

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKEJ CHÉMIE A FARMACEUTICKEJ ANALÝZY

Využitie kvapalinovej chromatografie vo farmaceutickej analýze III.

Diplomová práca

Agáta Babinská

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní tejto práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci adekvátne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 20. apríla 2018

.....

Agáta Babinská

Na tomto mieste by som rada poďakovala mojej školiteľke PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a venovaný čas. Ďalej by som chcela poďakovať doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. a všetkým pracovníkom Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy za vrúcne jednanie a pomoc.

Experimentálna časť diplomovej práce bola podporovaná Univerzitou Karlovou v rámci projektu SVV 260 401 a vypracovaná v období od roku 2015 do roku 2018.

Obsah

Abstrakt v slovenskom jazyku	7
Abstrakt v anglickom jazyku	8
1. Úvod.....	9
2. Cieľ	11
3. Teoretická časť.....	13
3.1. Kvetiapín a jeho metabolity	14
3.1.1. Kvetiapín fumarát	14
3.1.2. Aktívne metabolity	16
3.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC).....	19
3.2.1. Charakteristika HPLC	19
3.2.2. Princíp chromatografických separácií	19
3.2.3. Zloženie kvapalinového chromatografu	20
3.2.4. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza.....	22
3.3. Stacionárne fázy v HPLC analýze.....	24
3.3.1. Silikagel	24
3.3.2. Stacionárne fázy na báze kovových oxidov.....	25
3.3.3. Stacionárne fázy na báze ZrO ₂	28
3.3.4. Modifikované stacionárne fázy na báze ZrO ₂	29
3.4. Izolácia liečiv z biologického materiálu	33
3.4.1. Deproteinácia (DPP)	33
3.4.2. Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE).....	34
3.4.3. Extrakcia tuhou fázou (SPE).....	35
3.4.4. Nové materiály využívané v bioanalýze.....	36
3.5. Validácia bioanalytických metód.....	37
3.5.1. Selektivita	37

3.5.2.	Limit detekcie a kvantifikácie.....	37
3.5.3.	Správnosť.....	38
3.5.4.	Presnosť.....	38
3.5.5.	Extrakčná účinnosť.....	39
3.5.6.	Linearita.....	39
3.5.7.	Stabilita.....	40
3.5.8.	Robustnosť.....	40
3.6.	Chromatografické podmienky pre stanovenie kvetiapínu a jeho metabolitov v literatúre.....	41
3.7.	Úprava biologického materiálu pred HPLC analýzou v literatúre.....	42
4.	Experimentálna časť.....	43
4.1.	Chemikálie, prístroje a pomôcky.....	44
4.1.1.	Použité chemikálie.....	44
4.1.2.	Zostava pre HPLC.....	45
4.1.3.	Použité prístroje.....	45
4.1.4.	Pomôcky.....	45
4.2.	Obečné postupy.....	46
4.2.1.	Príprava roztokov.....	46
4.2.2.	Deproteinácia.....	47
4.2.3.	LLE.....	47
4.2.4.	Príprava mobilnej fázy.....	49
4.2.5.	Príprava HPLC systému pred analýzou.....	52
4.2.6.	Východiskové chromatografické podmienky.....	52
4.2.7.	Vývoj HPLC analýzy.....	53
4.2.8.	Vývoj úpravy biologickej vzorky pred analýzou.....	54
5.	Výsledky a diskusia.....	55
5.1.	Optimalizácia chromatografických podmienok.....	56

5.1.1.	Využitie octanového tlmivého roztoku ako súčasť MF	56
5.1.2.	Využitie 25mM roztoku kyseliny octovej ako súčasť MF	61
5.1.3.	Využitie 10mM roztoku kyseliny octovej ako súčasť MF	71
5.1.4.	Využitie 10mM roztoku TFA ako súčasť MF	72
5.1.5.	Vývoj HPLC analýzy s využitím kombinovaných MF	72
5.1.6.	Výsledná HPLC analýza	79
5.2.	Optimalizácia úpravy biologickej vzorky pred HPLC analýzou	80
5.2.1.	Deproteinácia	80
5.2.2.	LLE	80
5.2.3.	Výsledná LLE	82
5.3.	Validácia metódy	83
5.3.1.	Selektivita	83
5.3.2.	Limit detekcie a kvantifikácie.....	84
5.3.3.	Linearita	84
5.3.4.	Správnosť	88
5.3.5.	Presnosť	95
5.3.6.	Extrakčná účinnosť	102
5.3.7.	Stabilita	102
5.3.8.	Robustnosť	103
5.3.9.	Zhrnutie validácie	104
6.	Záver	106
7.	Zoznam použitých skratiek	109
8.	Použitá literatúra	112

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Kandidát: Agáta Babinská

Školiteľ: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Využitie kvapalinovej chromatografie vo farmaceutickej analýze III.

Témou tejto diplomovej práce bolo bioanalytické hodnotenie kvetiapínu a jeho dvoch aktívnych metabolitov 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Separácia prebiehala na zirkóniovej kolóne ZirChrom®-PBD (150x4,6 mm, 5 µm). Bol testovaný vplyv rôznych mobilných fáz, sily a pH tlmivého roztoku, ako aj vplyv rôzneho zastúpenia organickej zložky (ACN) v mobilnej fáze na retenčné správanie týchto troch analyzovaných látok.

Výsledná mobilná fáza sa skladala z dvoch zložiek:

- MF A – octanový tlmivý roztok, 6mM, pH 4,0:ACN v pomere 90:10 (v/v)
- MF B – 10mM roztok TFA, pH 1,9:ACN v pomere 40:60 (v/v)

Prietok mobilnej fázy kolónou bol 1 ml/min, teplota bola nastavená na 30°C. Detekcia analyzovaných látok prebiehala pri 254 nm. Bola využitá gradientová elúcia.

Analyzované látky boli izolované z plazmy pomocou LLE, ktorá bola následne validovaná podľa FDA a ICH. Ako vnútorný štandard bol použitý flunitrazepam. Sledovanými parametrami bola selektivita, správnosť, presnosť, extrakčná účinnosť, linearita, robustnosť, detekčný a kvantitatívny limit a stabilita.

Abstrakt

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Agáta Babinská

Tutor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Name of Degree Paper: Use of liquid chromatography in pharmaceutical analysis III.

The purpose of this thesis was bioanalytical evaluation of quetiapine and its two biologically active metabolites 7-hydroxyquetiapine and norquetiapine using High Performance Liquid Chromatography.

Separation was performed on zirconia reversed-phased column ZirChrom®-PBD (150x4,6 mm, 5 µm). The retention behaviour of those three analytes was examined at different types of mobile phase, changing strength and pH of buffer and changing levels of organic compound (ACN) in eluent.

