

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

Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií VI.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Kristýna Kuželová

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

V Hradci Králové 5. května 2014

Kristýna Kuželová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce PharmDr. Pavle Pilařové, PhD. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při vypracování diplomové práce. Dále bych poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi, PhD. a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vstřícné jednání a pomoc.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíl práce	8
3. Teoretická část.....	10
3.1. Piroxikam a jeho vlastnosti.....	11
3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti.....	11
3.1.2 Indikace.....	12
3.1.3 Mechanismus účinku	12
3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti	12
3.1.5 Kontraindikace	13
3.1.6 Nežádoucí účinky.....	13
3.1.7 Interakce.....	13
3.1.8 Přípravky s obsahem piroxikamu.....	13
3.2. Izolace léčiva z biologického materiálu	14
3.2.1. Deproteinace	14
3.2.2. Extrakce do organických rozpouštědel - LLE	15
3.2.3. Extrakce na pevné fázi - SPE.....	16
3.2.4 SPME	18
3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	26
3.3.1 Princip HPLC.....	26
3.3.2 Instrumentace	27
3.3.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza	29
3.4. Chromatografické podmínky pro stanovení piroxikamu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře	31
4. Experimentální část.....	33
4.1. Chemikálie a pomůcky	34
4.1.1. Chemikálie	34
4.1.2. Sestava pro HPLC	34
4.1.3. Přístroje	34

4.1.4. Pomůcky	35
4.2. Příprava roztoků	35
4.2.1. Příprava standardů	35
4.2.2. Příprava pufru	37
4.2.3. Příprava mobilních fází	37
4.2.4. Příprava vzorků	37
4.3. Chromatografické podmínky	38
4.4. Provedení mikroextrakce vláknem	39
5. Výsledky a diskuse	40
5.1. Výběr chromatografických podmínek	41
5.2. Výběr podmínek pro SPME	48
5.3. Kvantitativní a detekční limit	53
5.4. Kalibrační přímka	54
6. Závěr	56
7. Literatura	58
8. Přílohy	61

1. Úvod

Piroxikam je léčivo ze skupiny nesteroidních antiflogistik. Používá se k symptomatické léčbě revmatoidní artritidy nebo osteoartrózy. Rovnovážné koncentrace v plasmě je dosaženo až za několik dní po aplikaci a pohybuje se v rozmezí 3-7 µg/ml. Kvůli zvýšenému výskytu nežádoucího účinku (gastrointestinální komplikace) a dlouhému poločasu léčiva je vhodné monitorovat hladinu piroxikamu v krvi.

Poměrně novou metodou extrakce léčiva z biologického materiálu je mikroextrakce na tuhé fázi (SPME). Je to jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika. Na křemenné vlákno potažené polymerem, které je ponořeno do vzorku (např. plasmy), se po určitý čas sorbuje léčivo. Následně se analyt z vlákna desorbuje do rozpouštědla, které je dále analyzováno, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Nejen ve farmaceutické analýze patří HPLC mezi široce využívané separační metody, ale v mnoha případech je i metodou první volby. Při vhodné kombinaci stacionární fáze, mobilní fáze a detekční techniky lze v relativně krátkém čase s vysokou citlivostí a selektivitou stanovit přítomnost a množství daného analytu ve vzorku.

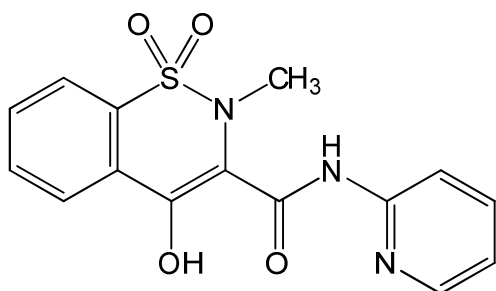
2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je nalezení vhodné metody stanovení piroxikamu v plasmě pomocí mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Optimalizace podmínek bude zahrnovat sledování vlivu složení mobilní fáze, změny teplot a pH. Bude hledán vhodný vnitřní standard. Bude ověřena linearita a selektivita metody a stanoven limit detekce a kvantifikace.

3. Teoretická část

3.1. Piroxikam a jeho vlastnosti

3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Piroxikam ($C_{15}H_{13}N_3O_4S$) je lékopisná látka, její molekulová hmotnost je 331,35. Je to 4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-*N*-(pyridin-2-yl)-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karbox-amid. Obsahuje 98,5% až 101,0% sloučeniny $C_{15}H_{13}N_3O_4S$, počítáno na vysušenou látku.¹

Vlastnosti

Piroxikam je bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Prakticky se nerozpouští ve vodě, je dobře rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v bezvodém ethanolu. Piroxikam je polymorfní.¹

Nečistoty

- pyridin-2-amin
- 4-hydroxy-1,1-dioxo-*N*-(pyridin-2-yl)-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karboxamid
- 4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karboxamid
- methyl-2-(1,1,3-trioxo-1,3-dihydro-2H-1 λ^6 ,2-benzothiazol-2-yl)acetát
- ethyl-2-(1,1,3-trioxo-1,3-dihydro-2H-1 λ^6 ,2-benzothiazol-2-yl)acetát
- isopropyl-2-(1,1,3-trioxo-1,3-dihydro-2H-1 λ^6 ,2-benzothiazol-2-yl)acetát
- methyl-4-hydroxy-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karboxylát
- ethyl-4-hydroxy-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karboxylát
- isopropyl-4-hydroxy-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1 λ^6 ,2-benzothiazin-3-karboxylát

- methyl-4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1λ⁶,2-benzothiazin-3-karboxylát
- ethyl-4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1λ⁶,2-benzothiazin-3-karboxylát
- isopropyl-4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-1,2-dihydro-1λ⁶,2-benzothiazin-3-karboxylát¹

3.1.2 Indikace

Piroxikam je oxikamové nesteroidní antiflogistikum/analgetikum. Používá se k symptomatické léčbě osteoartrózy, revmatoidní artritidy nebo ankylozující spondylitidy. Piroxikam není lékem první volby mezi nesteroidními antirevmatiky kvůli svému bezpečnostnímu profilu. Rozhodnutí ho předepsat by mělo být založeno na zhodnocení celkového rizika pro pacienta.

Piroxikam není vhodný pro léčbu akutních stavů, protože při užívání doporučených denních dávek je dosaženo konstantní hladiny v séru až po 5-10 dnech.²

3.1.3 Mechanismus účinku

Piroxikam jako nesteroidní antiflogistikum inhibuje cyklooxygenázu I, která umožňuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostanoidy, tromboxan a prostaglandiny. Ty se účastní zánětlivých pochodů reaktivity receptorů bolesti a procesů vyvolání horečky, ale také např. zvyšují prokrvení ledvin a stimuluji produkci žaludečního hlenu. Proto se piroxikam užívá pro svůj analgetický, antiflogistický a antipyretický účinek. Snižuje pouze patologicky zvýšenou tělesnou teplotu. Cyklooxygenáza I je konstitutivně přítomna v mnoha typech buněk a je trvale aktivní, na rozdíl od cyklooxygenázy II, která je indukovatelná cytokiny či stresem.³

3.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání se piroxikam resorbuje zčásti už v žaludku a dále úplně v duodenu. Maximální koncentrace v plasmě je dosaženo již za 2-3 hodiny. Zatímco po rektální aplikaci je maximální koncentrace v plasmě za 5-6 hodin. Díky enterohepatálnímu oběhu dochází za 6-10 hodin po aplikaci k dalšímu vzestupu hladiny piroxikamu.

Vaznost na bílkoviny je 98% a distribuční objem 0,12-0,14 l/kg tělesné hmotnosti. Rovnovážná (steady-state) koncentrace v plasmě je 3-7 µg/ml a je jí dosaženo při opakovaném podávání denní dávky 20 mg piroxikamu za 5-10 dní.

Poločas eliminace se pohybuje mezi 30 a 60 hodinami. Piroxikam je metabolizován v játrech na neúčinné produkty, které se vylučují ledvinami a zčásti i žlučí. Jen 2-5% piroxikamu je vyloučeno v nezměněné podobě močí.²

3.1.5 Kontraindikace

Piroxikam se nesmí užívat, pokud pacient má aktivní peptický vřed, zánětlivé gastrointestinální onemocnění (Crohnova choroba či ulcerózní kolitida) nebo krvácí do GIT. Současně se nemají používat další nesteroidní antirevmatika nebo antikoagulancia. Pacient nesmí piroxikam užívat, pokud je alergický na léčivou látku, v posledním trimestru gravidity či má závažné jaterní nebo renální selhání.²

3.1.6 Nežádoucí účinky

Při užívání piroxikamu se mohou velmi často objevit gastrointestinální obtíže jako je nevolnost, zvracení, průjem či zácpa, plynatost, pálení žáhy, abdominální bolest a okultní krvácení. Dále může často docházet ke gastrointestinální ulceraci s možností gastrointestinálního krvácení. Toto riziko je obzvláště závislé na velikosti dávky a délce léčby piroxikamem. Často se také může vyskytnout bolest hlavy, závratě a únava. Může se objevit reakce podobná alergické, způsobená zvýšenou tvorbou leukotrienů. Tuto zvýšenou tvorbu způsobuje inhibice cyklooxygenázy.^{2,3}

3.1.7 Interakce

Piroxikam by neměl být současně podáván s:

- kyselinou salicylovou nebo s jinými nesteroidními antiflogistiky, protože se zvyšuje riziko nežádoucích účinků
- kortikosteroidy - zvyšuje se riziko gastrointestinálních ulcerací nebo krvácení
- antikoagulancii - piroxikam zvyšuje jejich účinek
- antiagregancii a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) - zvyšuje se riziko krvácení do GIT²

3.1.8 Přípravky s obsahem piroxikamu

- Flamexin 20mg, Chiesi Farmaceutici S.p.A., Parma, Itálie
- Hotemin 5x1ml, Egis Pharmaceuticals Plc, Budapešť, Maďarsko
- Hotemin 20mg, Egis Pharmaceuticals Plc, Budapešť, Maďarsko
- Piroxicam AL 10, Aliud Pharma GmbH and Co.KG, Laichingen, Německo
- Piroxicam AL 20, Aliud Pharma GmbH and Co.KG, Laichingen, Německo⁴

3.2. Izolace léčiva z biologického materiálu

Izolace léčiva je důležitá fáze při stanovení hladin léčiv v biologickém materiálu. Toto stanovení koncentrace léčiva se využívá při terapeutickém monitorování látky, farmakokinetických a metabolických studiích, při zjišťování biodostupnosti nebo například v toxikologii. Extrakce je nezbytná pro odstranění endogenních látek ze vzorku, čímž se zvýší citlivost analýzy. Izolace se může provádět z různých tkání nebo z tělesných tekutin, například z plné krve, plasmy nebo moči.

Izolace léčiva je limitována mnoha faktory. Extrakce je ovlivněna druhem biologického materiálu, dále koncentrací léčiva, která je velmi nízká, počtem a strukturou stanovovaných látek, fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek a jejich stabilitou v biologickém materiálu.

Existuje více možností, jak izolovat léčivo z biologického materiálu, a stále se zdokonalují a zavádějí nové metody. Především je zde trend miniaturizace, kdy je potřeba stále menší množství vzorku a je možno stanovovat stále nižší koncentrace léčiva. Výběr vhodné techniky izolace látky závisí především na fyzikálních vlastnostech analytu a možnostech dané laboratoře.^{5,7}

3.2.1. Deproteinace

Deproteinace je velmi jednoduchá technika extrakce analytu z biologické matrice. Jejím základním předpokladem je rozpustnost extrahované látky v přidávaném rozpouštědle. Mechanismus deproteinace je založen na přeměně rozpuštěných proteinů na nerozpustné, tzn. precipitaci bílkovin. Tento precipitát se centrifuguje, čistý supernatant lze pak jednoduše oddělit a rovnou analyzovat. Bílkoviny změni svou rozpustnost díky změně svých povrchových vlastností, jako je např. náboj. Precipitované proteiny jsou drženy pospolu elektrostatickými, hydrofóbními nebo van der Waalsovými silami. Precipitace proteinů se dá rozdělit na vysolování a deproteinaci rozpouštědly.

Vysolování je obvykle prováděno síranem amonným, protože má vysokou rozpustnost a vysokou iontovou sílu. Dále se dá vysolovat chloridem sodným nebo solemi těžkých kovů, např. solemi Cu^{2+} , Zn^{2+} a Fe^{2+} .

Deproteinace rozpouštědly je založena na poklesu dielektrické konstanty, která charakterizuje interakce mezi povrchovými skupinami bílkovin. Používají se rozpouštědla vysoce rozpustná ve vodě. Tato rozpouštědla se hydratují (obklopují se molekulami vody) silněji než bílkoviny, čímž dochází k dehydrataci povrchu molekuly bílkoviny, který se potom asociuje

s ostatními molekulami bílkovin. Jako deproteinační rozpouštědlo se používá ethanol, methanol nebo aceton.

Nevýhodou této metody je fakt, že nelze extrahovat látky, které jsou vázány na bílkovinách.⁵

3.2.2. Extrakce do organických rozpouštědel - LLE

Další z používaných izolačních technik je extrakce do kapaliny. Princip je založen na distribuci analytu mezi dvěma nemísitelnými tekutinami, většinou jedna z fází je vodná a druhá je nemísitelné organické rozpouštědlo. Tento děj je charakterizován Nerstovou distribuční konstantou K_D :

$$K_D = \frac{\text{koncentrace analytu v org. fázi}}{\text{koncentrace analytu ve vodné fázi}}$$

Extrakce se většinou provádí přidáním organického rozpouštědla k biologickému vzorku. Následuje třepání, centrifugace a po oddělení vrstev tekutin odebrání tekutiny s rozpuštěným analytem. Dále se odpaří proudem dusíku nadbytečné rozpouštědlo. Zbytek je rekonstituován malým množstvím zvoleného rozpouštědla, např. mobilní fází, a může být analyzován.

