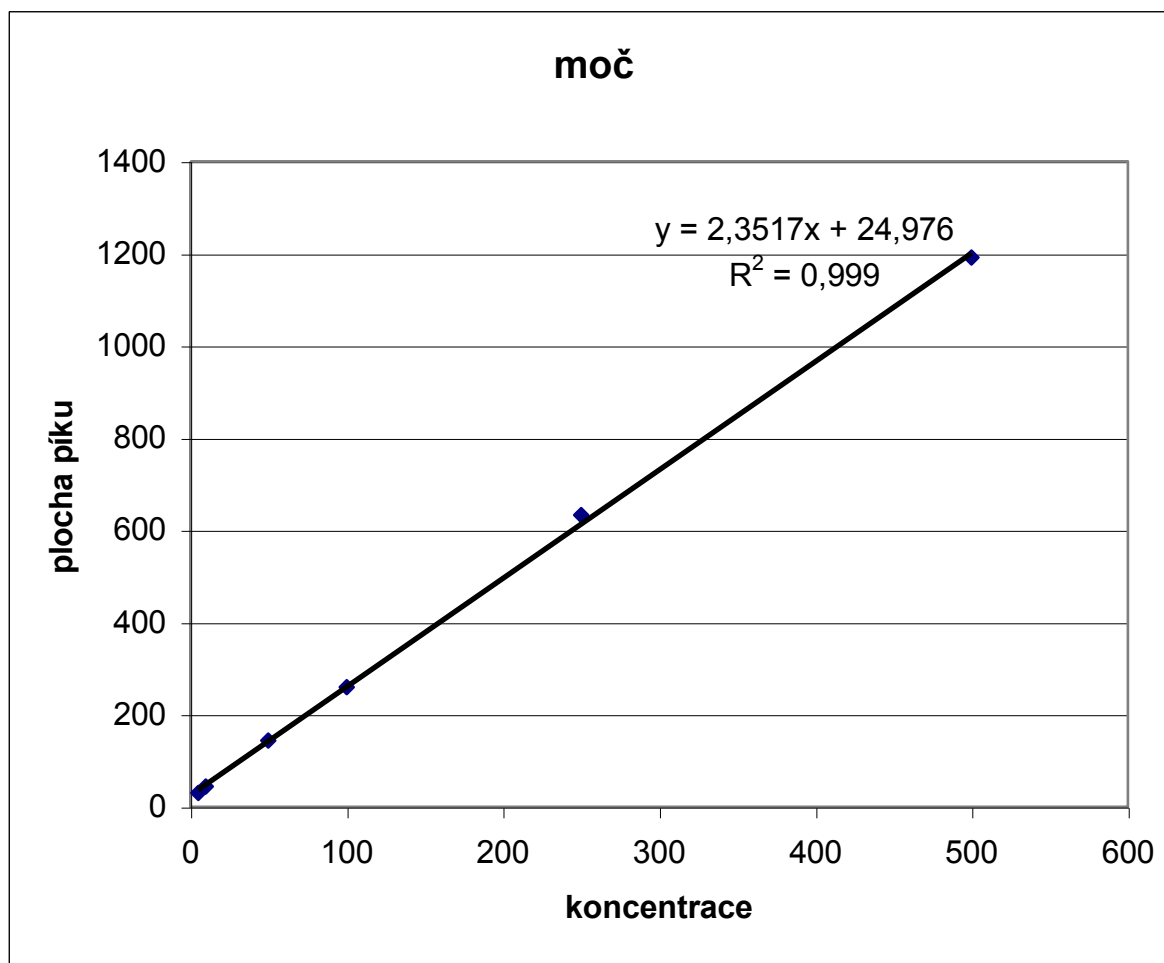


Tabulka č. 4: Separace z moči

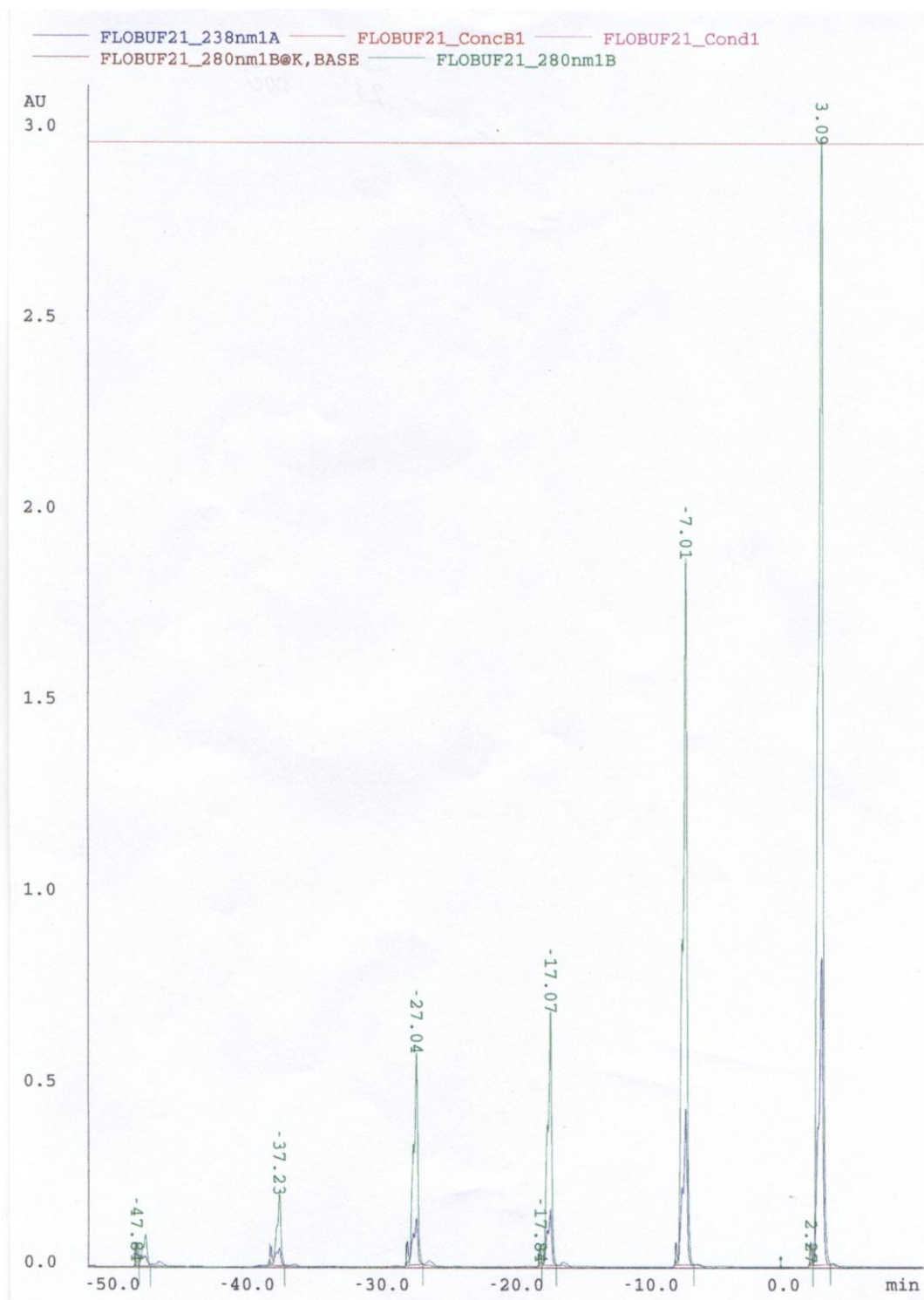
Výsledky měření flobufenu izolovaného z moči

Koncentrace flobufenu [µg/ ml]	Retenční čas[min]	Plocha píku [min*mAU]	Průměrná plocha	Směrodatná odchylka
5	2,80	28,4670	30,5150	2,16
	2,78	32,7763		
	2,75	30,3017		
10	2,78	42,7130	44,1335	1,38
	2,74	44,2256		
	2,75	45,4619		
50	2,82	147,8596	144,0242	3,53
	2,80	140,9102		
	2,78	143,3028		
100	2,79	256,6872	259,3850	3,57
	2,72	263,4313		
	2,75	258,0365		
250	2,89	637,3674	632,3441	5,13
	2,86	632,5560		
	2,79	627,1089		
500	2,77	1191,0197	1191,2558	5,15
	2,75	1186,2256		
	2,80	1196,5221		