The finally mobile phase consisted of two components:

- MF A – acetate buffer, 6mM, pH 4,0:ACN in a ratio 90:10 (v/v)
- MF B – 10mM trifluoroacetic acid, pH 1,9:ACN in a ratio 40:60 (v/v)

The flow rate was 1 ml/min, the temperature was set at 30°C. The detection was carried out at 254 nm. The separation was performed by gradient elution.

The analytes were isolated from plasma using LLE. LLE was validated according to FDA and ICH. Flunitrazepam was used as the internal standard. Specificity, accuracy, precision, recovery, linearity, robustness, limit of detection a quantification and stability were monitored.

1. Úvod

Kvetiapín patrí do skupiny účinných látok nazývaných antipsychotiká. Používa sa na liečbu ochorení, ako sú schizofrénia, mánia, bipolárna porucha. Najčastejšie liekové formy sú tablety s predĺženým alebo s bežným uvoľňovaním. Kvetiapín je metabolizovaný v pečeni na viacero metabolitov, z ktorých najvýznamnejšie sú 7-hydroxykvetiapín a norkvetiapín. Tieto metabolity vykazujú podobnú farmakodynamickú aktivitu ako kvetiapín, preto je dôležité ich monitorovať spolu s kvetiapienom.

Analýza liečiv v biologickom materiáli zabezpečuje kontrolu správnej farmakoterapie pre pacienta, dostatočnú účinnú dávku v plazme a zamedzuje toxickému vplyvu daného liečiva pri prekročení maximálnej tolerovanej dávky. Jej súčasťou je izoláciu látok z biologických materiálov, pričom využíva rôzne metódy. Medzi najčastejšie používané metódy patrí deproteinácia, extrakcia liečiva do organického rozpúšťadla či extrakcia tuhou fázou.

Koncentrácia liečiva sa ďalej stanovuje pomocou rôznych inštrumentálne-analytických metód. Medzi najčastejšie používané metódy patrí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ktorá má mnoho výhod. Okrem toho, že umožňuje kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu, je rýchla, citlivá, selektívna a poskytuje nám možnosť automatizácie celého procesu.

Neoddeliteľnou súčasťou vývoja novej metódy je jej validácia, ktorá overuje správnosť ako aj vhodnosť danej metódy k zamýšľanému použitiu.

2. Cieľ

Cieľom tejto diplomovej práce je nájsť čo najvhodnejšie podmienky na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu z plazmy vhodnou izoláciou týchto látok z biologickej matrice a následnou analýzou za použitia HPLC systému s využitím zirkóniovej kolóny a UV detekcie.

Vývoj HPLC analýzy bude zahŕňať skúmanie retencie uvedených analyzovaných látok v izokratickom móde pri rôznych chromatografických podmienkach na danom type kolóny s následným vývojom a optimalizáciou gradientovej analýzy na základe získaných výsledkov.

Vývoj izolácie analyzovaných látok z plazmy bude zahŕňať stanovenie vnútorného štandardu a porovnávanie extrakčných účinností jednotlivých postupov izolácie, ktoré budú vytvorené na základe získaných informácií z odbornej literatúry. Získaná bioanalytická metóda bude validovaná podľa oficiálnych smerníc.

3. Teoretická část'

3.1. Kvetiapín a jeho metabolity

3.1.1. Kvetiapín fumarát

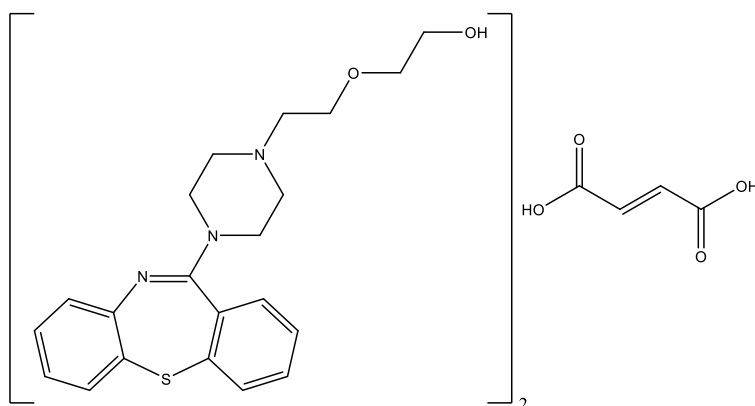
Systematický názov: bis(2-{2-[4-(dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]-ethoxy}ethan-1-ol-(2E)-but-2-endionát ¹

Sumárny vzorec: (C₄₆H₅₄N₆O₈S₂) ¹

Molekulová hmotnosť: 883,10 ¹

Kvetiapín (Quet) je biely alebo takmer biely prášok, ktorý je ťažko rozpustný vo vode, bezvodnom etanole a metanole. ¹

Základom chemickej štruktúry kvetiapínu je dibenzothiazepínový skelet, ktorý má na sebe naviazaný substituovaný piperazín.



Obr. 1 Kvetiapín fumarát ²

Mechanizmus účinku

Kvetiapín je antipsychotikum druhej generácie, ktoré patrí do skupiny MARTA. Je to predovšetkým antagonist na serotonínových receptoroch 5-HT_{2A} a podstatne slabšie blokuje dopamínové receptory D₂ a D₁. Menej intenzívnejšia blokáda receptorov D₂ tak vysvetľuje nižší výskyt extrapyramidových nežiadúcich účinkov a miernejšie zvýšenie hladiny prolaktínu. Okrem toho má vysokú afinitu k histamínovým receptorom H₁, k adrenergným receptorom α₁ a nízku afinitu k adrenergným receptorom α₂

a k serotonínovým receptorom 5-HT_{1A}. Kvetiapín nemá významnú afinitu k cholinergným muskarínovým ani benzodiazepínovým receptorom.^{3,4}