Extrakce látky z vodné fáze záleží na následujících faktorech:

- rozpustnosti analytu v organickém rozpouštědle
- polaritě organického rozpouštědla
- pH vodné fáze

Důležitým faktorem extrakce je správná volba extrakčního rozpouštědla. Mezi nejdůležitější vlastnosti tohoto rozpouštědla patří:

- selektivita - pouze analyzovaná látka přechází do rozpouštědla
- kapacita - měla by být vysoká, snižuje potřebné množství rozpouštědla
- rozdílná hustota mezi rozpouštědly - dobré rozdělení vrstev rozpouštědel
- extrakční účinnost
- vhodné povrchové napětí - aby rozpouštědla netvořila emulze
- chemická a teplotní stabilita
- nízká cena, nízká toxicita
- výtěžnost extrakce můžeme také ovlivnit hodnotou pH vzorku. Do organických rozpouštědel přechází analyt v nedisociované formě, proto zvýšením pH (např. přidáním určitého množství báze) se zvýší extrakční účinnost zásaditých látek a

naopak u kyselých léčiv se zlepši výtěžnost snížením pH roztoku (např. přidáním kyseliny).

LLE je jednoduchá a levná technika s dobrou výtěžností. Její nevýhodou je časová náročnost, možná tvorba emulzí a velká spotřeba rozpouštědel.

Současný trend v přípravě vzorků je miniaturizace této LLE, kdy dochází k výrazné redukci množství organického rozpouštědla. Tato metoda se nazývá single drop microextraction (SDME) - mikroextrakce do kapky rozpouštědla. Kombinuje se zde klasická extrakce organickými rozpouštědly a mikroextrakce na pevné fázi. Kapka ve vodě nemísitelného rozpouštědla je zavěšena na špičce mikrojehly nebo je jí potažen vnitřek jehly. Tato kapka se ponoří do vodného vzorku nebo se nechá nad vzorkem, této metodě se pak říká headspace SDME. Organické látky se pak extrahují do kapky organické fáze. Po určité době je tato mikropapka analyzována na plynovém chromatografu.

Přestože je LLE metoda široce zastoupena a stále rozvíjena, vzhledem k její omezené možnosti automatizace je nahrazována extrakcí na pevných fázích^{5,9}

3.2.3. Extrakce na pevné fázi - SPE

SPE je velmi oblíbená metoda při izolaci látek z kapalných vzorků. Její výhodou oproti LLE je snížená spotřeba organických rozpouštědel, která jsou škodlivá pro lidské zdraví i pro životní prostředí. Při této metodě dochází k zakoncentrování vzorku, čímž se zvyšuje analytická citlivost. Je zde i možnost automatizace extrakce a extrahování více vzorků najednou, obvykle 12 - 24 vzorků.⁸

Mechanismus

Analyt se sorbuje na pevnou fázi z fáze kapalné, ve které je rozpuštěn.

Sorpce látky na pevném sorbentu závisí na:

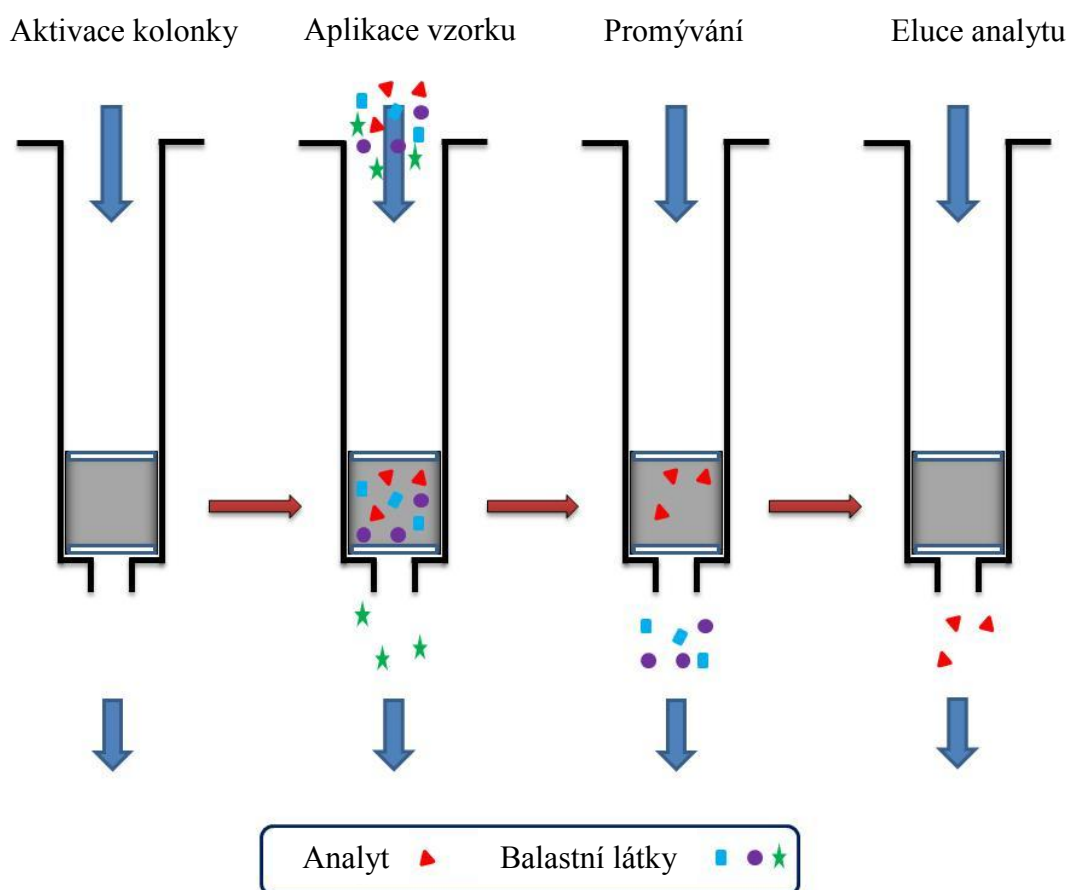
- selektivitě pevné fáze
- relativní interakční síle

Intermolekulární interakce mezi pevnou fází a analytem musí být silnější než interakce s kapalnou fází. Nejčastější interakční mechanismy v SPE jsou van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, vazby dipól-dipól a vazby kationt-aniont.⁵

Způsob provedení SPE

- příprava vzorku - zahrnuje možnou úpravu pH, zředění vzorku nebo filtraci, aby se zabránilo ucpání kolonky

- aktivace kolonky - provádí se vhodnými rozpouštědly. U kolonek s navázanou reverzní fází se používají polární organická rozpouštědla, např. methanol, acetonitril nebo isopropylalkohol. Dochází k solvataci funkčních skupin, které jsou pak schopné reagovat s analytem
- aplikace vzorku - dochází k zadržování analytu, ale i ostatních balastních látek. Vhodné množství vzorku musí být voleno podle kapacity kolonky
- promývání - důležitý krok, při kterém se vhodným rozpouštědlem či vodným roztokem vymývají z kolonky balasty
- eluce analytu - vhodným rozpouštědlem nebo pufrem se vymývá analyt z kolonky^{7,8}



Obr. č. 1: Schématické znázornění extrakce na pevné fázi⁸

Typy sorbentů

Výběr sorbentu závisí na mechanismu interakce mezi sorbentem a analytem. Jsou rozlišovány 3 základní typy sorbentů:

- Sorbenty s navázanou reverzní fází, kdy na polárním nosiči (většinou silikagelu) jsou navázány nepolární chemické skupiny, např. C8, C18, fenylová fáze nebo kyanopropylová fáze. K retenci dochází především díky van der Waalsovým silám.
- Normální fáze, kdy k sorpci analytu dochází díky interakcím mezi polárními funkčními skupinami, např. interakce dipól-dipól nebo vodíkové můstky. Používá se nemodifikovaný silikagel, polymerně vázaný 2,3-dihydroxypropyl nebo monomerně vázaná kyanopropylová fáze.
- Iontoměniče mohou být použity u složek, které jsou ionizovány. Anionty lze izolovat díky kvarterním amonným skupinám, které jsou navázány na silikagelovém povrchu. K izolaci kationtů se používá silikagel s navázanými sulfonovými skupinami. V praxi se používá např. polymerně vázaný aminopropyl, polymerně vázaný kvarterní amin nebo polymerně vázaná kyselina benzensulfonová.
- Imunosorbenty mají vysokou selektivitu. Kolonka je naplněna silikagelem s navázanými protilátkami. Mechanismus retence je reverzibilní a dochází k selektivní interakci mezi protilátkou a antigenem.
- MIPs sorbenty (polymery s otiskem molekuly) se vyrábí kopolymerací cílové molekuly v makromolekulární matrici. Tyto sorbenty jsou vysoce selektivní.
- RAM sorbenty mají póry, které zabraňují vstupu velkých molekul do vnitřní fáze. Tyto materiály mají 2 povrchy - vnější hydrofilní a vnitřní hydrofóbní.

Dá se říci, že SPE je více účinná separační metoda než LLE, která dosahuje vyšší výtěžnosti analytu při použití malého množství sorbentu v kolonce, proto její význam v analytice stále roste.^{5,6,8}

3.2.4 SPME

Mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika, která nevyžaduje velké množství rozpouštědla nebo složitou aparaturu. Byla objevena C. Arthurem a J. Pawliszem roku 1990. Používala se nejdříve na extrakci organického znečištění ve vzorkách vody. Později byla metoda používána i na biologické vzorky jako je krev, plasma, moč nebo vlasy.^{10,11,12}

Mechanismus SPME

Při SPME se používá jehla, ve které je ukryto zhruba jednocentimetrové křemenné vlákno potažené organickým polymerem. Toto vlákno je napojeno na píst, kterým se vysunuje vlákno při analýze z jehly. Jehla slouží k propíchnutí septa zkumavky. Následuje vysunutí vlákna z jehly. Vlákno se může přímo ponořit do vzorku nebo se nechá nad hladinou vzorku (head-space extrakce). Analyzovaná látka se sorbuje do polymerní vrstvy na vlákne do doby dosažení rovnovážného stavu. To je velký rozdíl od ostatních extrakčních metod, kdy se extrahuje analyt v co nejvyšší koncentraci. Je důležité volit vhodný polymer, protože tato extrakce je selektivní proces a probíhá dle pravidla „podobné se rozpouští v podobném“.

Důležitým parametrem při extrakci je čas sorpce. Většinou sorpce trvá 15-20 minut. Obvykle je sorpce z prostoru plynné fáze kratší než při přímém ponoření vlákna do kapalného vzorku, protože analyt v plynném stavu difunduje k vláknu rychleji. Tento čas je také ovlivněn:

- molekulovou hmotností analytu
- tloušťkou vrstvy polymeru na vlákne
- koncentrací analytu ve vzorku¹²

Je dokázán lineární vztah mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím analytu, který se sorbuje na vlákno. Díky tomu lze SPME využít jako přesnou a reprodukovatelnou metodu pro kvantitativní stanovení látek v různých vzorcích nebo analytech, např. vodě, ovzduší nebo biologických tekutinách. Tento vztah je vyjádřen rovnicí:

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

kde n = množství analytu sorbovaného na vlákno

C_o = počáteční koncentrace analytu ve vzorku

K_{fs} = rozdělovací koeficient pro analyt mezi polymerem a vzorkem

V_f = objem polymerního sorbentu na vlákne

V_s = objem vzorku¹³

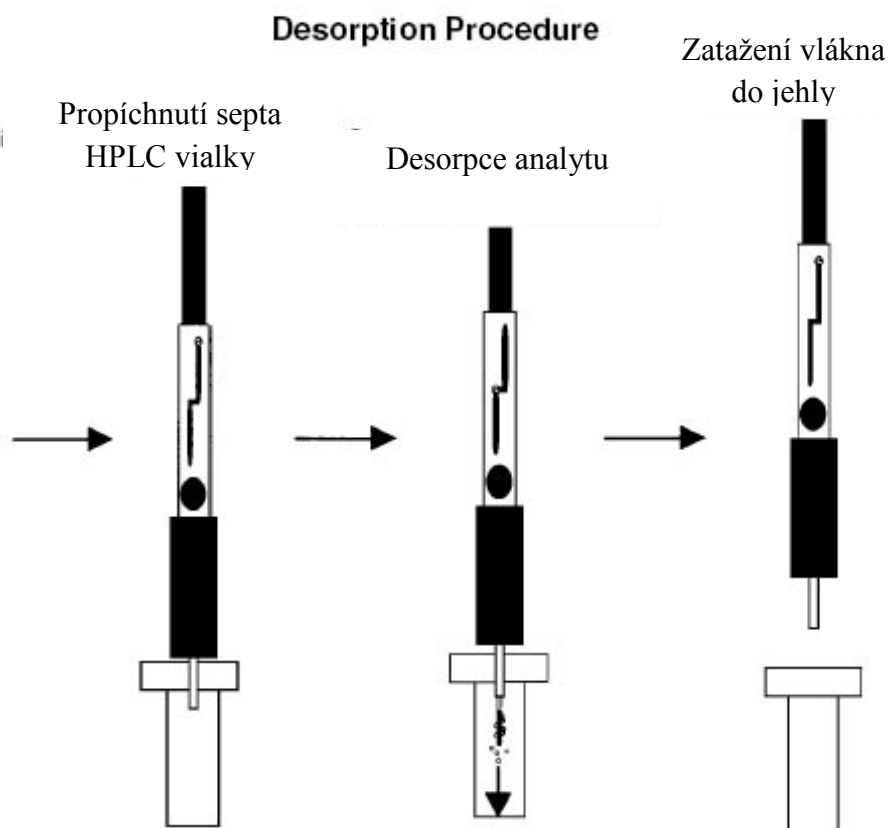
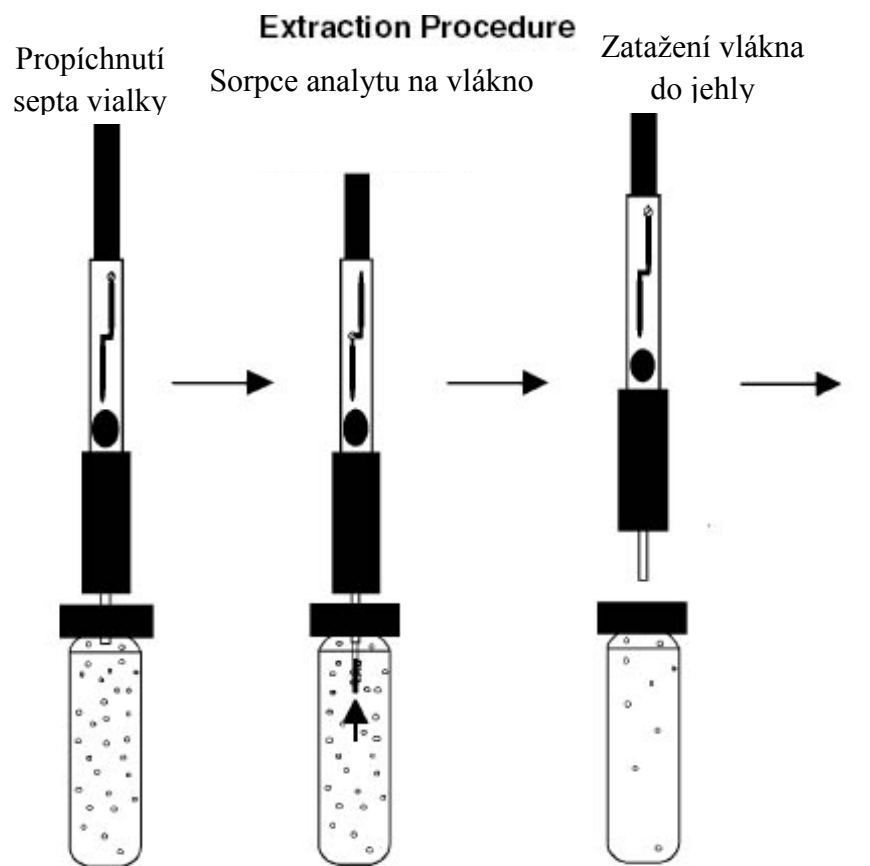
Postup