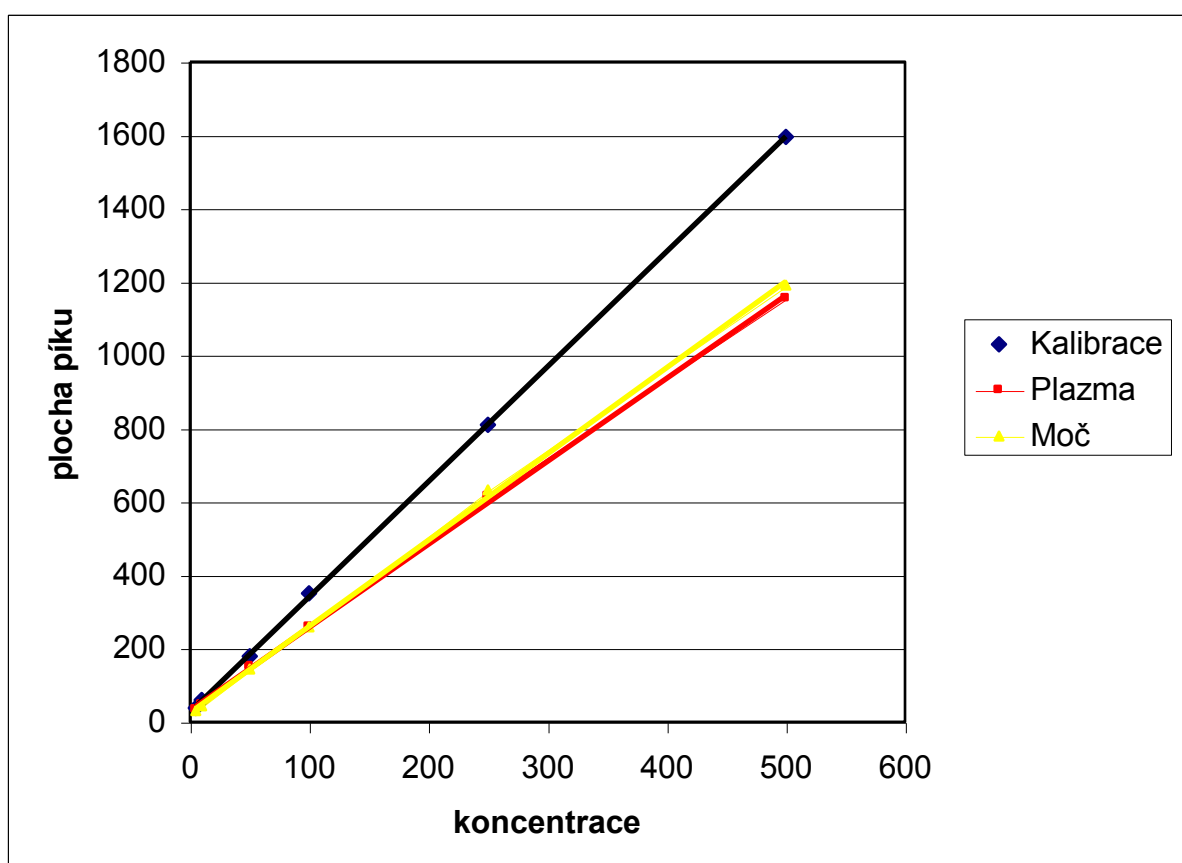
Graf č. 4: Regresní přímka flobufenu izolovaného z moči