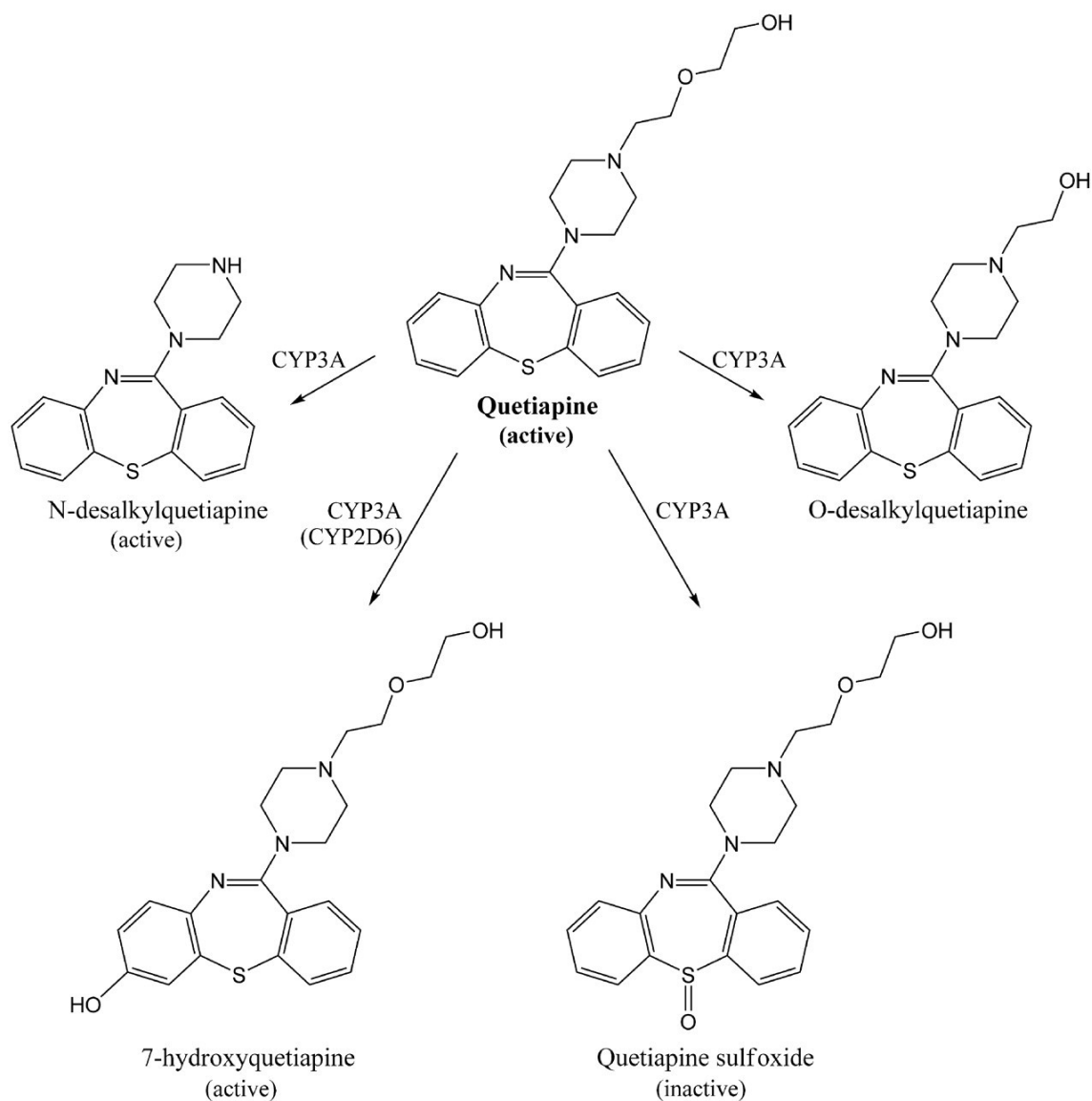
Metabolizmus

Menej než 1 % podanej látky sa vylučuje v nezmenenej forme, čo naznačuje, že kvetiapín je výrazne metabolizovaný. Najpodstatnejšia časť metabolizmu prebieha v pečeni sulfoxidáciou, hydroxyláciou, *N*- a *O*-dealkyláciou a oxidáciou na karboxylovú kyselinu. Primárne je metabolizovaný enzýmami CYP3A4/5 (z 89 %) a CYP2D6 (z 9 %) systému cytochrómu P 450. Medzi významné aktívne metabolity patrí 7-hydroxykvetiapínu a *N*-desalkylkvetiapín (norkvetiapín). Norkvetiapín je hlavným aktívnym metabolitom kvetiapínu (35 %), ktorý je zodpovedný v značnej miere za jeho antidepresívny účinok. Metabolizmus kvetiapínu in vitro je naznačený na *Obr. 2*.^{5,6}

Indikácie

Liečivé prípravky s obsahom kvetiapínu, ako účinnej látky, sa používajú:

- na liečbu schizofrénie,
- na liečbu bipolárnej afektívnej poruchy:
 - na liečbu stredne ťažkých až ťažkých manických epizód pri bipolárnej afektívnej poruche,
 - na liečbu epizód veľkej depresie pri bipolárnej afektívnej poruche,
 - na prevenciu návratu ochorenia u pacientov s bipolárnou afektívnou poruchou, ktorých manická alebo depresívna epizóda reagovala na liečbu kvetiapínom.⁷



Obr. 2 Metabolizmus kvetiapínu in vitro⁸

3.1.2. Aktívne metabolity

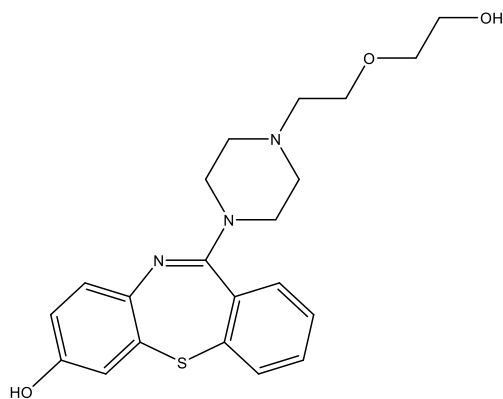
V Tab. 1 sú zhrnuté základné fyzikálne a chemické parametre popisujúce kvetiapín, norkvetiapín a 7-hydroxykvetiapín. Kvetiapín a 7-hydroxykvetiapín majú porovnateľné vlastnosti a približne rovnakú molekulovú hmotnosť. 7-hydroxykvetiapín je hydrofilnejší. Norkvetiapín sa výraznejšie odlišuje od týchto látok. Je bázickejší, má výrazne nižšiu hydrofilitu a menšiu molekulovú hmotnosť.^{9, 10, 11}

Tab. 1 Porovnanie fyzikálnych a chemických vlastností kvetiapínu, norkvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu^{9, 10, 11}

	Kvetiapín	7-hydroxykvetiapín	Norkvetiapín
Mr	383,51	399,51	295,40
pKa	14,41 (pKa K); 6,74 (pKa B)	11,18 (pKa K); 6,73(pKa B);	8,55(pKa B)
H akceptory	5	6	3
H donory	1	2	1
log P	2,60	2,00	4,04