Nejdříve jehla se zataženým vláknem propíchně septum vialky, poté se vysune vlákno, buď přímo do kapaliny nebo se nechá nad zkoumaným vzorkem, což záleží na typu zkoumaného analytu. Pokud se analyt vyskytuje převážně v kapalném stavu, je citlivější metoda ponoření

vlákna. Na rozdíl od analytů, které se vyskytují v prostoru nad hladinou, je vhodnější je sorbovat pomocí headspace-SPME.

Dále se nechá analyt určitý čas sorbovat. Tento extrakční čas je velmi důležitým faktorem sorpce, která probíhá do ustálení rovnováhy. Pro zachování přesnosti SPME je důležité zachování konstantních podmínek (doba sorpce, konstantní velikost vialek, množství vzorku a stejná hloubka ponoru vlákna do vzorku).

Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno zasune zpátky do jehly a spolu s ní je vytaženo z vialky. Dále se jehla zavede do injektoru plynového chromatografu, po vysunutí vlákna se analyt tepelně desorbuje a je proudem mobilní fáze nesen na GC kolonu. Nebo při analýze pomocí HPLC se analyt eluuje vhodným rozpouštědlem či přímo mobilní fází, vzniklý roztok je injikován do HPLC systému.¹²



Obr. č. 2: Schématické znázornění SPME¹⁴

Typy sorbentů

Výtěžnost extrakce velmi závisí na výběru vlákna, protože zde dochází k interakci mezi polymerem a analytem. U SPME platí již výše zmíněné pravidlo, že „podobné se rozpouští v podobném“ a jelikož jsou polymery spíše nepolárního charakteru, je u nich nízká extrakční účinnost polárních analytů, což patří mezi limity aplikace SPME. Extrakci polární látky lze též zajistit vhodnou derivací analytu.

Existuje mnoho sorbentů, které jsou nanášeny na křemenném vláknu, např. polydimethylsiloxan PDMS, polyakrylát PA, Carboxen CAR, Carbowax CW, Carbowax/pryskyřice CW/TPR, polydimethylsiloxan/divinylbenzen PDMS/DVB nebo divinylbenzen/Carboxen/dimethylsiloxan DVB/CAR/PDMS. S typem vlákna souvisí i mechanismus sorpce. Pokud jsou nanášeny homogenní čisté polymery, chovají se jako absorbenty. Když jsou na vláknech nanášeny porézní částice suspendované v polymeru, je mechanismus sorpce adsorpční. Tyto polymery mohou být na vláknech nevázané nebo chemicky vázané. Vázané fáze jsou stabilní v organických rozpouštědlech a neobtávají v nich, na rozdíl od fází nevázaných. Chemicky vázané fáze jsou též termicky stabilnější. Vyrábějí se i MIPs (molecularly imprinted polymers) a RAM (restricted access material) polymery, které jsou vysoce selektivní k danému analytu. Polymery jsou dostupné v různých tloušťkách filmu, např. 7 μ m, 30 μ m, 85 μ m nebo 100 μ m. Právě na tloušťce vrstvy závisí množství zachyceného analytu. Silnější vrstva má obecně vyšší schopnost zadržovat analyt.¹⁵

Vlákna pokrytá polymery, v nichž jsou suspendovány porézní částice, mají vyšší selektivitu a nižší mechanickou stabilitu oproti vláknům s homogenními polymery. Tato vlákna zachycují analyty do svých pórů na základě fyzikálních interakcí. Platí, že s rostoucí porozitou částic polymeru roste i celková kapacita vlákna a schopnost vrstvy zadržovat analyty. Čím větší je velikost pórů, tím roste selektivita vlákna. Z toho vyplývá, že tato vlákna mají omezenou kapacitu a dochází u nich k nežádoucí kompetitivní adsorpci.¹²

Možnosti ovlivnění sorpce

Reprodukovatelnost výsledků SPME je závislá na mnoha faktorech. Změnou těchto faktorů lze dosáhnout i zvýšení výtěžnosti extrakce. Jelikož jsou koncentrace analytů často velmi nízké, využívá se i často různých mechanismů ke zvýšení extrakce. Mezi tyto faktory patří:

- Vhodný výběr vlákna - záleží na polaritě vlákna vůči analytu, jeho porozitě a specifickém povrchu, např. nepolární analyty jsou účinněji extrahovány vlákny s nepolárním povrchem.

- Provedení extrakce - analyty vyskytující se spíše v plynném stavu je optimálnější extrahovat nad hladinou vzorku (head-space extrakce). Oproti tomu analyty v kapalném stavu se extrahují přímým ponořením vlákna do vzorku (direct-immersion).
- Extrakční čas - platí, že čím déle trvá extrakce, tím má vyšší výtěžnost. Ale obvykle se extrahuje 15-20 minut, protože po delší době už není nárůst koncentrace tak veliký. Látky s menší molekulovou hmotností se sorbují daleko kratší dobu.
- Míchání vzorku - míchání výtěžnost zvyšuje a dobu extrakce zkracuje, protože urychluje pohyb molekul z matrice vzorku k sorpční vrstvě.
- Zahřívání - zvyšující se teplota ovlivňuje pohyb molekul a odpařování analytu, což se využívá především u head-space extrakce. Ale zahřívání též urychluje desorpci analytu z vlákna, proto ideální je zahřívání vzorku a zároveň ochlazování vlákna. Tato metoda je ale velmi komplikovaná, a proto málo používaná.
- Úprava pH - látky se na vlákno sorbují v neionizovaném stavu, proto vhodnou úpravou pH lze zvýšit výtěžnost extrakce. Kyselé analyty se lépe sorbují v kyselém prostředí a bazické naopak.
- Vysolování - přidáním soli se zvýší iontová síla roztoku a tím se sníží rozpustnost analytů a zvýší účinnost extrakce především pro látky polární a těkavé. Obvykle se používají soli jako např. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_2CO_3 , NaHCO_3 a další.

Při velmi nízkých koncentracích těkavých analytů změna objemu vzorku neovlivní výsledek extrakce, protože zde je rovnováha závislá na koncentraci. Ale při velkých koncentracích, především látek s vysokou distribuční konstantou, bývá kalibrační křivka už nelineární. To znamená, že u velkých objemů (>5 ml) množství získaného analytu neodpovídá lineárně změně koncentrace ve vzorku.^{11,12}

Využití

SPME je jednodušší a rychlejší než extrakce na pevných fázích nebo extrakce kapalinami. Díky tomu roste i její využití. Za posledních deset let vzrostl počet jejího použití z přibližně 10 na 300. Využívá se v mnoha vědeckých a technických odvětvích. Mezi jedny z nejdůležitější patří analýza endogenních a exogenních látek v biologickém materiálu.

Analýza léčiv v biologických materiálech získává stále vyšší význam při pochopení terapeutických a toxických dávek léčiv. Díky ní můžeme vyvíjet stále účinnější a bezpečnější léčivé přípravky. Kvantitativní a kvalitativní analýza léčiv a jejich metabolitů je široce využívána ve farmakokinetických studiích a terapeutickém monitorování léčiv. SPME se využívá i při stanovení návykových látek a jedů ve forenzní a klinické toxikologii. Tato analýza se může provádět ze séra, plasmy, plné krve, mléka, moči, slin i vlasů.^{16,18}

V posledních letech byla vyvíjena technika k monitorování hladin léčiv přímo v živém systému. Tato in vivo měření eliminují vznik chyb a redukují čas spojený s přenosem vzorku a s jeho uchováváním, takže výsledná data jsou přesnější. Nevýhodou in vivo technik je nízká a měnící se koncentrace analytu v komplexním biologickém celku. Zpočátku se SPME používala při extrakci analytů z bakterií, hub a hmyzu. Nyní se už aplikuje u obratlovců a rostlin. Např. byla takto měřena hladina diazepamu a jeho metabolitů přímo v proudící krvi psů (*Musteata a kol*).^{16,18}

SPME se též využívá při hledání nových bioaktivních látek z rostlin. V přírodní medicíně se takto extrahují nové složky z rostlinné kapky. Takto byly extrahovány např. tabákové alkaloidy a monoterpeny díky HS-SPME.

Dále se SPME využívá v analýze potravin. Jelikož jsou potraviny též složitá soustava vody, proteinů, lipidů, sacharidů a mnoha dalších látek, je SPME vysoce ceněna pro svou selektivitu. V potravinách se díky SPME dá stanovit hladina např. pesticidů.¹⁷

Nové trendy v SPME

SPME se stále vyvíjí a nachází nová uplatnění. Optimalizují se metody stanovení analytů, hledají se nové sorbenty a aplikuje se v různých odvětvích. Též se využívají různé obměny SPME.

Výzkum se zabývá vývojem nových vláken místo současných křemenných, která jsou velmi křehká. Zkouší se vlákna zlatá, platinová nebo z titanu. Bohužel tato vlákna jsou velmi finančně náročná. Dále se hledají nové sorbenty, které by sorbovaly dobře i polární látky, a byly stabilní v různých rozpouštědlech. Velký zájem vzbuzuje použití uhlíkatých nanotrubiček (carbon nanotubes), což jsou alotropické formy grafitu. Je to srolovaná lamela grafitu vypadající jako jehla. Vynikají velkým aktivním povrchem vůči objemu. Tyto nanotrubičky zadržují analyt hydrofóbními a elektrostatickými silami. Díky nim sorbují nepolární, polární i iontové

sloučeniny. Navíc jsou vysoce stabilní i při různých pH, v organických rozpouštědlech a při vysokých teplotách.¹⁹

Princip SPME se také využívá u mikroextrakce na tenký film (thin film microextraction TFME), kdy je sorbent umístěn horizontálně do tenkého filmu, oproti klasické SPME, kdy je sorbentem potažené tenké vlákno. Zkouší se využít TFME jako žvýkácká guma pro extrakci analytu ze slin nebo jako tenký film pro in vivo testování z kůže.

Výzkum se zabývá i automatizací SPME. Při spojení s HPLC se dá použít robotický autosampler s 96 tenkými destičkami. Ten umožňuje paralelní analýzu až 96 vzorků najednou.¹⁸

Mikrodialýza se zkouší jako in vivo vzorkování. Dá se využít při farmakokinetických a farmakodynamických studiích léčiv. Kanyla, ve které je umístěno vlákno se sorbentem, se napojí na krevní oběh. Krev pak protéká přes kanylu a analyt přichází do styku se sorbentem, aniž by vláknu hrozilo poškození. Tento systém byl původně vyvinut pro neurochemické in vivo monitorování extracelulárního prostoru v mozku.¹⁸

3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) patří mezi současné progresivní analytické metody. Široce se využívá ve všech oblastech analýzy léčiv. Umožňuje současné kvalitativní a kvantitativní hodnocení separovaných složek. Další výhodou HPLC je rychlost a vysoká citlivost analýzy. Analýzu lze též automatizovat, kdy chromatografy provádějí samy desítky analýz pomocí automatického dávkovače bez obsluhy operátora.²⁰

3.3.1 Princip HPLC

Chromatografie je založena na dělení analyzovaných látek mezi stacionární a mobilní fázi. V průběhu chromatografického procesu dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi mobilní fází (pohyblivou), která unáší analyt, a stacionární fází (nepohyblivou). Při styku analytu se stacionární fází dochází k interakcím s různým mechanismem vzniku. Podle mechanismu separace můžeme HPLC rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní.

Adsorpční chromatografie je založena na rozdílné adsorpci molekul analytu na povrch stacionární fáze s aktivními centry. Polární molekuly se obecně více adsorbují na polární stacionární fáze. Tato adsorpce je ještě zesílena použitím nepolární mobilní fáze, protože polární mobilní fáze by se sama adsorbovala na povrch adsorbentu. Obvykle se jako stacionární fáze využívá nemodifikovaný silikagel, na jehož volné hydroxylové skupiny se adsorbují analyty pomocí vodíkových vazeb.