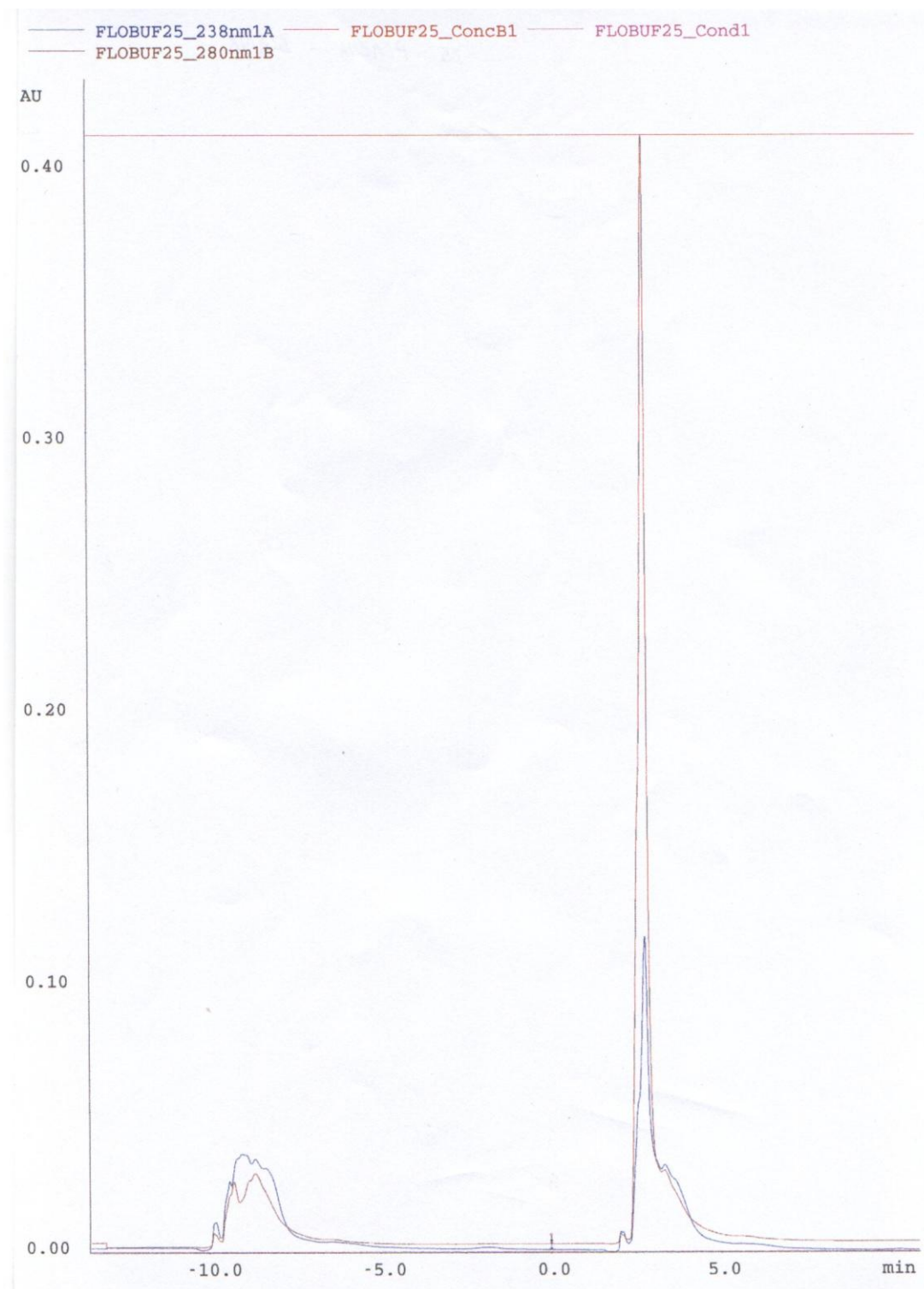
Chromatogram č. 2: Flobufen separovaný z moči