7-hydroxykvetiapín

7-hydroxykvetiapín (7-OH_Quet) je aktívny metabolit kvetiapínu. Od kvetiapínu sa líši naviazaním OH skupiny v polohe 7 dibenzothiazepínového skeletu. Vzhľadom k nízkej koncentrácii v plazme pravdepodobne nehrá významnú rolu v metabolizme kvetiapínu.⁸

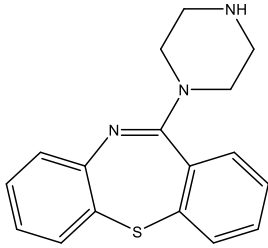


Obr. 3 7-hydroxykvetiapín¹²

Norkvetiapín

Norkvetiapín (Nor_Quet), tiež známy ako *N*-desalkylkvetiapín, je kľúčovým metabolitom kvetiapínu. Na rozdiel od predchádzajúcich látok nemá postranný reťazec na piperazíne, je to lipofilnejšia a bázickejšia látka. Bázický charakter získava vďaka prítomnosti sekundárnej aminoskupiny v štruktúre piperazínu.^{8, 13}

Je metabolizovaný pomocou enzýmu CYP3A4 cytochrómu P 450. Má podobnú antidopaminergnú aktivitu a vyššiu antiserotonergnú aktivitu v porovnaní s materskou látkou. Okrem toho inhibuje noradrenergý transportér a je parciálnym agonistom receptora 5-HT_{1A}. Pôsobí aj na muskarínové receptory ako antagonista, čím sa môžu vysvetľovať nežiadúce účinky, ako napr. sucho v ústach, zadržiavanie moču či mydriáza.¹³



Obr. 4 Norkvetiapín¹⁴

3.2. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

3.2.1. Charakteristika HPLC

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia sa v súčasnosti považuje za jednu z najprogresívnejších analytických metód, preto nachádza svoje uplatnenie vo všetkých oblastiach analýzy liečiv. Je veľmi často využívaná pri analýze nečistôt v mnohých liekopisných monografiách.

Medzi výhody HPLC analýzy patrí:

- a) možnosť kvalitatívnej aj kvantitatívnej analýzy;
- b) automatizácia celého procesu;
- c) vysoká citlivosť metódy;
- d) minimálne množstvo vzorku pre stanovenie;
- e) možnosť použitia rôznych detektorov;
- f) možnosť analýzy zložitých zmesí.^{15, 16}

3.2.2. Princíp chromatografických separácií

K separáciám dochádza na základe interakcií jednotlivých látok analyzovanej zmesi so stacionárnou a mobilnou fázou. Stacionárna fáza (SF) je nepohyblivá, umiestnená v kolóne, má schopnosť jednotlivé zložky zmesi na základe ich vlastností zadržiavať. Mobilná fáza (MF) je pohyblivá, do systému privádzaná pomocou vysokotlakového čerpadla, znižuje zadržiavanie analytu na SF. Po priechode analyzovanej zmesi kolónou sú jej jednotlivé zložky zaznamenávané pomocou vhodného detektoru. Výsledkom tohto zložitého procesu interakcií látok so SF a MF sú záznamy závislosti intenzity signálu jednotlivých zložiek zmesi na čase nazývané chromatogramy.¹⁶

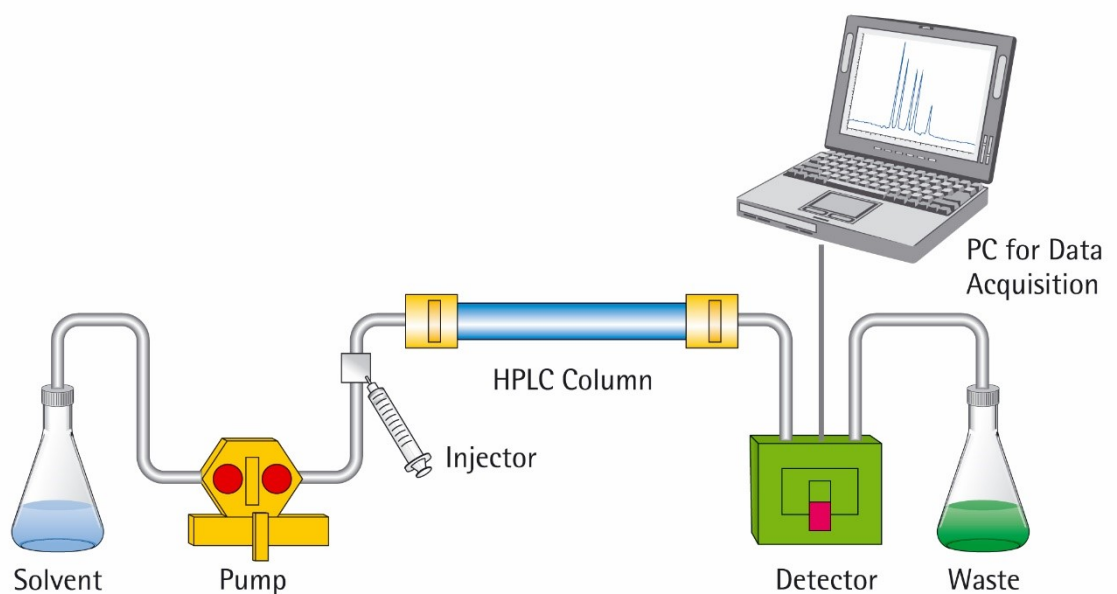
Analýza zmesi látok pomocou chromatografických metód je ovplyvnená povahou SF a MF. Ak majú látky podobné fyzikálne a chemické vlastnosti, najvhodnejšou

metódou je izokratická analýza. Pri tejto analýze sa zloženie MF, teplota ani ďalšie parametre počas analýzy nemenia. V opačnom prípade, pri výrazne odlišných vlastnostiach jednotlivých zložiek zmesi, je vhodnejšou metódou gradientová analýza, pri ktorej sa napr. zloženie MF v priebehu analýzy mení. ^{15, 16}

Chromatografické metódy môžeme rozdeliť na základe rôznych požiadaviek:

- a) podľa MF: kvapalinová, plynová alebo superkritická fluidná chromatografia;
- b) podľa usporiadania: plošná (TLC) alebo kolónová chromatografia;
- c) podľa separačného procesu: adsorpčná, rozdeľovacia, ionexová, afinitná alebo gélová chromatografia;
- d) podľa podmienok separácie: izokratická alebo gradientová elúcia;
- e) podľa usporiadania stacionárnej a mobilnej fázy:
 - chromatografia na normálnych fázach (NP-LC) – stacionárna fáza je polárna, mobilná fáza nepolárna;
 - chromatografia na reverzných fázach (RP-LC) – stacionárna fáza je nepolárna a mobilná fáza polárna. ^{15, 16}