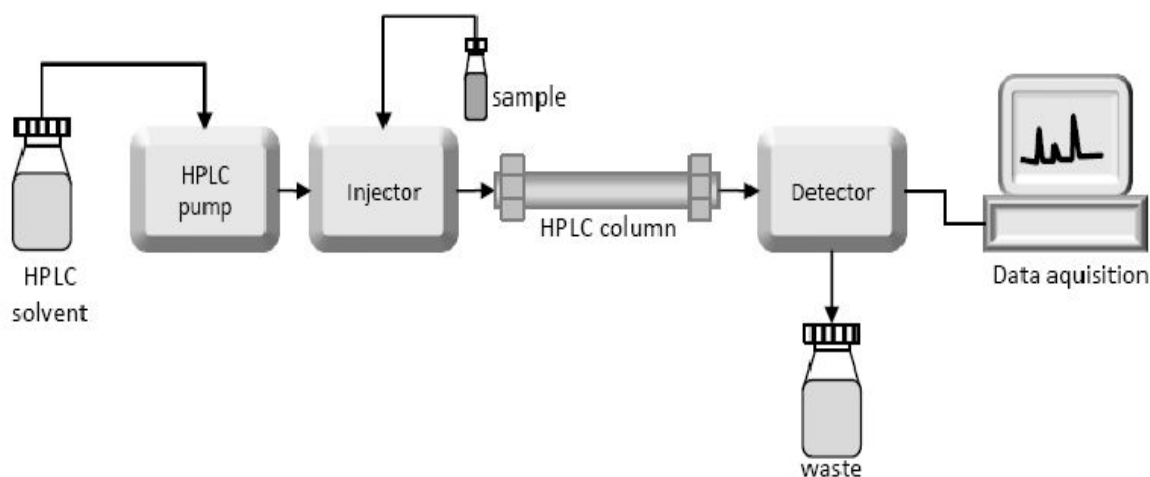
Principem rozdělovací chromatografie je rozdílná rozpustnost analytu ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách, kdy jedna kapalina je ukotvena na vhodném nosiči jako stacionární fáze. Jako stacionární fáze se využívá silikagel s navázanými nepolárními chemicky modifikovanými fázemi. Jako mobilní fáze se používají polární rozpouštědla či vodné pufrů.²¹

Mechanismem iontově výměnné chromatografie je rozdílná afinita iontů analytů k iontoměnič (stacionární fázi). Analyty jsou zadržovány silnými elektrostatickými silami mezi ionty. Síla afinity je dána disociační konstantou ionogenních skupin, pH a iontovou silou mobilní fáze. Ionoměniče lze rozdělit na katexy, které mají záporné skupiny na povrchu, a proto zadržují kationty, a anexy mající na svém povrchu kladné částice. Používají se 4 základní skupiny jako iontoměniče: sulfonová (silný měnič kationtů), karboxylová (slabý měnič kationtů), tetraalkylamoniová (silný měnič aniontů) a terciární aminoskupina (slabý měnič aniontů).^{21,22}

Při gelové chromatografii záleží na velikosti molekul analytu. Kolona je naplněna porézní stacionární fází (gelem). Malé molekuly jsou zadržovány nejvíce, naopak velké molekuly (větší než je velikost pórů) prochází kolonou bez zdržení. Retence je též ovlivněna tvarem molekuly i pórů.²¹

Afinitní chromatografie využívá jako stacionární fází specifické ligandy, které zadržují analyty pomocí biologických interakcí. Těmito ligandy může být protein, enzym, protilátky, specifický antigen, určitá sekvence DNA nebo RNA. Tyto ligandy bývají navázány na nosiči jako je celulóza nebo agar. Tato metoda je vysoce selektivní a může být využívána při izolaci nebo stanovení specifických biologických látek ve složitém biologickém vzorku.²³

3.3.2 Instrumentace



Obr. č. 3: Schématické znázornění HPLC²⁴

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí:

- *Zásobník mobilní fáze (HPLC solvent)* zajišťuje dostatečné množství mobilní fáze pro chromatograf. Může mít v sobě zabudován degasér a filtr. Degasér zbavuje mobilní fázi bublinek vzduchu, které by mohly narušit funkci čerpadla či detekci analytu. Filtr odstraňuje pevné nečistoty z roztoku. Při isokratické eluci se nemění v průběhu analýzy složení mobilní fáze, proto stačí pouze jeden zásobník. Pro gradientovou eluci je nutno použít více zásobníků, protože je při analýze programově měněno složení mobilní fáze.
- *Vysokotlaké čerpadlo (HPLC pump)* udržuje konstantní a plynulý tok mobilní fáze kolonou.

- *Dávkovací zařízení (Injector)* vstříkují určitá množství složitých vzorků do proudy mobilní fáze, která ho unáší na kolonu. V současné době se používají nejvíce autosamplery, které umožňují dávkovat naprogramované objemy z různých vial s různými vzorky bez obsluhy operátora.
- *Kolona (HPLC column)* je většinou dlouhá 10 - 25 cm a je zhotovena z nerezové oceli nebo ze skla. Vnitřek kolony je vyplněn stacionární fází. Zde dochází k separaci analytů ze směsi. Nejvíce se u HPLC používá jako náplň chemicky vázané stacionární fáze, kdy na hydroxylových skupinách silikagelu jsou navázány uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 nebo 8 uhlíkových atomů.
- *Detektor (Detector)* slouží k detekci analytů vycházejících z kolony. Sleduje fyzikální či chemické vlastnosti, kterými se analyt odlišuje od mobilní fáze. Detektor musí být vysoce citlivý a selektivní k danému analytu. V HPLC analýze se nejčastěji používají tyto typy detektorů:
 - *Spektrofotometrické detektory* jsou nejčastěji používané při analýze léčiv a jsou značně citlivé. Měří absorbanci elektromagnetického záření eluátu protékajícího celou detektorem. Detekuje v oblasti ultrafialového záření i v oblasti viditelného záření. Používají se detektory s fixní vlnovou délkou při měření nebo detektory, kde lze měnit vlnovou délku dle potřeby. Diode array detektor snímá celé absorpční spektrum a hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách.
 - *Fluorimetrické detektory* jsou použitelné u analytů vykazující fluorescenci. U nefluoreskujících látek lze použít vhodnou derivatizaci, při které se analyt vhodnými činidly převede na fluoreskující derivát. Detektory měří sekundární (emisní) záření, které analyt vydává po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření.
 - *Elektrochemické detektory* využívají probíhající elektrochemickou reakci na rozhraní elektroda-eluent. Analyt musí být schopen elektrochemické redukce nebo oxidace.
 - *Refraktometrické detektory* měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a analytem. Jsou prakticky univerzální, ale mají menší citlivost.
 - *Hmotnostní spektrometr (MS)* se v poslední době používá též jako detektor. Po výstupu eluátu z HPLC kolony je nutno odstranit mobilní fázi. Molekuly analytu v plynném stavu jsou pak ionizovány nárazy elektronů, termoionizací nebo elektroionizací. Tyto molekulární a fragmentární ionty jsou v magnetickém poli děleny dle hmotnosti a náboje. Výstupem je hmotnostní spektrum, což je četnost

iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů. Hmotnostní spektrometr jako detektor je vysoce selektivní, citlivý a umožňuje i identifikaci analytů.

- *Počítač (Data acquisition)* řídí a kontroluje všechny parametry HPLC systému (tlak, teplotu, sekvenci nástřiků) a zároveň zpracovává data z detektoru.^{20,21}

3.3.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která umožňuje současně kvalitativní a kvantitativní analýzu separovaných složek směsi. Vyznačuje se vysokou selektivitou, citlivostí a analýzou v relativně krátkém čase. Z HPLC záznamu můžeme vyčíst detailní informace o identitě, obsahu i čistotě analyzované látky.

Kvalitativní analýza slouží k identifikaci nebo důkazu určité látky ve vzorku. Základní charakteristikou je retenční (eluční) čas t_R . Je to čas mezi nástřikem vzorku na kolonu a maximem jeho chromatografického píku. Hodnota retenčního času závisí též na rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou. Důkazem přítomnosti látky ve vzorku je shoda retenčního času chromatografického píku analyzované látky s retenčním časem píku standardu.^{20,22}

Kvantitativní hodnocení slouží ke zjištění množství (koncentrace) analytu ve vzorku. Základní charakteristikou je plocha nebo výška chromatografického píku. Při vyhodnocování se nejčastěji používají tyto metody:²⁰

Metoda vnějšího standardu

Tato metoda se provádí ve dvou krocích. Nejdříve se nastříkne na kolonu roztok analyzované látky. Po této analýze se nastříkne roztok vnějšího standardu, což zpravidla bývá standard stanovované látky označovaný jako CRL (chemická referenční látka). Koncentrace analytu se pak vypočítá z poměru plochy (výšky) píku analytu a plochy (výšky) píku vnějšího standardu.²⁰

Metoda vnitřního standardu

Tato metoda je méně časově náročná a je přesnější, protože není zatížena chybou, která může vzniknout v důsledku dvojího nástřiku. Spočívá v přidání definovaného objemu roztoku vnitřního standardu ke známému objemu vzorku. Tento roztok se pak nastříkuje na kolonu. Koncentrace analytu se vypočítá z poměru plochy (výšky) píku analytu a plochy (výšky) píku vnitřního standardu. Důležitým krokem je vhodný výběr vnitřního standardu. Ten musí být

eluován v blízkosti píku analytu, nesmí s analytem interagovat a musí mít podobnou koncentraci a strukturu jako analyt.²⁰

Metoda normalizace

Při této metodě se vypočítá obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech z plochy píku nebo píků jako procento celkové plochy všech píků na chromatogramu. Do celkové plochy všech píků se nezapočítávají píky rozpouštědel nebo píky, které mají plochu pod limitem zanedbatelnosti.¹

Kalibrační postup

Při kalibraci se stanovuje vztah mezi naměřeným signálem a množstvím analyzované látky. Z dat se vypočítá kalibrační přímka, z které se odečítají množství (hmotnost, koncentrace) stanovovaných látek.¹

3.4. Chromatografické podmínky pro stanovení piroxikamu kapalinovou chromatografií uvedené v literatuře

Piroxikam lze stanovit kapalinovou chromatografií několika způsoby (Tabulka č.1).

Tabulka č.1: Možné chromatografické podmínky pro stanovení piroxikamu kapalinovou chromatografií

Metoda č. 1	
Stacionární fáze	HP ODS hypersil (10 cm x 3,9 mm ID, 5 µm)
Mobilní fáze	Pufř 0,05M NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O (pH 7,0 po úpravě 1M NaOH)/methanol 60:40
Detekce	UV při 254 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	25
Metoda č. 2	
Stacionární fáze	Silikagel C18 deaktivovaný pro bazické látky (25 cm x 4,6 mm, 5 µm)
Mobilní fáze	0,05M KH ₂ PO ₄ (pH 3,0 po úpravě H ₃ PO ₄)/acetonitril 60:40
Detekce	UV při 230 nm
Úprava vzorku	-
Zdroj literatury	1
Metoda č. 3	
Stacionární fáze	Novapak C18 (25 cm x 4,6 mm, 4 µm)
Mobilní fáze	0,1M acetát sodný/acetonitril/triethylamin 61:39:0,05 upraveno ledovou kys. octovou na pH 4
Detekce	UV při 330 nm
Úprava vzorku	Deproteinace acetonitrem a methanolem
Zdroj literatury	26
Metoda č. 4	
Stacionární fáze	Spherisorb ODS (25 cm x 4,6mm, 5 µm)
Mobilní fáze	0,04M Na ₂ HPO ₄ (pH 8 po úpravě H ₃ PO ₄)/methanol 60:40
Detekce	UV při 360 nm
Úprava vzorku	Deproteinace acetonitrem
Zdroj literatury	27

Metoda č. 5	
Stacionární fáze	Kromasil C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm)
Mobilní fáze	0,005M acetát amonný/methanol 20:80
Detekce	UV při 352 nm a 279 nm
Úprava vzorku	HF-LPME (mikroextrakce kapalnou fází na duté vlákno)
Zdroj literatury	28

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

- piroxikam, Sigma Aldrich, Německo
- isoxikam, Sigma Aldrich, Německo
- tenoxikam, Sigma Aldrich, Německo
- methanol, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- acetonitril, chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- kys. mravenčí, ACS reagent, Sigma Aldrich, Německo
- hydroxid sodný, Dr. Kulich Pharma, ČR
- kys. octová (99,8-100,5%), Sigma Aldrich, Německo
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, Penta , ČR
- octan sodný, Dr. Kulich Pharma, ČR
- triethylamin, Penta , ČR
- voda čištěná
- králíčí plasma

4.1.2. Sestava pro HPLC

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A₃ VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- chromatografická kolona: Nova-Pak (4 μ m) 150 x 3,9 mm, Waters

4.1.3. Přístroje

- držák pro SPME vlákna: Supelco, Bellefonte, USA
- SPME vlákno: PDMS-DVB Supelco, Bellefonte, USA

- digitální váhy: Sartorius AG typ A200S, Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetické míchadlo s míchadélky, IKA Color Squid, Německo

4.1.4. Pomůcky

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, zkumavky, stojan na zkumavky, laboratorní stojan, vialky a inserty, laboratorní lžičky, lodičky, stříčka, mikropipety, membránový filtr 0,45 μm

4.2. Příprava roztoků

4.2.1. Příprava standardů

Standardní roztok piroxikamu v methanolu:

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg piroxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. Tento roztok (0,1 mg/ml) byl dále ředěn methanolem na koncentrace 0,01mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

Z důvodu nesymetrie píku byl standardní roztok připraven s mobilní fází.