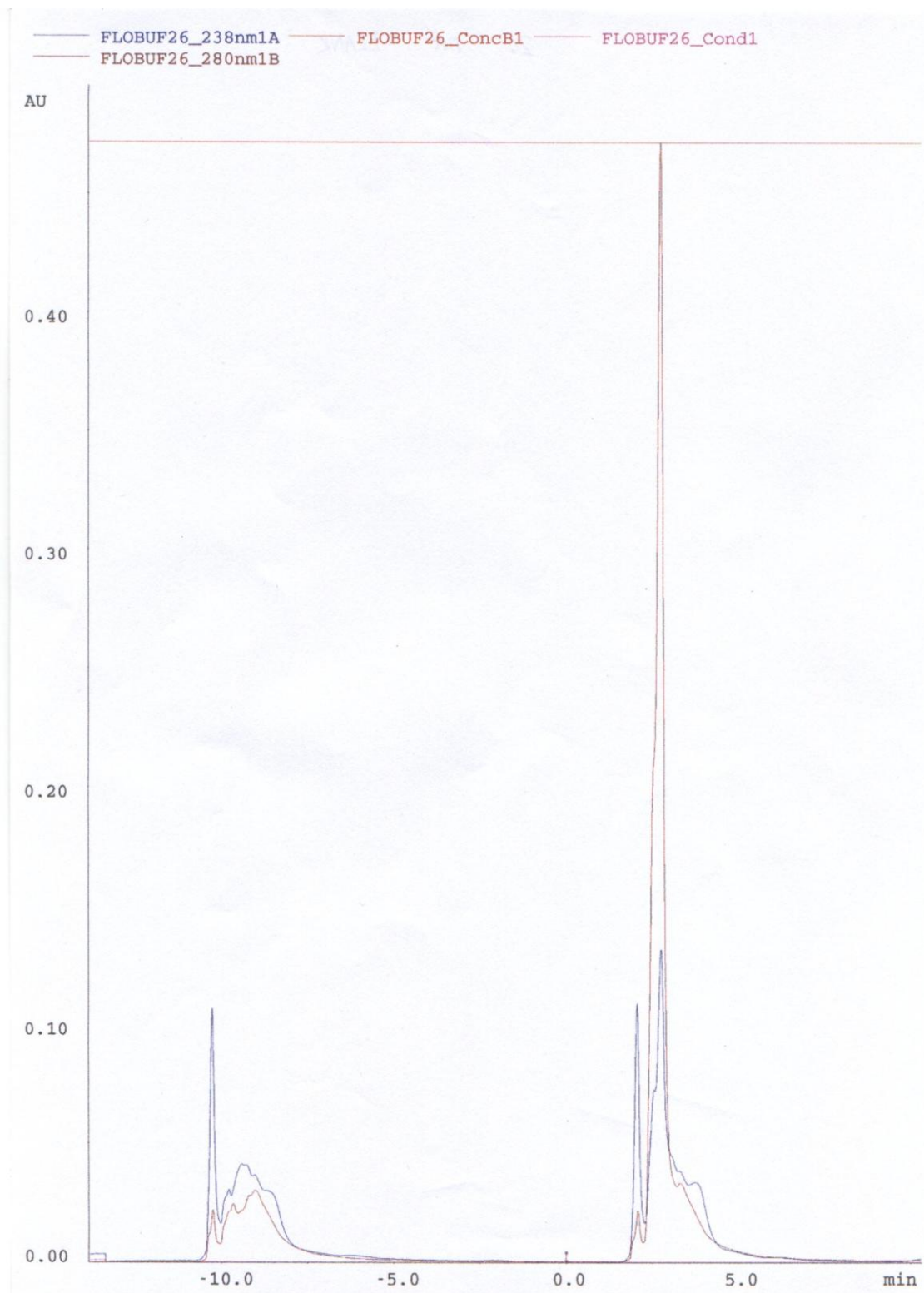
Graf č. 5: Porovnání závislosti ploch píků na koncentraci flobufenu z čistého roztoku a flobufenu získaného extrakcí z plazmy a z moči.



Chromatogram č. 3: Izolace z plazmy- slepý vzorek a flobufen (50 µg/ ml)



Chromatogram č. 4: Izolace z moči- slepý vzorek a flobufen (50 µg/ ml)



Tabulka č. 5: Hodnocení výtěžnosti na základě ploch píků flobufenu izolovaného z plazmy a ploch píků odečtených z kalibrační přímky.

Koncentrace flobufenu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	S_{pl} [$\text{min} \cdot \text{mAU}$]	S_{kal} [$\text{min} \cdot \text{mAU}$]	Výtěžnost [%]
5	33,8125	42,2095	80,11
10	46,2360	57,9030	79,85
50	150,5990	183,4510	82,09
100	258,3201	340,3860	75,89
250	614,5399	811,1910	75,76
500	1154,2363	1595,8660	72,33

S_{pl} plocha píku flobufenu izolovaného z plazmy

S_{kal} plocha píku vypočtená z rovnice kalibrační přímky flobufenu: $y = 3,1387x + 26,516$

Výtěžnost = $S_{\text{pl}} / S_{\text{kal}} \cdot 100$

Průměrná výtěžnost: 77,67 %

Tabulka č. 6: Hodnocení výtěžnosti na základě ploch píků flobufenu izolovaného z moči
a ploch píků odečtených z kalibrační přímky.