3.2.3. Zloženie kvapalinového chromatografu



Obr. 5 Schematické znázornenie HPLC systému ¹⁷

- Zásobník pre mobilnú fázu (*Solvent*) – je to väčšinou sklenená nádoba, ktorá zabezpečuje dostatočné množstvo MF pre analýzu. V zásobníku MF sú umiestnené špeciálne filtre (kovový alebo teflonový) zachycujúce tuhé častice pred vstupom do HPLC systému. Zásobníky musia byť vhodne uzatvorené, aby nedošlo k vyparovaniu MF ani ku kontaminácii MF časticami z okolitého prostredia. Dôležitým krokom úpravy MF pred vstupom do chromatografického systému je jej odplynenie, ktoré zabezpečuje najčastejšie vákuový odplyňovač, prebublávanie héliom, pôsobenie ultrazvuku alebo ich kombinácia. Odplynenie je dôležité hlavne preto, aby pri zmene tlaku na výstupe z chromatografickej kolóny alebo v kolóne nedochádzalo k uvoľneniu bublínok rozpustených plynov.^{15, 16}
- Vysokotlakové čerpadlá (*Pump*) – zabezpečujú transport MF z jej zásobníka. Musia spĺňať pomerne vysoké požiadavky. Základnou vlastnosťou každého čerpadla je stabilný prietok mobilnej fázy.^{15, 16}
- Dávkovač vzorku (*Injector*) – je zariadenie umožňujúce nástrek vopred definovaného objemu analyzovaného vzorku. V súčasnosti sú používané manuálne dávkovače na princípe prepínacích ventilov alebo automatické dávkovače rôznej konštrukcie (tzv. autosampler), ktoré sú používané v ďaleko väčšej miere.^{15, 16}
- Kolóna (*HPLC column*) – je rovná trubica s hladkým vnútorným povrchom s dĺžkou 5–25 cm a vnútorným priemerom 3–5 mm zhotovená najčastejšie z nerezovej oceli alebo zo skla. Je vyplnená sorbentom, ktorý zabezpečuje separáciu analyzovanej zmesi. Tieto hodnoty platia pre klasickú HPLC analýzu.^{15, 16}
- Detekčné systémy (*Detector*) – sú umiestnené za chromatografickou kolónou a zaznamenávajú rozdiel medzi signálom čistej mobilnej fázy a mobilnej fázy obsahujúcej analyzovanú látku. Detektory môžeme rozdeliť na deštruktívne a nedeštruktívne. V deštruktívnych detektoroch sa analyzovaná zložka ireverzibilne mení, zatiaľ čo v nedeštruktívnych detektoroch nedochádza k chemickej zmene analyzovanej zložky.^{15, 16, 18}
- Vyhodnocovacie zariadenie (*PC for Data Acquisition*) – je ním väčšinou počítač s vhodným programom, ktorý umožňuje zbieranie, spracovávanie a analýzu získaných dát. Okrem toho umožňuje nastavenia chromatografických podmienok a ich kontrolu.^{15, 16}
- Odpadová nádoba (*Waste*) – zbiera mobilnú fázu spolu so zložkami analyzovanej zmesi po priechode chromatografickým systémom.^{15, 16}

3.2.4. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza

Medzi hlavné výhody HPLC analýzy patrí možnosť kvalitatívnej ako aj kvantitatívnej analýzy. Kvalitatívna analýza slúži k identifikácii jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi, zatiaľ čo kvantitatívna analýza nám dáva možnosť stanoviť množstvo danej látky v analyzovanej zmesi.

Kvalitatívna analýza

K identifikácii látok v HPLC systéme sú používané najčastejšie ich retenčné časy. Retenčný čas (t_R) je definovaný ako doba, ktorá uplynie od nástreku vzorku do HPLC systému až po maximum píku danej látky na chromatograme. Údaj o retenčnom čase je možné veľmi ľahko získať integráciou píku s využitím chromatografických vyhodnocovacích softvérov.¹⁹

Retenčný čas závisí na rozdielnej afinite analyzovanej látky k SF a MF, čo popisuje distribučná (rozdeľovacia) konštanta K_D .

$$K_D = c_s / c_m$$

c_s = koncentrácia analyzovanej látky v stacionárnej fáze

c_m = koncentrácia analyzovanej látky v mobilnej fáze

Na základe hodnoty tejto konštanty môžeme odhadnúť retenčné správanie sa analyzovanej látky v danom systéme. Čím je hodnota distribučnej konštanty pre danú látku vyššia, tým je väčšia afinita tejto látky k stacionárnej fáze a jej retenčný čas je dlhší.

Najčastejšie sa porovnáva retenčný čas hodnotenej analyzovanej vzorky a retenčný čas referenčného štandardu za použitia totožných chromatografických podmienok. Pretože tieto podmienky nemusia byť v praxi úplne zhodné, pripúšťa sa malá odchýlka, ktorá je v určitom stanovenom rozmedzí. Nevýhodou tejto metódy je možnosť prítomnosti viacerých látok s rovnakým retenčným časom, preto je táto metóda vhodná hlavne pre analýzu vzorku s majoritným množstvom hodnotenej látky.¹⁹

Kvantitatívna analýza

Základom kvantitatívnej analýzy je nájdenie vzťahu medzi plochou, prípadne výškou píku, a množstvom látky v stanovovanej zmesi. Pri tomto hodnotení sú väčšinou využívané metódy výpočtov z oblasti inštrumentálnej analýzy.

- **Metóda vonkajšieho štandardu** (*external standard method*): Koncentrácia stanovovanej látky sa určí porovnávaním plochy jej píku s plochou píku referenčného štandardu, ktorý je analyzovaný samostatne. Výpočet vychádza z predpokladu, že plocha píku je priamo úmerná koncentrácii látky štandardu aj vzorku.^{1, 16, 19}
- **Metóda vnútorného štandardu** (*internal standard method*): Táto metóda je podobná metóde vonkajšieho štandardu. Rozdiel spočíva v pridaní roztoku vnútorného štandardu (IS) k roztoku vzorku aj k roztoku štandardu, pričom pôvodná koncentrácia vnútorného štandardu musí byť známa. Vnútorný štandard je definovaný ako chemická látka, ktorá musí byť dobre oddelená od všetkých zložiek analyzovanej zmesi a jej pík by mal ležať v blízkosti píku stanovovanej látky. Okrem toho musí spĺňať mnoho ďalších kritérií, ako napr. dostatočná stabilita či primeraná čistota. Výhodou tejto metódy je eliminácia chýb spojených so zmenou pracovných podmienok, pretože stanovovaná látka aj vnútorný štandard sú ovplyvnené rovnako.^{1, 16, 19}
- **Metóda normalizácie**: Vyjadruje obsah stanovovanej látky ako percentuálny podiel stanovovanej látky z plôch všetkých píkov na chromatograme, pričom sa zanedbávajú píky rozpúšťadiel a píky pod limitom zanedbateľnosti. Táto metóda je často využívaná pri stanovovaní nečistôt.^{1, 16, 19}
- **Metóda kalibračnej krivky**: Pri tejto metóde je analyzovaná séria štandardov o známej, ale rôznej koncentrácii c_s . Následne je hľadaná závislosť kalibračnej funkcie. Neznámy obsah stanovovanej látky je určený pomocou analytickej vyhodnocovacej funkcie $c = f(X)$, kde X môže byť buď plocha, resp. výška píku, alebo pomer plôch, resp. výšok stanovovanej látky a IS.^{1, 16, 19}