Standardní roztok piroxikamu v mobilní fázi:

Do 5 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg piroxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 1 ml tohoto roztoku byl ředěn mobilní fází (acetonitril/čištěná voda 30:70, pH 3 po úpravě kys. mravenčí) na koncentrace 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

Standardní roztok piroxikamu pro SPME:

Do 5 ml odměrné baňky bylo naváženo 50 mg piroxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu s přidavkem 0,1 ml hydroxidu sodného (1mol/l). Objem byl doplněn po rysku a

důkladně promíchán. Roztok byl dále ředěn čištěnou vodou na koncentraci 1mg/ml a 0,1 mg/ml. Tento standard byl použit do vzorků pro extrakci vláknem.

Standardní roztok isoxikamu v methanolu:

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg isoxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. Tento roztok (0,1 mg/ml) byl dále ředěn methanolem na koncentrace 0,01mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

Z důvodu nesymetrie píku byl standardní roztok připraven s mobilní fází.

Standardní roztok isoxikamu v mobilní fázi:

Do 5 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg isoxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 1 ml tohoto roztoku byl ředěn mobilní fází (acetonitril/čištěná voda 30:70, pH 3 po úpravě kys. mravenčí) na koncentrace 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

Standardní roztok isoxikamu pro SPME:

Do 5 ml odměrné baňky bylo naváženo 50 mg isoxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu s přídavkem 0,1 ml hydroxidu sodného (1mol/l). Objem byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. Roztok byl dále ředěn čištěnou vodou na koncentraci 1mg/ml a 0,1 mg/ml. Tento standard byl použit do vzorků pro extrakci vláknem.

Standardní roztok tenoxikamu v methanolu:

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg tenoxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. Tento roztok (0,1 mg/ml) byl dále ředěn methanolem na koncentrace 0,01mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

Z důvodu nesymetrie píku byl standardní roztok připraven s mobilní fází.

Standardní roztok tenoxikamu v mobilní fázi:

Do 5 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 mg tenoxikamu. Tato navážka byla rozpuštěna v methanolu. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. 1 ml tohoto roztoku byl ředěn mobilní fází (acetonitril/čištěná voda 30:70, pH 3 po úpravě kys. mravenčí) na koncentrace 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001mg/ml. Roztok byl nastříknut na kolonu.

4.2.2. Příprava pufru

Fosforečnanový pufr o pH 7,0:

Bylo naváženo 1,56 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného do 200 ml odměrné baňky. Tato navážka byla rozpuštěna ve vodě. Objem baňky byl doplněn po rysku a důkladně promíchán. pH bylo upraveno na hodnotu 7 pomocí hydroxidu sodného (1mol/l).

4.2.3. Příprava mobilních fází

Fosforečnanový pufr nebo čištěná voda byly smíchány s methanolem či acetonitrilem v jednotlivých poměrech. V některých případech bylo pH roztoku upraveno kyselinou mravenčí. Výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μm .

4.2.4. Příprava vzorků

Vodný vzorek:

Do 1,5 ml vody bylo mikropipetou přidáno 40 μl nebo 80 μl standardu piroxikamu pro SPME (0,1mg/ml) a 40 μl nebo 80 μl standardu isoxikamu pro SPME (0,1mg/ml) jako vnitřní standard. Pro zvýšení výtěžnosti extrakce se později ke vzorku přidávalo 5 μl kys. mravenčí (pH vzorku bylo 2,5). Bylo vyzkoušeno též místo kys. mravenčí použití 1% kys. octové (pH vzorku bylo 4).

Vzorek plasmy:

K 1,5 ml plasmy bylo mikropipetou přidáno 40 μ l nebo 80 μ l standardu piroxikamu pro SPME (0,1mg/ml) a 40 μ l nebo 80 μ l standardu isoxikamu pro SPME (0,1mg/ml) jako vnitřní standard. Pro zvýšení výtěžnosti extrakce se později ke vzorku přidávalo 5 μ l kys. mravenčí (pH vzorku bylo 2,5). Bylo vyzkoušeno též místo kys. mravenčí použití 1% kys. octové (pH vzorku bylo 4).

4.3. Chromatografické podmínky

Byly zkoumány různá složení a poměry mobilní fáze. Chromatografické podmínky byly vždy optimalizovány vzhledem k piroxikamu, tenoxikamu a isoxikamu. Tenoxikam a isoxikam byly testovány jako možné vnitřní standardy při stanovení piroxikamu. Byly nastříkovány standardní roztoky v methanolu. Nejdříve byla použita jako mobilní fáze směs fosforečnanového pufru o pH 7 a methanolu (60:40, pak 70:30 v/v) při průtoku 0,5 ml/min a teplotě 25°C. Poté bylo složení mobilní fáze změněno na směs čištěné vody a methanolu (40:60, poté 60:40 a 50:50 v/v), která byla upravena kyselinou mravenčí na pH 3, průtok byl zvýšen na 1 ml/min a teplota byla 25°C. Bylo vyzkoušeno též použití mobilní fáze o složení čištěná voda a acetonitril (50:50, pak 60:40 v/v), jejíž pH bylo pomocí kyseliny mravenčí upraveno na hodnotu 3. Průtok zůstal 1 ml/min. Při stejném průtoku a teplotě byla také testována jako mobilní fáze směs octanu sodného (0,1 mol/l), acetonitrilu a triethylaminu (61:39:0,05 v/v), která byla upravena ledovou kyselinou octovou na pH 4. Poté byla použita směs čištěné vody a acetonitrilu (70:30 v/v), jejíž pH bylo upraveno kyselinou mravenčí na hodnotu 3. Průtok byl 1 ml/min a teplota 25°C. Pak byl na kolonu nastříknut standardní roztok piroxikamu v mobilní fázi při těchto chromatografických podmínkách. Nadále již byly používány pouze standardní roztoky v mobilní fázi. Při tomto složení a průtoku mobilní fáze byla postupně zvyšována teplota (z 25°C na 30°C, 40°C a 50°C). Poté bylo změněno pH mobilní fáze z 3 na 4 pomocí kyseliny mravenčí. Poměr čištěné vody a acetonitrilu zůstal stejný (70:30 v/v), průtok byl též zachován na 1 ml/min. Byl testován vliv teploty (30°C, 40°C a 50°C) na retenční čas a symetrii píku. Dále byla zkoušena mobilní fáze skládající se z čištěné vody a acetonitrilu (70:30 v/v), o pH 2,5 přidáním kyseliny mravenčí. Průtok zůstal 1 ml/min a teplota byla 30°C. Poté byla použita jako mobilní fáze směs čištěné

vody a acetonitrilu (60:40 v/v), pH bylo kyselinou mravenčí upraveno na hodnotu 2,5. Stanovení probíhala při teplotách 30°C a 40°C. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1 ml/min.

4.4. Provedení mikroextrakce vláknem

PDMS-DVB vlákno bylo 20 minut aktivováno ponořením do methanolu. Methanol ve vialce byl neustále míchán na magnetickém míchadle. Magnetické míchadlo bylo umístěno na laboratorním stojanu, na kterém byl i uchycen držák SPME vlákna. Dále bylo vlákno ponořeno do vzorku plasmy nebo vodného vzorku. Zde se nechal analyt (piroxikam a vnitřní standard) sorbovat po dobu 20 minut při laboratorní teplotě za neustálého míchání na magnetickém míchadle. V některých případech bylo testováno použití kyseliny mravenčí na úpravu pH vzorku na hodnotu 2,5 a 1% roztoku kyseliny octové na úpravu pH vzorku na hodnotu 4. Po ukončení sorpce bylo vlákno desorbováno při laboratorní teplotě do 200 µl methanolu v insertu vialky. Desorpce trvala 20 minut. Po desorpci bylo k 200 µl methanolu přidáno 50 µl čištěné vody, jejichž pH bylo pomocí kyseliny mravenčí upraveno na hodnotu 2,5. Insert ve vialce byl uzavřen septem, důkladně promíchán a následně bylo desorpční médium hodnoceno pomocí HPLC. Vlákno po desorpci bylo čištěno 20 minut v methanolu za stálého míchání na magnetickém míchadle. Poté již bylo vlákno připraveno pro další extrakci.

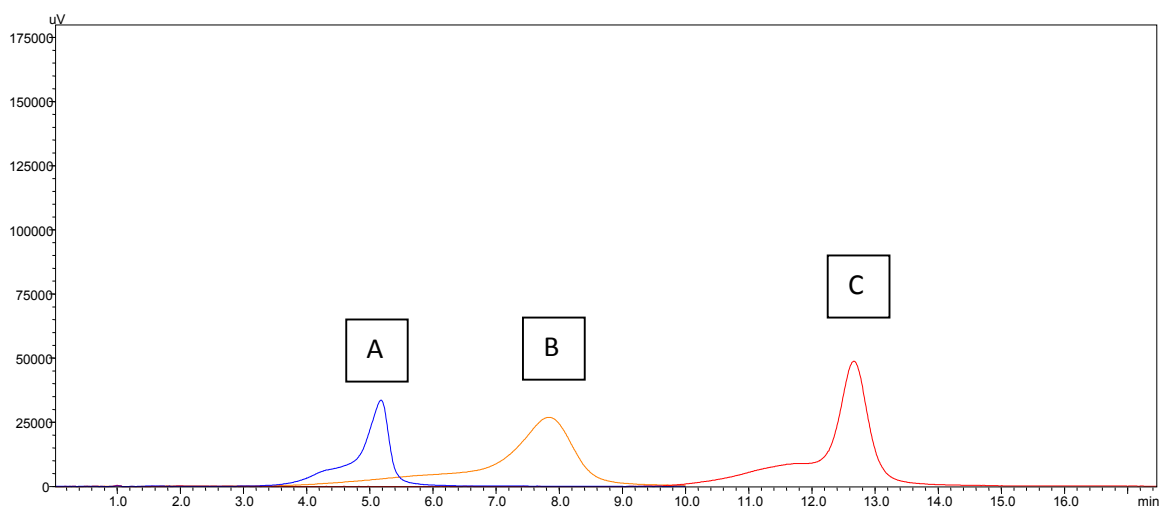
5. Výsledky a diskuse

5.1. Výběr chromatografických podmínek

Chromatografické podmínky byly hledány tak, aby bylo optimální rozlišení mezi píky piroxikamu a vnitřního standardu a aby píky byly symetrické.

Použití mobilní fáze skládající se z fosforečnanového pufru a methanolu (60:40 a 70:30) nebylo vhodné, protože pík piroxikamu byl nesymetrický.

Změna složení (voda a methanol (60:40), pH 3 pomocí kys. mravenčí) a zvýšení rychlosti průtoku mobilní fáze na 1 ml/min vedla k mírnému zlepšení, ale stále byly píky rozmyté. (viz obr. č. 4).



Obr. č. 4: Nástřik standardů tenoxikamu (A), piroxikamu (B) a isoxikamu (C) v methanolu (0,1 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a methanol (60:40), pH 3 pomocí kys. mravenčí

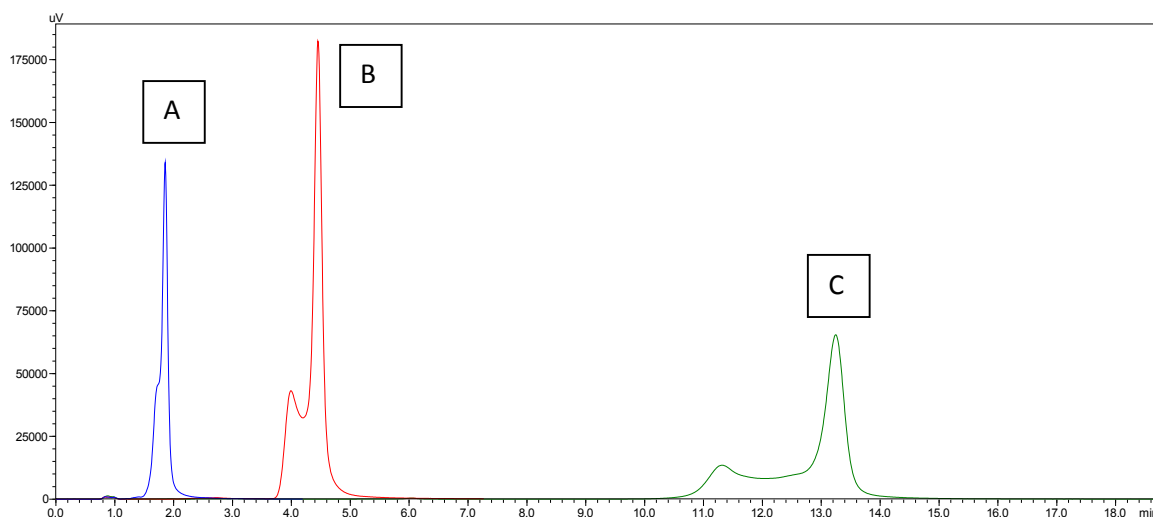
Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 25°C

Nástřik: 20 μ l

Úprava poměru složek mobilní fáze (50:50) vedla k dalšímu zlepšení tvaru píků a snížení retence tenoxicamu, piroxikamu, ale ne isoxicamu. Proto byl zaměněn methanol v mobilní fázi za acetonitril, což opět dle předpokladu vedlo ke zlepšení tvaru píků a snížení retence i isoxicamu. Vzhledem k výraznému zkrácení retenčního času tenoxicamu byl poměr složek vrácen na původní poměr voda a acetonitril 60:40 (viz. obr. č. 5)



Obr. č. 5: Nástřik standardů tenoxicamu (A), piroxikamu (B) a isoxicamu (C) v methanolu (0,1 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 3 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

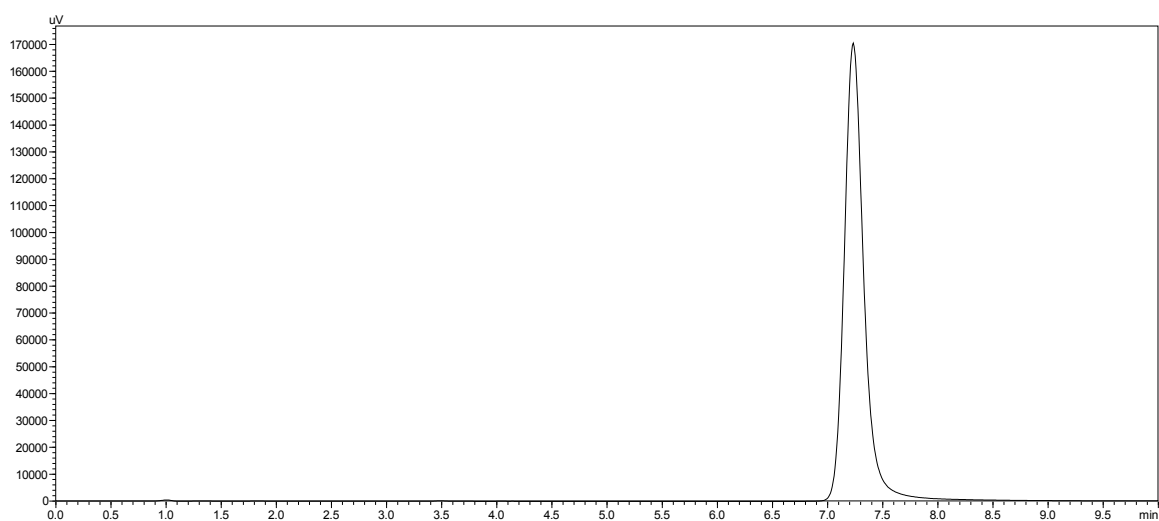
UV detekce při 333 nm

Teplota: 25°C

Nástřik: 20 µl

Testování jiné mobilní fáze (0,1M octan sodný, acetonitril a triethylamin (61:39:0,05), upraveno ledovou kys. octovou na pH 4) nevedlo k lepší symetrii píků, docházelo k tzv. frontingu.