Koncentrace flobufenu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	$S_{\text{moč}}$ [$\text{min} \cdot \text{mAU}$]	S_{kal} [$\text{min} \cdot \text{mAU}$]	Výtěžnost [%]
5	30,5150	42,2095	72,29
10	44,1335	57,9030	76,22
50	144,0242	183,4510	78,51
100	259,3850	340,3860	76,20
250	632,3441	811,1910	77,95
500	1191,2558	1595,8660	74,65

$S_{\text{moč}}$ plocha píku flobufenu izolovaného z moči

S_{kal} plocha píku vypočtená z rovnice kalibrační přímky flobufenu: $y = 3,1387x + 26,516$

Výtěžnost = $S_{\text{moč}} / S_{\text{kal}} \cdot 100$

Průměrná výtěžnost: 75,97 %

6. Diskuse

Potenciální nesteroidní antiflogistikum flobufen bylo analyzováno pomocí přístroje SMART systém- vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Nejprve bylo nutné se s tímto přístrojem seznámit, naučit se základní operace. Zároveň bylo třeba přístroj zprovoznit, obnovit průchodnost kolony a dávkovacího ventilu. K promývání byl použit methanol a dimethylsulfoxid.

Flobufen byl analyzován použitím systému obrácených fází, neboť se jednalo o látku lipofilní. Na základě literatury byla též ověřena rozpustnost flobufenu ve vodě zalkalizované NaOH, nebo v methanolu. Přídavek vody do methanolického roztoku způsobil vysrážení flobufenu. Používán byl methanolický roztok flobufenu.

K úspěšné detekci bylo nezbytné změření absorpčního spektra flobufenu. Absorpční maximum bylo naměřeno při vlnové délce 280 nm. Tato vlnová délka byla vybrána za prioritní. Jako 2. vlnová délka pro detekci byla zadána vlnová délka 238 nm.

Pro stanovení bylo nutné vytvořit ve SMART systému chromatografickou metodu. Bylo vyzkoušeno několik izokratických i gradientových metod. Poté se pracovalo hlavně izokratickou metodou, kdy byla mobilní fáze tvořena 90% methanolem. Během gradientové eluce bylo složení mobilní fáze tvořeno též 10% methanolem. Poměr 10% a 90% methanolu se v průběhu chodu přístroje programově měnil. Vzhledem k tomu, že i při izokratické eluci vycházely píky zřetelné, symetrické a rozdělené až po základní linii, byla tato metoda použita k hlavnímu měření.

K sestavení kalibrační přímky bylo třeba naměřit několik vzorků flobufenu o stoupající koncentraci. Použité koncentrace: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.1, kalibrační přímka je znázorněná v grafu č.2. Z rovnice této přímky vyplývá, že při nulové koncentraci flobufenu je dosaženo nenulové hodnoty plochy píku. Tento jev se uplatňoval i u dalších měření a mohl

být pravděpodobně způsoben nedokonalým nastavením nulové hodnoty díky vlastnostem kolony.

V testu opakovatelnosti byla pouze ověřena přesnost měření a správnost získaných výsledků. Vypočtená hodnota 1,05% byla mírně nad lékopisnou normou 1%.

Další úkol této práce představovala izolace flobufenu z biologického materiálu metodou extrakce z kapaliny do kapaliny. Jako biologický materiál byla použita potkaní plazma a lidská moč. Postupováno bylo podle obecně uznávaného principu. Do plazmy a přefiltrované moči bylo aplikováno známé množství flobufenu. Vzorek byl upraven postupem z literatury, použitelným např. pro ostatní nesteroidní antiflogistika. Jako nejlepší extrakční činidlo byl na základě literatury zvolen dichlormethan. Extrakce byla jednorázová- 6ml dichlormethanu. Vyzkoušela jsem i násobnou extrakci, nicméně po druhém přidavku dichlormethanu se již nepodařilo oddělit fáze. Byla hodnocena výtěžnost, která dosahovala u plazmy hodnot 72,33 %- 82,09 %, a u moči byly získány hodnoty 72,29 % - 78,51 %. Průměrná výtěžnost u extrakce z plazmy byla 77,67 % a u extrakce z moči 75,97 %. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo u plazmy při koncentraci 50 µg/ ml a nejnižší při koncentraci 500 µg/ ml. U extrakce z plazmy opakovaně vycházela mírně vyšší výtěžnost při nižších koncentracích, což mohlo být způsobeno nedokonalým rozpuštěním odparku u vyšší koncentrace. U extrakce flobufenu z moči vycházel výtěžek rovnoměrněji. Nejvyšší výtěžnosti se dosáhlo u koncentrace flobufenu 50 µg/ ml, nejnižší při 5 µg/ ml. Výtěžek se tedy u obou biologických materiálů pohyboval okolo 75 %. K největšímu ovlivnění výtěžnosti dochází v okamžiku odebírání dichlormethanové fáze. Na fázovém rozhraní mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami může docházet k tvorbě emulze, jejíž součástí může být i extrahovaná látka. Dále se může látka při deproteinaci plazmy vázat na bílkovinný precipitát.