3.3. Stacionárne fázy v HPLC analýze

Stacionárna fáza je nepohyblivou zložkou chromatografického systému. Môže ju tvoriť tuhá látka alebo film kvapaliny zakotvený alebo chemicky naviazaný na tuhú maticu, ktorá sa nazýva nosič. Je to náplň chromatografickej kolóny, na ktorej dochádza k vlastnému separačnému procesu.¹⁵

Vlastnosti ideálnej SF sú:

- dlhodobá chemická stabilita voči agresívnym podmienkam;
- mechanická odolnosť pri zvýšenom tlaku;
- častice s úzkou disperzitou;
- veľký povrch;
- sférické póry, ktorých veľkosť by mala zodpovedať veľkosti analyzovanej látky;
- minimálne vymývanie v prípade polymérnych SF alebo povlakov.¹⁵

3.3.1. Silikagel

Silikagel (*silica*) je najrozšírenejším polárnym anorganickým sorbentom. Má najčastejšie amorfnú formu, ktorej zloženie je $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Samotný je vhodný pre chromatografické separácie na normálnych fázach a po chemickom naviazaní ligandov je vhodný pre separácie na reverzných fázach, ktoré sú jednoznačne najvýznamnejšie.^{15, 16}

Významnými vlastnosťami sú vysoká mechanická odolnosť a stabilita v prítomnosti organických rozpúšťadiel. Jeho nevýhodou je nízka stabilita pri extrémnych hodnotách pH a pri vysokých teplotách. Polymérne SF na báze silikagelu sú súčasťou RP-LC systému. Využívajú sa v širšom rozsahu pH, no ich nevýhodami sú často nízka mechanická odolnosť a vymývanie polyméru. V súčasnosti existuje veľké množstvo modifikovaných SF naviazaných na štruktúru silikagelu, ktoré dávajú široké možnosti v oblasti analýzy liečiv.^{16, 20}

3.3.2. Stacionárne fázy na báze kovových oxidov

Stacionárne fázy na báze kovových oxidov majú vysokú chemickú odolnosť, ktorá prekonáva stabilitu SiO_2 . Oxidy kovov používané v tejto oblasti sú Al_2O_3 , ZrO_2 a TiO_2 , pričom najpoužívanejším a najviac preštudovaným je oxid zirkoničitý.^{15,20}

Tieto SF spĺňajú niekoľko podmienok pre ideálnu SF, napr. monodisperzita častíc, štruktúra pórov, veľký povrch, mechanická odolnosť, vysoká účinnosť, chemická a tepelná stabilita.¹⁵

Vysoká tepelná odolnosť umožňuje separáciu látok pri zvýšenej teplote, ktorá má mnoho výhod. Umožňuje vyšší prietok, ktorý zrýchli analýzu. Pri zvýšenej teplote sa zvýši difúzny koeficient. Zvýšenie teploty z 20°C na 65°C môže skrátiť analýzu až 6-násobne. Závisí to však na type analyzovaných látok. Pri analýze látok s malým množstvom funkčných skupín (napr. polyaromatické uhľovodíky) nemá teplota výrazný vplyv na analýzu. Pri analýze látok s výrazne odlišnými funkčnými skupinami má zvýšená teplota výrazný vplyv na dĺžku analýzy.^{20, 21, 22}

Vďaka vysokej chemickej odolnosti získavajú kolóny tieto vlastnosti:

- dlhšia životnosť kolón;
- možnosť pracovať v celom rozsahu pH (1-14);
- možnosť pracovať pri vyšších teplotách (až do 200°C);
- menšie vymývanie ligandov (tzv. *column bleeding*);
- možnosť použitia MF s agresívnejšími zložkami;
- možnosť použitia agresívnejších podmienok na čistenie kolón.²⁰

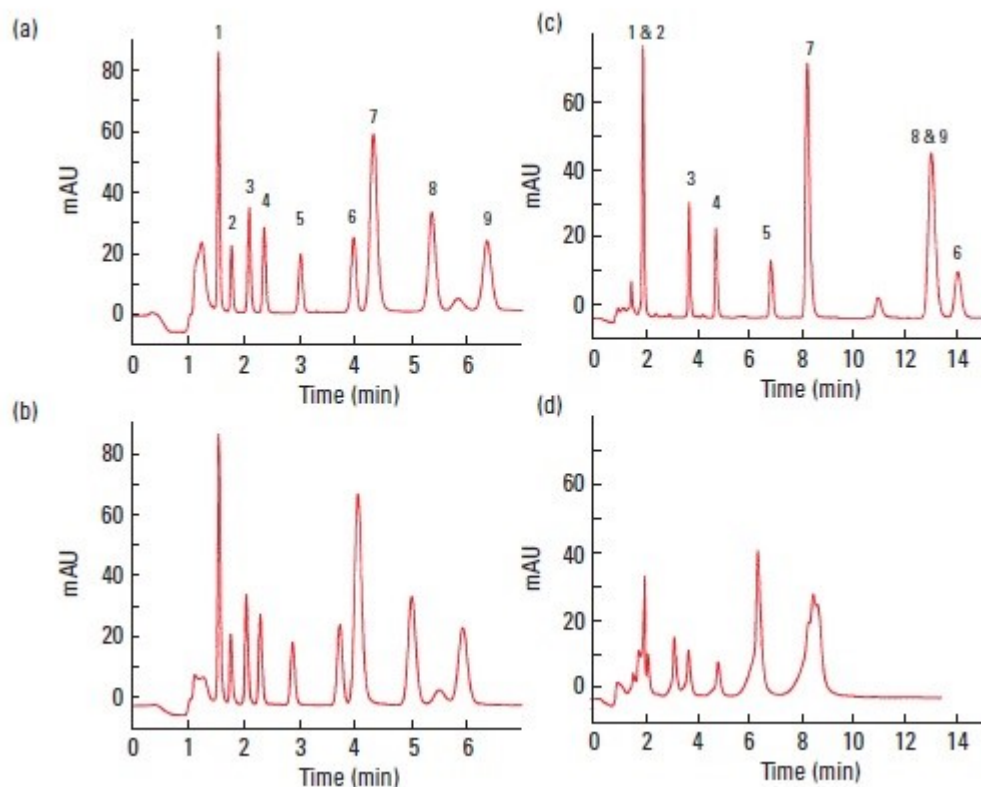
Medzi nevýhody patrí zložitejšia povrchová chémia kovových oxidov, ktorá môže komplikovať vývoj analytickej metódy pre zložité zmesi látok. Zároveň to môže byť aj veľkou výhodou, pretože to umožňuje získanie odlišnej selektivity a možnosť širších modifikácií separačných podmienok.^{15,20}