Kvůli štěpení píků všech látek byla hledána vhodnější rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků. Použitím standardního roztoku ředěného mobilní fází došlo k výraznému zlepšení tvaru a symetrie píků (viz. obr. č. 6) a nadále byly používány pouze tyto standardy.



Obr. č. 6: Nástřik standardu piroxikamu v mobilní fázi (0,1 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (70:30), pH 3 pomocí kys. mravenčí

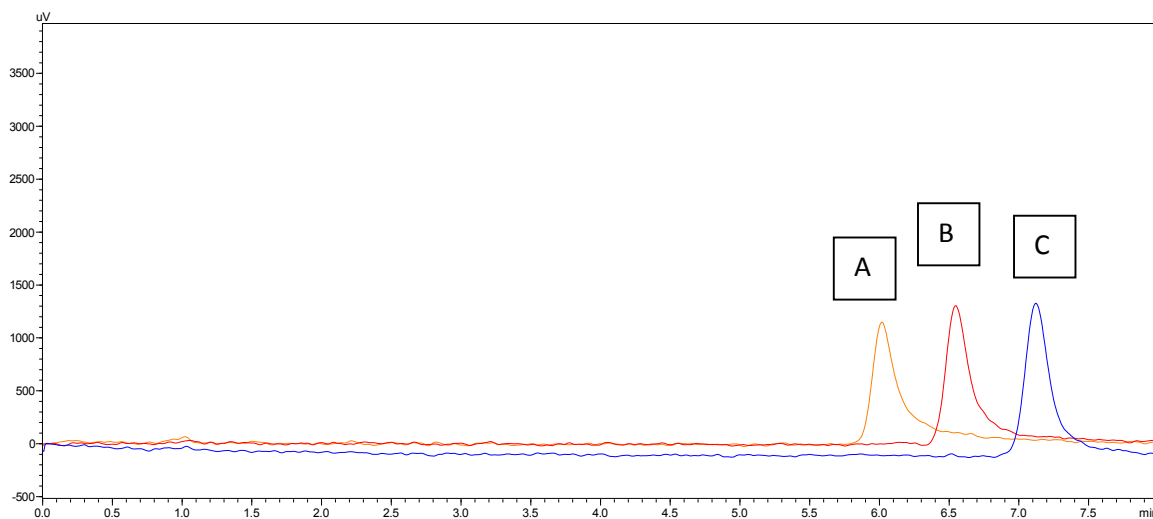
Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 25°C

Nástřik: 20 μ l

Jako další způsob optimalizace chromatografických podmínek byly testovány různé teploty. Zvýšením teploty na koloně došlo ke zkrácení retenčních časů píků (viz. obr. č. 7, č. 8 a č. 9).



Obr. č. 7: Nástřik standardu piroxikamu v mobilní fázi (0,001 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (70:30), pH 3 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

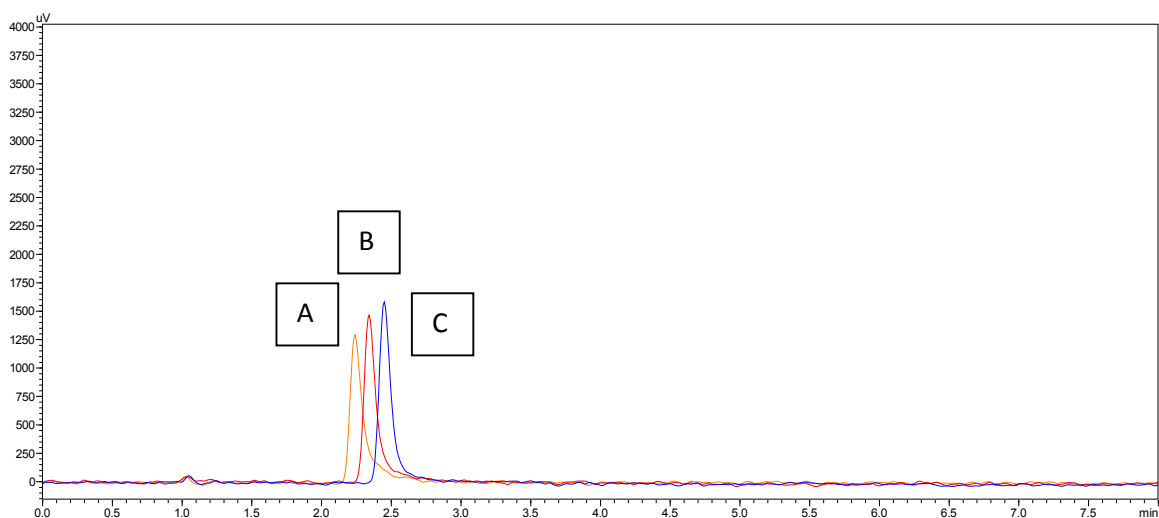
UV detekce při 333 nm

A: Teplota: 50°C

B: Teplota: 40°C

C: Teplota: 30°C

Nástřik: 20 μ l



Obr. č. 8: Nástřik standardu tenoxikamu v mobilní fázi (0,001 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (70:30), pH 3 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

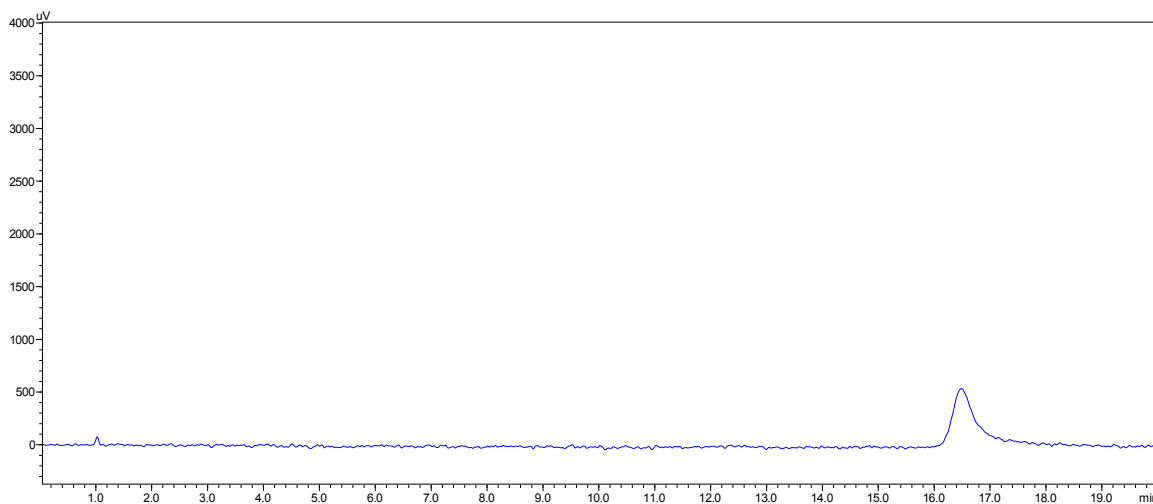
A: Teplota: 50°C

B: Teplota: 40°C

C: Teplota: 30°C

Nástřik: 20 μ l

Vzhledem k vysoké retenci isoxikamu byla teplota kolony testována jen při 50°C. Při nižších teplotách byla doba analýzy dlouhá a pík rozmytý.



Obr. č. 9: Nástřik standardu isoxikamu v mobilní fázi (0,001 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (70:30), pH 3 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

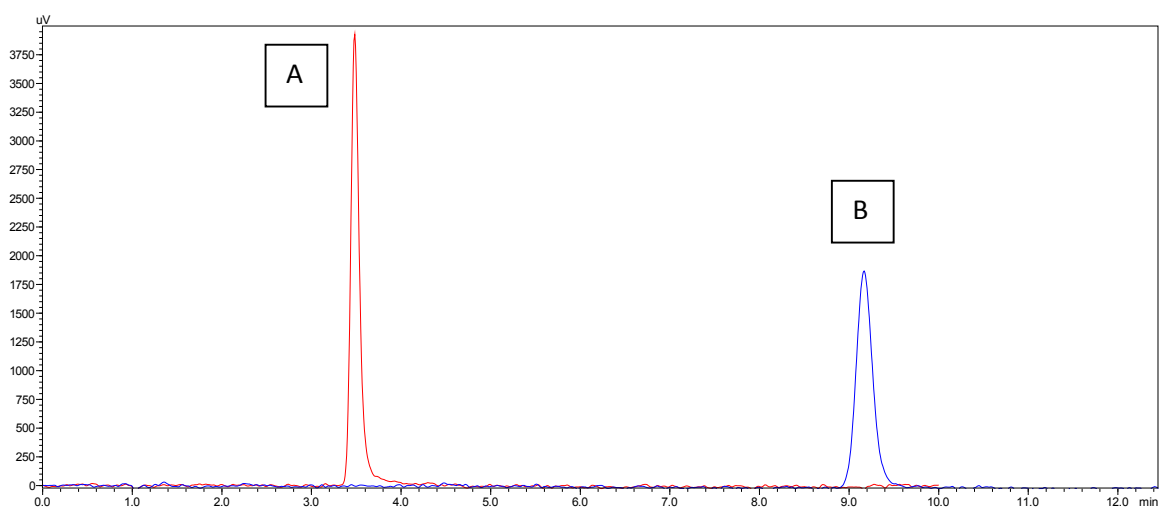
UV detekce při 333 nm

Teplota: 50°C

Nástřik: 20 μ l

Dále byl sledován vliv pH mobilní fáze. Zvýšením pH na hodnotu 4 nedošlo k žádnému zlepšení, naopak snížením pH na hodnotu 2,5 byly píky všech látek symetrické. Zvýšením poměru organické fáze z 30 na 40 se všechny látky eluovaly do 10 minut.

Jako vnitřní standard pro další měření byl vybrán isoxikam, protože tenoxicam měl krátký retenční čas a mohl by se eluovat spolu s balasty z plasmy. Píky isoxikamu a piroxikamu byly separovány s dostatečným rozlišením (viz. obr. č. 10)



Obr. č. 10: Nástřik standardu piroxikamu (A) a isoxikamu (B) v mobilní fázi (0,001 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

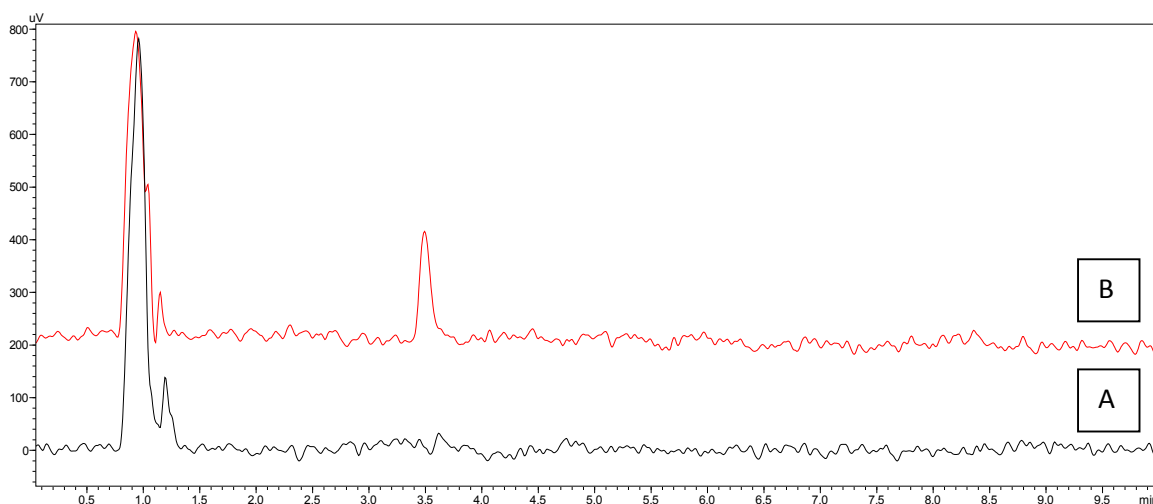
UV detekce při 333 nm

Teplota: 30°C

Nástřik: 20 μ l

5.2. Výběr podmínek pro SPME

Byla provedena mikroextrakce vláknem z prázdné plasmy a z plasmy s piroxikamem o koncentraci 0,01 mg/ml. Žádný pík balastů neinterferoval s píkem piroxikamu (viz. obr. č.11).