Pro porovnání, jak biologický materiál ovlivňuje analýzu flobufenu, byla provedena extrakce dichlormethanem z plazmy a z moči, které neobsahovaly přidaný flobufen. U moči byl opakovaně zaznamenán malý předpík, výrazný při vlnové délce 238 nm, při vlnové délce 280 nm však dosáhl plochy pouze cca 4 min*mAU. Patrně se jednalo o steroidní hormon extrahovaný spolu s flobufenem.

7. Závěr

- Byla nalezena metoda stanovení flobufenu HPLC systémem SMART.
- Bylo změřeno absorpční spektrum flobufenu.
- Byla sestrojena kalibrační přímka flobufenu.
- Byl proveden test opakovatelnosti.
- Byla vyzkoušena extrakce flobufenu z kapaliny do kapaliny u biologických materiálů (potkaní plazma, lidská moč) a následná analýza.
- Byla zhodnocena výtěžnost na základě ploch píků separovaného flobufenu a kalibrační přímky.
- Byl analyzován slepý vzorek pro porovnání pozadí vytvářeného biologickým materiálem.

8. Použitá literatura

- 1) Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001
- 2) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
- 3) Hrabálek A. a kol.: Chemická laboratorní technika pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2000
- 4) Veselá J., Szotáková B., Dršata J.: Praktické cvičení z obecné biochemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1997
- 5) Český lékopis 2002, Grada, Praha 2002
- 6) Šabartová J.: Kontrolní metody; Validace analytických metod v kontrole léčiv, Věstník SÚKLu, 1/94, Praha 1994
- 7) Holík M.: Validace analytických metod, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity
- 8) Sochor J.: HPLC analýza léčiv v biologickém materiálu, habilitační práce, Hradec Králové 2001
- 9) Sochor J., Klimeš J., Sedláček J., Somolíková B., Slovenčík D.: HPLC analysis of tiaprofenic acid in the samples of whole blood using L-L and S-L extractions, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 23, 3191- 3201, 2000
- 10) Sochor J., Klimeš J., Sedláček J., Zahradníček M.: High- performance liquid chromatographic analysis of kebufone and its metabolites in the samples of erythrocytes, plasma, and whole blood, Journal of liquid chromatography, 18, 2147- 2166, 1995
- 11) Sochor J., Klimeš J., Sedláček J., Zahradníček M.: Determination of ibuprofen in erythrocytes and plasma by high performance chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 13, 899- 903, 1995
- 12) SPE- Reference Manual & User Guide- Phenomenex, firemní materiál, 2002

- 13) Sochor J., Klimeš J., Sedláček J., Zahradníček M.: High performance liquid chromatographic assay for ibuprofen in whole blood using solid- phase extraction, *Journal of Chromatography B*, 654, 282- 286, 1994
- 14) Brief information: Flobufen (VÚFB- 16066), 2002
- 15) Wsól V., Fell A., Kvasničková E., Hais I.: Separation of the stereoisomers of the main metabolite of a non- steroidal anti- inflammatory drug, flobufen, by chiral high- performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 689, 205- 214, 1997
- 16) Lapka R., Šmolík S., Rejholec V.: Pharmacokinetics of flobufen and its main metabolite in the rat, *Drug metabolism and disposition* 18, 1060, 1990
- 17) Fujimoto R.: Flobufen VUFB, *Current Opinion in CPNS investigational Drugs* 1, 142- 147, 1999
- 18) Lapka R., Brejcha A., Šmolík S., Franc Z.: Dispozice [³H]flobufenu a jeho aktivního metabolitu u krys, *Československá farmacie*, 39, No. 10, 443- 447, 1990
- 19) Wsól V., Král R., Skálová L., Szotáková B., Trejtnar F., Flieger M.: Stereospecificity and Stereoselectivity of Flobufen Metabolic Profile in Male Rats In Vitro and In Vivo: Phase I of Biotransformation, *Chirality* 13, 754- 759, 2001
- 20) Manuál SMART system