V Tab. 2 môžeme vidieť porovnanie vlastností jednotlivých stacionárnych fáz. Zo stacionárnych fáz na báze kovových oxidov je najideálnejší ZrO_2 , ktorý má mnoho výhod. Medzi jeho nevýhody však patrí už predtým zmienená ťažko kontrolovateľná povrchová chémia a nízka energetická homogénnosť.^{20, 23}

Tab. 2 Porovnanie vlastností SF na báze silikagelu a oxidov kovov²⁰

Vlastnosti	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	ZrO ₂
Monodisperzita	++	++	++	++
Štruktúra pórov	++	neznáma	neznáma	++
Plocha povrchu	++++	++	+++	++
Kontrolovateľná povrchová chémia	++++	neznáma	++	++
Mechanická odolnosť	++	neznáma	neznáma	+++
Chemická stabilita	-	++	+++	++++
Tepelná stabilita	-	neznáma	neznáma	+++
Účinnosť kolóny	+++	neznáma	++	+++
Energetická homogénnosť	++	+	+	+

Na nasledujúcom obrázku *Obr. 6* je porovnanie PBD-ZrO₂ kolóny s modifikovanou kolónou na báze kremíku, ktorá by mala odolávať vyšším hodnotám pH. Je zjavné, že po opakovanej analýze (5000-krát) nie je viditeľná zmena v chromatograme, kde bola použitá kolóna PBD-ZrO₂. No v analýze, pri ktorej bola použitá modifikovaná kolóna na báze kremíku došlo k zjavnej degradácii SF už pri polovičnej dobe analýzy a tým k zníženiu účinnosti analýzy.²⁴



Obr. 6 Porovnanie PBD-ZrO₂ kolóny a vysoko stabilnej RP kolóny na báze kremíku²⁴

- a) Separácia na PBD-ZrO₂ kolóne. Iniciálny nástrek pri pH 12, MF: acetonitril:20mM KH₂PO₄ v objemovom pomere 28:72 (v/v).
- b) Rovnaká kolóna po 5000-násobnom nástreku vzorky.
- c) Vysoko pH stabilná kolóna na báze C18-kremík. MF: acetonitril:20mM KH₂PO₄ v objemovom pomere 35:65 (v/v); ďalšie podmienky rovnaké ako a).
- d) Kolóna na báze C18-kremík po 2000-násobnom nástreku vzorku.

Analyzované látky: 1, labetalol; 2, atenolol; 3, acebutolol; 4, metoprolol; 5, oxprenolol; 6, lidokaín; 7, quinidín; 8, alprenolol; 9, propranolol.

3.3.3. Stacionárne fázy na báze ZrO₂

Povrch ZrO₂ sa významne líši od povrchu silikagelu. Každý atóm zirkónia má väzbu na 7 susedných atómov kyslíka. Kremík má iba 4 väzby na susedné atómy kyslíka. Tým sa môže vysvetľovať vyššia odolnosť voči chemickej degradácii. Povrch zirkónia bol podrobený 15-dňovému testu pri extrémnych podmienkach pH od 1 do 14. Nedošlo k rozpusteniu ani degradácii zirkónia, čím bola potvrdená jeho stabilita.²⁵

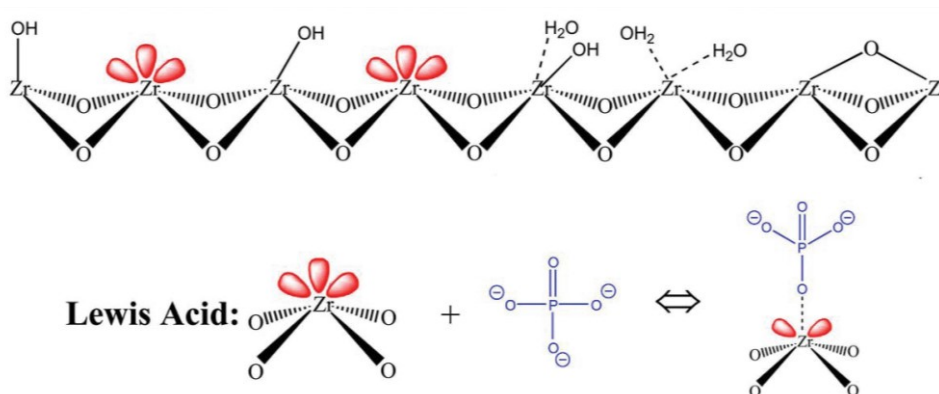
Má vyšší izoelektrický bod, vďaka čomu neinteraguje v takej miere s bázickými látkami. Čo sa týka acidobazických vlastností je amfotérny, preto môže v závislosti na pH reagovať s kyselinami aj so zásadami. Na svojom povrchu má hydroxylové skupiny aj adsorpčné centrá charakteru Lewisových kyselín. Kvôli nim je nutný prídavok tlmivého roztoku do mobilných fáz, ktorý kompenzuje silné interakcie týchto centier s hydroxylovými, karboxylovými či fosfátovými skupinami v molekulách látok. Pri interakciách sa preto uplatňuje mechanizmus reverzných fáz, ligandová výmena a výmena iónov. Hovoríme o takzvanom „zmiešanom retenčnom móde“. Interakcie závisia na vlastnostiach analyzovanej látky, pH a typu tlmivého roztoku, celkovej iónovej sile a množstve organickej zložky v mobilnej fáze.²⁰

Iónová výmena – umožňuje povrchovým hydroxylom prijímať alebo uvoľňovať protóny v závislosti na pH mobilnej fázy. V kyslom prostredí sa hydroxylové skupiny na povrchu ZrO₂ protonizujú, nesú kladný náboj a zadržiavajú anióny. V zásaditom prostredí dochádza k disociácii hydroxylových skupín, povrch nesie záporný náboj a zadržiava katióny.²⁰