Obr. č. 11: Chromatogram mikroextrakce čisté plasmy (A) a mikroextrakce plasmy s piroxikamem (0,01 mg/ml) (B)

Vzorek pro sorpci: A - 5 ml plasmy

B - 4,5 ml plasmy + 0,5 ml 0,1 mg/ml piroxikamu

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

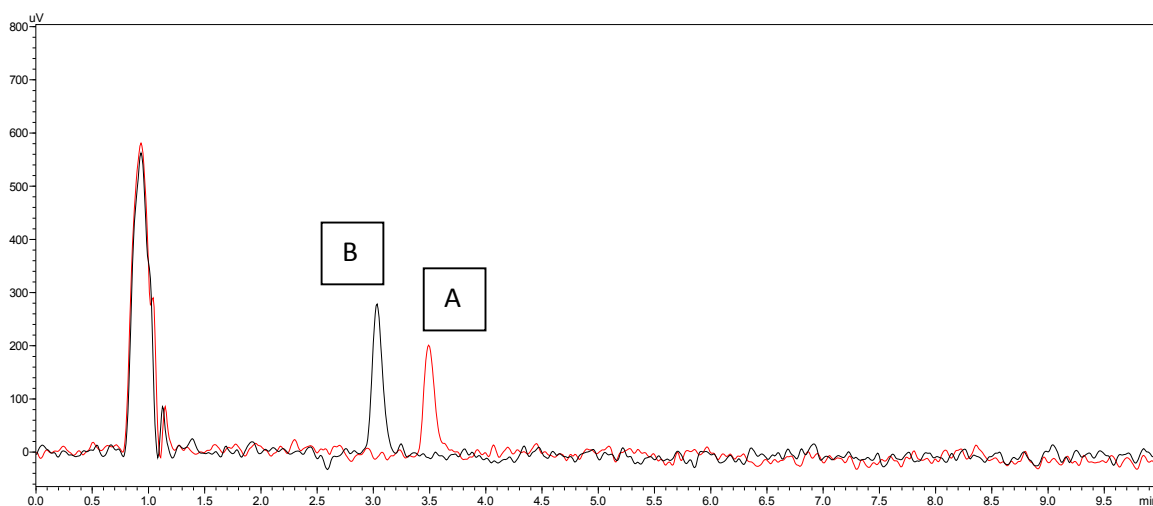
Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 30°C

Nástřík: 20 μ l

Dále byl vyzkoušen vliv teploty kolony na změnu retenčního času píku. Retenční čas se při vyšší teplotě zkrátil a tím byla urychlena i doba analýzy vzorku. Zároveň nedocházelo k interferenci s píky balastů (viz. obr. č. 12). Proto byla pro další analýzy používána teplota 40°C.



Obr. č. 12: Chromatogram mikroextrakce plasmy s piroxikamem (0,01 mg/ml)

Vzorek pro sorpci: 4,5 ml plasmy + 0,5 ml 0,1 mg/ml piroxikamu

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

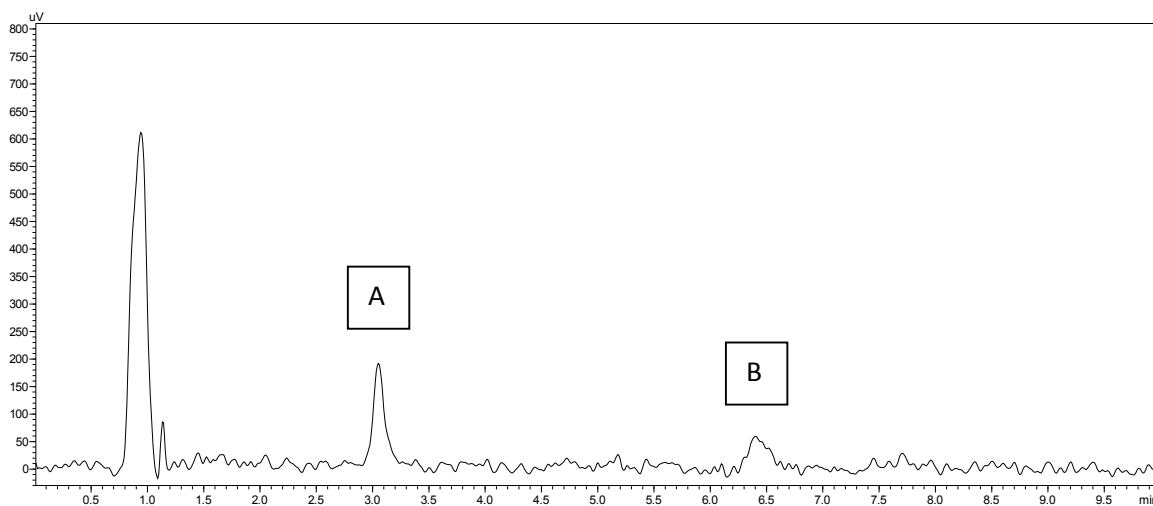
UV detekce při 333 nm

Teplota: A - 30°C

B - 40°C

Nástřík: 20 µl

Byla provedena mikroextrakce vláknem z vody s piroxikamem a vnitřním standardem isoxikamem. Koncentrace ve vodě obou látek byla 5 µg/ml. Píky piroxikamu a isoxikamu byly oddělené (viz. obr. č. 13).



Obr. č. 13: Chromatogram mikroextrakce vody s piroxikamem (A) a isoxikamem (B)

Vzorek pro sorpci: 1,5 ml čištěné vody + 8 µl piroxikamu (1 mg/ml)

+ 8 µl isoxikamu (1 mg/ml)

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

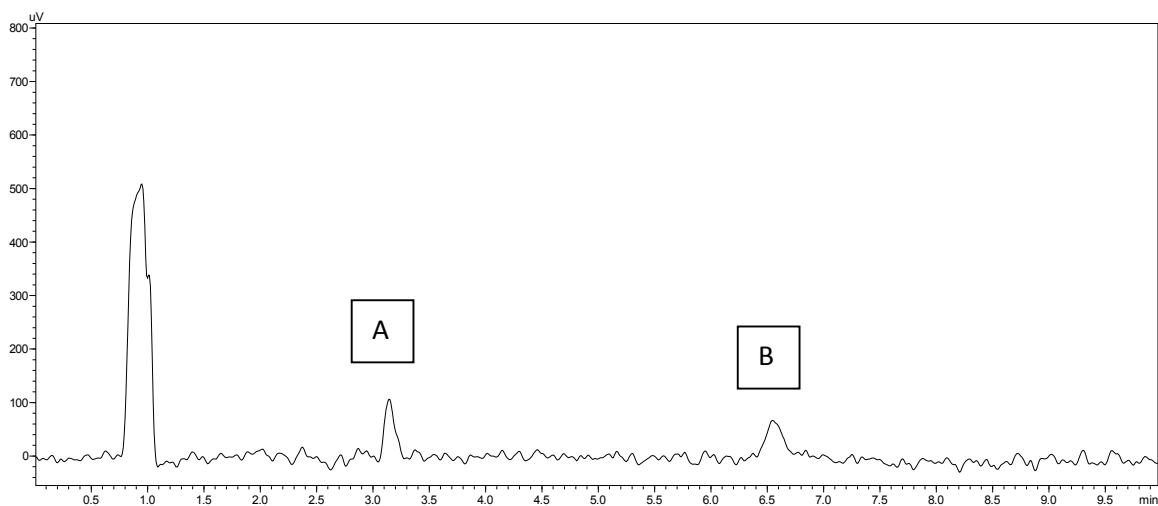
Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 40°C

Nástřík: 20 µl

Přidáním 5 μ l 1% kyseliny octové bylo upraveno pH plasmy na hodnotu 4, protože bylo očekáváno zvýšení výtěžnosti extrakce díky ionizaci piroxikamu. Nicméně při pH 4 nedošlo ke zvýšení výtěžnosti (viz. obr. č. 14).



Obr. č. 14: Chromatogram mikroextrakce plasmy s piroxikamem (A) a isoxicamem (B)

Vzorek pro sorpci: 1,5 ml plasmy + 80 μ l piroxikamu (0,1 mg/ml)

+ 80 μ l isoxicamu (0,1 mg/ml)

+ 5 μ l 1% kyseliny octové

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

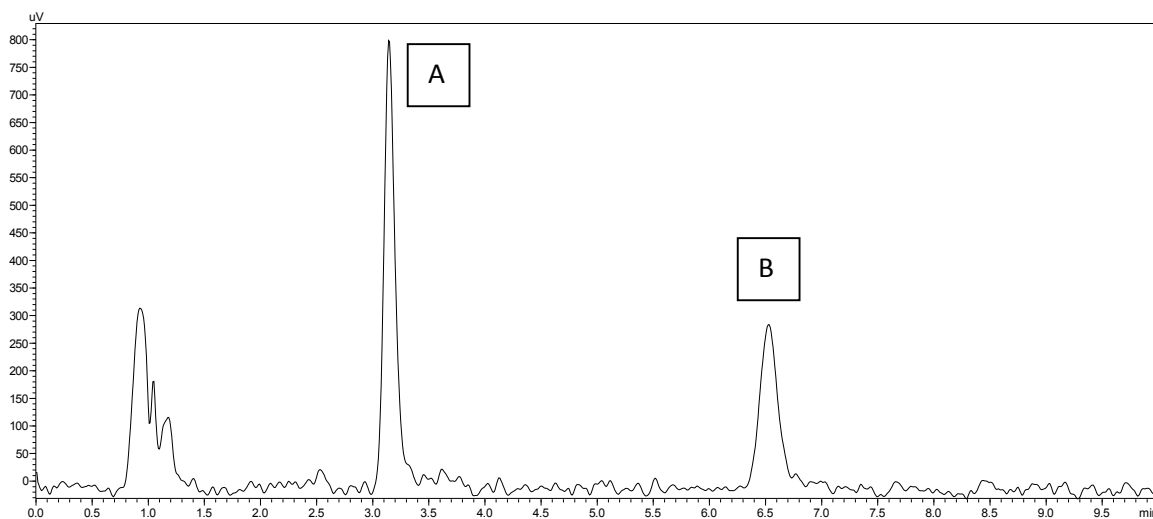
Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 40°C

Nástřik: 20 μ l

Bylo vyzkoušeno též přidání 5 μ l kyseliny mravenčí ke vzorku plasmy. Hodnota pH vzorku potom byla 2,5. Koncentrace piroxikamu a isoxikamu byla 5 μ g/ml. Přídavkem kyseliny mravenčí došlo k výraznému zvýšení výtěžnosti mikroextrakce (viz. obr. č. 15).



Obr. č. 15: Chromatogram mikroextrakce plasmy s piroxikamem (A) a isoxikamem (B)

Vzorek pro sorpci: 1,5 ml plasmy + 80 μ l piroxikamu (0,1 mg/ml)

+ 80 μ l isoxikamu (0,1 mg/ml)

+ 5 μ l kyseliny mravenčí

Mobilní fáze: voda a acetonitril (60:40), pH 2,5 pomocí kys. mravenčí

Průtoková rychlost: 1 ml/min

UV detekce při 333 nm

Teplota: 40°C

Nástřík: 20 μ l

5.3. Kvantitativní a detekční limit

Byl vypočítán detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ) pro piroxikam. Detekční limit je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, která se nestanovuje kvantitativně. Vyjadřuje se jako koncentrace analyzované látky, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 3.²⁰

$$\text{LOD}_{(\text{piroxikam})} = 0,44 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Kvantitativní limit je nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Vyjadřuje se jako koncentrace, při které se poměr signálu k šumu rovná hodnotě 10.²⁰

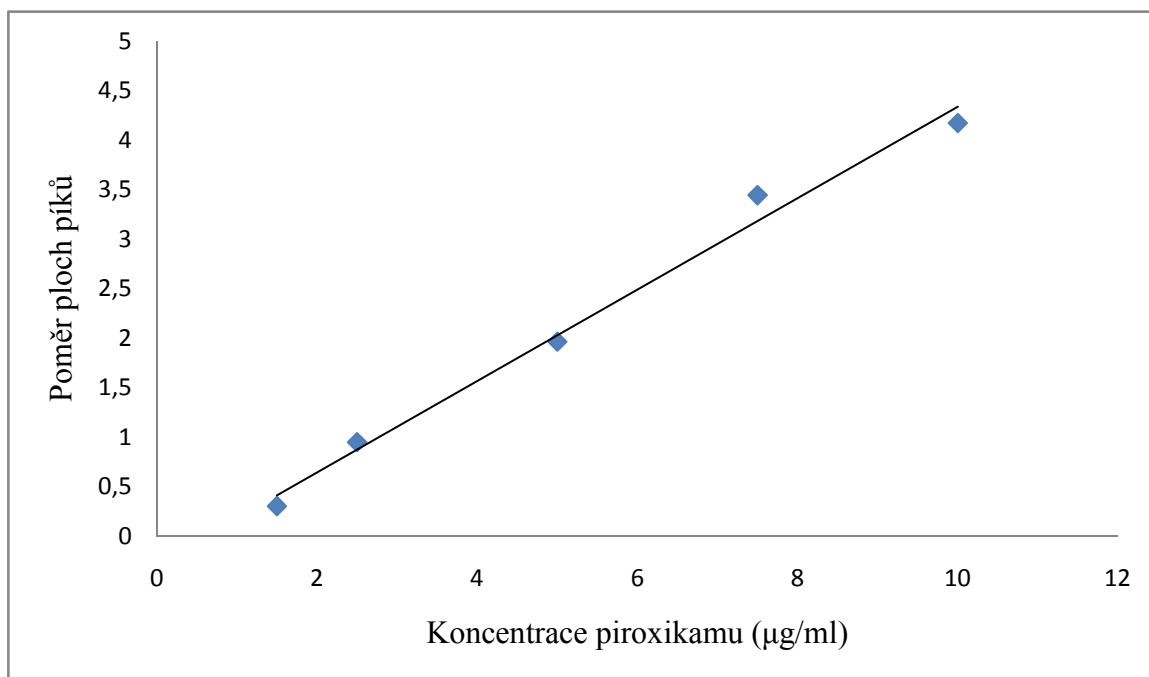
$$\text{LOQ}_{(\text{piroxikam})} = 1,46 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

5.4. Kalibrační přímka

Pro sestavení kalibrační přímky bylo použito 5 vzorků plasmy. Koncentrace piroxikamu se postupně zvyšovala (1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml a 10 µg/ml), koncentrace vnitřního standardu isoxikamu byla stále 5 µg/ml a neměnil se ani přídavek 5 µl kyseliny mravenčí. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Koncentrace piroxikamu	Plocha píku piroxikamu	Průměrná plocha píků piroxikamu	Plocha píku isoxikamu	Průměrná plocha píků isoxikamu	Poměr ploch píků piroxikamu/isoxikamu
1,5 µg/ml	1231	1260	4191	4148	0,303761
	1365		4137		
	1184		4116		
2,5 µg/ml	2313	2342	2403	2467	0,949331
	2385		2445		
	2329		2553		
5 µg/ml	5779	5708	2898	2907	1,963536
	5661		2860		
	5684		2962		
7,5 µg/ml	12083	12118	3475	3521	3,441636
	12040		3576		
	12231		3513		
10 µg/ml	12065	12261	2616	2941	4,168990
	12364		2935		
	12354		2972		

Tab. č. 2: Hodnoty kalibrační přímky



Obr. č. 16: Graf kalibrační přímky

Rovnice kalibrační přímky pro mikroextrakci piroxikamu z plasmy:

$$y = 0,4618 x - 0,2818$$

Korelační koeficient = 0,9890

6. Závěr

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se piroxikamu, způsobů extrakce léčiv z biologických materiálů a vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
2. Byla optimalizována vhodná metoda pro stanovení piroxikamu pomocí HPLC s UV detekcí.
3. Pro stanovení piroxikamu byla vybrána metoda s použitím mobilní fáze složené z čištěné vody a acetonitrilu (60:40 v/v), která byla upravena kyselinou mravenčí na hodnotu pH 2,5. Pro separaci byla použita kolona (Nova-Pak 4 μ m, 150 x 3,9 mm). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a teplota na koloně byla 40°C. Vlnová délka byla nastavena na 333 nm.
4. Jako vnitřní standard byl vybrán isoxikam.
5. Byly optimalizovány podmínky mikroextrakce na tuhé fázi.
6. Sorpce piroxikamu ze vzorku plasmy upravené kyselinou mravenčí na pH 2,5 trvala 20 min, stejně jako následná desorpce do 200 μ l methanolu. K získanému roztoku bylo přidáno 50 μ l okyselené čištěné vody (pH 2,5).
7. Byla ověřena selektivita stanovení.
8. Limit detekce pro piroxikam je 0,44 μ g/ml a limit kvantifikace se rovná 1,46 μ g/ml.
9. Byla sestrojena kalibrační přímka. Linearita byla ověřena korelačním koeficientem (0,9890).
10. Ostatní validační parametry budou předmětem další práce.
11. Tato práce byla prezentována formou posteru na 42. konferenci Syntéza a analýza léčiv ve Velkých Karlovicích 2013 (viz. příloha č. 1).

7. Literatura

1. *Český lékopis 2009*, Grada Publishing, a.s.: Praha, 2009
2. Výpis z databáze SPC přípravku Piroxikam AL 20, aktualizováno 31.3.2010
3. Lüllmann H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*, překlad 15., zcela přepracované vydání; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2005
4. <http://www.sukl.cz/> (accessed Sep 22, 2013)
5. Prabu, S. L; Suriyaprakash, T. N. K. *Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review: Applied Biological Engineering - Principles and Practice* [online]; InTech, 2012; <http://www.intechopen.com/books/applied-biological-engineering-principlesand-practice/extraction-of-the-drug-from-the-biological-matrix> (accessed Sep 22, 2013)
6. Extrakce na tuhou fázi, firemní materiály Sigma Aldrich
7. Sochor, J. *Monitorování lékových hladin* [přednáška]. Hradec Králové, FaF UK, 2012
8. Lucci, P.; Pacetti, D.; Núñez, O.; Frega, N. G. *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* [online]; InTech, 2012; <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis> (Nov 5, 2013)
9. Wardencki W., Curylo J., Namieśnik J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2007**, 70, 275–288
10. Lord, H., Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A.* **2000**, 885, 153–193
11. Juntinga, L., Peng, Ch., Suzukib, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Science International.* **1998**, 97, 93–100
12. SPME-Mikroextrakce tuhou fází, firemní materiály Sigma Aldrich, 2002
13. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A.* **2000**, 902, 167–194
14. Ormsby, M. Analysis of laminated documents using solid-phase microextraction. *Journal of the American Institute for Conservation* [online] **2005**, 44, 13-26. http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic44-01-002_2.html (accessed December 15, 2013)
15. Chunfeng Duan, Zheng Shen, Dapeng Wu, Yafeng Guan. Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry.* **2011**, 30, 1568-1574
16. Musteata, F. M., Pawliszyn, J. Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry.* **2007**, 26, 36-45

17. Theodoridis, G., Kosterb, E. H. M., de Jongb, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological sample. *Journal of Chromatography B*. **2000**, 745, 49–82
18. Bojko, B., Cudjoe, E., Gomez-Rios, G. A., Gorynski, K., Jiang, R., Reyes-Garces, N., Risticvic, S., Silva, E. A. S., Togunde, O., Vuckovic1, D., Pawliszyn, J. SPME – Quo vadis?. *Analytica Chimica Acta*. **2012**, 750, 132– 151
19. Silva, E. A. S., Risticvic, S., Pawliszyn, J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *Trends in Analytical Chemistry*. **2013**, 43, 24-36
20. Klimeš, J. a kol. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*; Nucleus: Hradec Králové, 2011
21. Kazakevich, Y. LoBrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2007
22. <http://www.hplc.cz/> (accessed Jan 6, 2014)
23. Hage, D. S., Anguizola, J. A. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2012**, 69, 93– 105
24. Czaplicki, S. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds: Column Chromatography*, [online]; InTech, 2013; <http://www.intechopen.com/books/column-chromatography/chromatography-in-bioactivity-analysis-of-compounds> (accessed Jan 4, 2014)
25. Basan, H., Goger, N. G., Ertas, N., Orbey, M. T. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam- β -cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2001**, 26, 171–178
26. Dadashzadeh, S., Vali, A. M., Rezagholi, N. LC determination of piroxicam in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2002**, 28, 1201–1204
27. Edno, L., Bressolle, F., Combe, B., Galtier, M. A reproducible and rapid HPLC assay for quantitation of piroxicam in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **1995**, 13, 785-789
28. Xin-Yue Song, Yan-Ping Shi, Juan Chen. A novel extraction technique based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber solid/liquid microextraction for the measurement of piroxicam and diclofenac combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*. **2012**, 100, 153-161

8. Přílohy

VÝVOJ METODY STANOVENÍ PIROXIKAMU V PLAZMĚ

Pilařová Pavla, Kastner Petr, Kuželová Kristýna, Sochor Jaroslav, Klimeš Jiří
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; pilarova@faf.cuni.cz

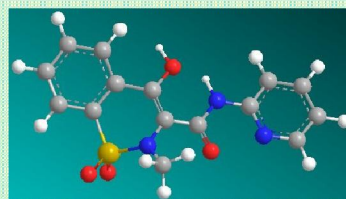
Úvod

Práce se zabývá vývojem HPLC metody pro stanovení piroxikamu v plazmě s využitím solid phase mikroextraction (SPME).

Piroxikam je oxikamové nesteroidní antiflogistikum a analgetikum, které znižuje bolesti vyvolané zánětem, otoky a zároveň inhibuje ADP-indukovanou agregaci trombocytů, je indikován k symptomatické léčbě osteoartrózy, revmatoidní artritidy nebo ankylozující spondylitidy. Po p.o. podání se piroxikam částečně resorbuje v žaludku a úplně v duodenu. Maximální koncentrace v plazmě dosahuje za 2-3 h. Vázba na bílkoviny plazmy je cca 98%. Průměrný poločas eliminace je okolo 50 hodin. Piroxikam se metabolizuje v játrech (hydroxylace pyridinového řetězce, konjugace s kyselinou glukuronovou). Vzniklé produkty jsou neúčinné a vylučují se převážně ledvinami a částečně žlučí. Pouze 2-5% piroxikamu je vyloučeno ledvinami v nezměněné podobě. Obvyklá denní dávka je 20 mg piroxikamu.

Cíl

- optimalizace podmínek analýzy piroxikamu
- výběr vnitřního standardu
- optimalizace podmínek izolace analytů z plazmy s pomocí SPME
- ověření vybraných validačních parametrů - linearita, selektivita, LOQ a LOD



Experimentální podmínky

Kapalinový chromatograf Shimadzu 20

Počítačový program použitý pro vyhodnocení: software LC Solution 1.22

Stacionární fáze byla C18 - Waters Nova-Pak® C18 3,9 × 150 mm, 4μm.

Byly zkoumány různé složení, poměry a rychlosti průtoku mobilní fáze (MeOH, ACN s pufrů o různém pH a přísady iontopárových činidel) a teplota na koloně.

Vybrané podmínky:

Mobilní fáze: acetonitril : voda upravená kyselinou mravenčí na pH 2,5

40 : 60

Průtok: 1 ml.min⁻¹

Teplota: 40 °C

Detekce: UV při 333 nm

Nástrik: 20μl

IS: isoxikam

SPME

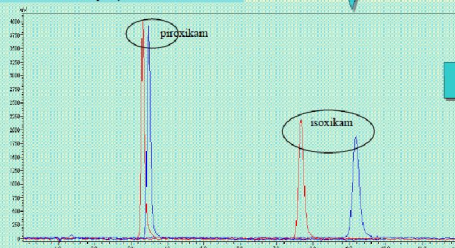
Vlákno - vrstva polydimethyl-síloxan/divinylbenzenu (Supelco)

Byly testovány různé doby adsorpce, desorpce, úprava pH plazmy popř. vysolování.

Vybrané podmínky izolace:

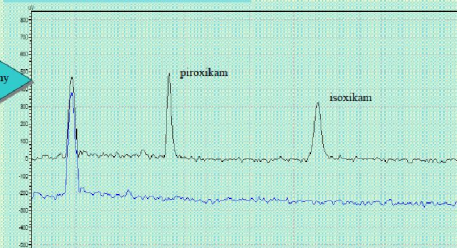
- 20 min sorpce 1,5 ml králičí plazmy okyselené kyselinou mravenčí
- 20 min desorpce do 200 μl methanolu
- přidáno 50 μl vody pH 2,5 uprav. kys. mravenčí k extraktu
- vzniklý analyt byl hodnocen optimalizovanou HPLC metodou

Vliv teploty na koloně



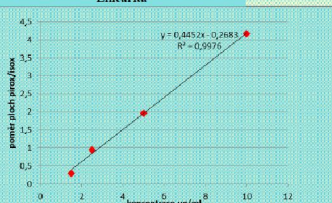
HPLC záznam standardů piroxikamu a IS isoxikamu ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) při teplotě 30 °C - modrá barva; 40 °C - červená barva
ACN : voda pH 2,5 kys. mravenčí (40 : 60)

SPME a Selektivita



Charakteristický HPLC chromatogram sledovaných analytů a plazmy po SPME, ACN : voda pH 2,5 kys. mravenčí (40 : 60) při 40°C
Piroxikam (c v plazmě = $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); Isoxikam (c v plazmě = $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$);
spikovaná plazma - černá barva
čistá plazma - modrá barva

Linearita



Závěr

- byly optimalizovány HPLC podmínky stanovení piroxikamu a vnitřního standardu isoxikamu: ACN : voda pH 2,5 kys. mravenčí (40 : 60) při 40°C, 1 ml.min⁻¹, UV detekce při 333 nm
- byly vybrány podmínky izolace: 20 min sorpce 1,5 ml králičí plazmy okyselené kyselinou mravenčí a 20 min desorpce do 200 μl methanolu
- byla ověřena linearita ($r^2 = 0,9976$) a selektivita stanovení,
- byl stanoven LOD ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a LOQ ($1,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Příloha č. 1: Poster prezentovaný na 42. konferenci Syntéza a analýza léčiv ve Velkých Karlovicích 2013

ABSTRAKT

ANALYTICKÉ HODNOCENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ VI.

Diplomová práce

Kristýna Kuželová

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

Byla optimalizována metoda stanovení piroxikamu v králičí plasmě pomocí mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí. Pro mikroextrakci bylo použito vlákno potažené PDMS/DVB. Jako vnitřní standard byl vybrán isoxikam. Vzorek plasmy byl upraven na hodnotu pH 2,5. Mikroextrakce se skládala z 20 minut sorpce a 20 minut desorpce do 200 μ l methanolu. Separace byla provedena na koloně s reverzní fází C18. Jako mobilní fáze byl použit roztok čištěné vody a acetonitrilu (60:40 v/v), upravený kyselinou mravenčí na hodnotu pH 2,5. Průtok kolonou byl 1 ml/min a teplota na koloně 40°C. Hodnocení probíhalo při 333 nm. Byla ověřena linearita a selektivita metody. Také byl stanoven limit detekce a kvantifikace pro piroxikam.

ABSTRACT

ANALYTICAL EVALUATION OF ACTIVE SUBSTANCES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY VI.

Diploma Thesis

Kristýna Kuželová

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

The method for determination of the piroxicam in rabbit plasma using solid phase microextraction (SPME) and high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection was optimized. Fiber coated with PDMS/DVB was used for microextraction. Isoxicam was chosen as an internal standard. The sample of plasma was adjusted to pH 2,5. Microextraction was composed of 20 minutes sorption and 20 minutes desorption into 200 μ l of methanol. Column with reversed phase C18 was used for separation. A solution of water and acetonitrile (60:40 v/v) was used as the mobile phase. Its pH was adjusted to 2,5 using formic acid. The flow rate was 1 ml/min and temperature on the column was set at 40°C. The detection was carried out at 333 nm. Linearity and selectivity of the method were verified. Detection and quantification limits for piroxicam were also determined.