Výmena ligandov – je schopnosť ZrO₂ vymeniť ligandy komplexne naviazané na aktívne miesta s charakterom Lewisových kyselín. Kľúčovú rolu pri tejto výmene hrajú komplexne naviazané molekuly vody, ktoré môžu byť zamenené za iné častice s charakterom Lewisových zásad. Všeobecne platí, že silnejšie Lewisové zásady vytesnia slabšie. Polarizovateľnosť zásady a elektronová hustota sú hlavné vlastnosti určujúce silu interakcie Lewisovej zásady s miestami charakteru Lewisových kyselín.²⁰

K týmto dejom dochádza nielen na povrchu ZrO₂, ale aj pri modifikovaných povrchoch upravených polymérom alebo uhlíkom. Dôvodom je iba čiastočná blokáda adsorpčných centier na povrchu ZrO₂.^{20, 26}

Možnosť rôznych interakcií oxidu zirkoničitého umožňuje používať tieto kolóny v mnohých chromatografických modulloch. Najčastejšiu modifikáciu predstavuje nanosenie tenkej vrstvy polyméru, ako napr. polybutadiénu alebo polystyrénu, ktorá zníži jeho polaritu. Tieto modifikácie iba čiastočne blokujú adsorpčné centrá ZrO_2 . Blokáda všetkých miest na povrchu ZrO_2 s charakterom Lewisovej kyseliny dodnes neexistuje.^{20, 26}



Obr. 7 Povrch zirkóniovej kolóny²⁷

3.3.4. Modifikované stacionárne fázy na báze ZrO_2

Modifikované ZrO_2 kolóny dostupné na trhu

Medzi najvýznamnejšie spoločnosti v oblasti dodania zirkóniových kolón patria firmy Sigma-Aldrich s.r.o. a ZirChrom Separations, Inc..

Firma Sigma-Aldrich s.r.o. ponúka tieto kolóny:

- **Discovery® Zr-PBD:** Častice zirkónia sú modifikované polybutadiénom. Kolóna umožňuje separáciu podobnú ako na C18-SiO₂ kolónach, ale s vyššou stabilitou pri vysokom pH a vysokej teplote.
- **Discovery® Zr-PS:** Častice zirkónia modifikované polystyrénom. Kolóna je vhodná na separáciu hydrofóbných zlúčenín a amínov.
- **Discovery® Zr-CarbonC18:** ZrO_2 modifikovaný oktadecylom. Kolóna je vhodná pre univerzálnu separáciu kyselín, zásad aj neutrálnych látok.
- **Discovery® Zr-Carbon:** Zirkónium s povlakom z uhlíka. Kolóna umožňuje oddelenie geometrických izomérov a diastereomérov.²⁸

Firma ZirChrom Separations, Inc. má širšiu ponuku zirkóniových kolón. Tieto kolóny môžeme rozdeliť do niekoľkých skupín.

Tab. 3 Kolóny so systémom reverzných fáz na báze ZrO₂ od firmy ZirChrom Separations, Inc.²⁹

Kolóna	Úprava povrchu	Vlastnosti	Využitie
DiamondBond®-C18	Kovalentné naviazanie C18 na povrchu, ktorý bol pokrytý grafitizovaným uhlíkom.	pH 1-14 teplota až 200 °C	Stanovenie steroidných hormónov, barbiturátov, parabénov a ďalších látok.
ZirChrom®-CARB	ZrO ₂ potiahnutý grafitizovaným uhlíkom.	pH 1-14 teplota až 200 °C	Rozdielna selektivita ako ODS alebo iné polymérne materiály.
ZirChrom®-EZ	Povrchové častice ZrO ₂ naleptané pomocou EDTPA.	pH 1-10 teplota do 50 °C	Analýza kyselín a zásad.
ZirChrom®-MS	Povrchové častice ZrO ₂ potiahnuté PBD a naleptané pomocou EDTPA.	pH 1-10 teplota do 50 °C	Umožňuje analýzu vysoko bázických amínov za použitia bežných tlmivých roztokov využívaných pri LC/MS analýze.
ZirChrom®-PBD	Častice ZrO ₂ potiahnuté PBD.	pH 1-14 teplota do 150 °C	Menej hydrofóbná SF, preto je potrebné menej organického rozpúšťadla.
ZirChrom®-PS	Častice ZrO ₂ potiahnuté vrstvou polystyrénu.	pH 1-13 teplota do 150 °C	Menej hydrofóbná SF, vhodná pre polyaromatické zlúčeniny.

Tab. 4 Kolóny s iónovo-výmenným systémom fáz na báze ZrO_2 od firmy ZirChrom Separations, Inc. ²⁹

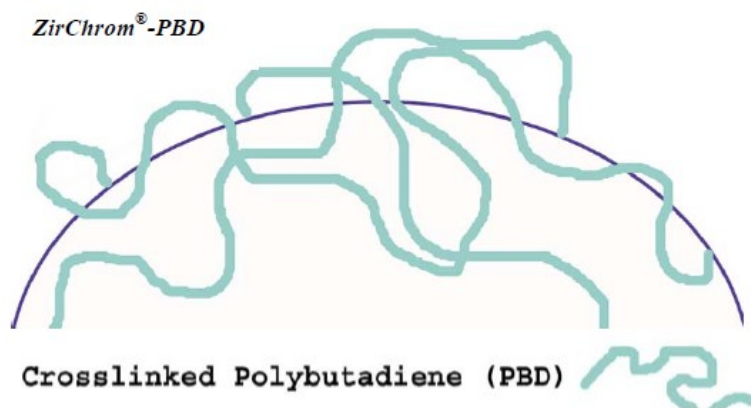
Kolóna	Úprava povrchu	Vlastnosti	Využitie
ZirChrom®-PEZ	ZrO_2 potiahnuté EDTPA.	pH 1-10 teplota do 50 °C	Separácia monoklonálnych protilátok.
ZirChrom®-SAX	ZrO_2 potiahnutý zosieťovaným polyetylénimínom.	pH 1-12 teplota do 80 °C	Separácia anorganických a organických aniónov.
ZirChrom®-SHAX	ZrO_2 potiahnutý zosieťovaným polyetylénimínom, hydrofilnejšia kolóna.	pH 1-12 teplota do 80 °C	Separácia anorganických a organických aniónov.
ZirChrom®-WAX	ZrO_2 potiahnutý zosieťovaným polyetylénimínom. Slabý aniónový výmenník.	pH 3-9 teplota do 50 °C	Separácia aniónov.
ZirChrom®-WCX	Naviazanie fosfátu na povrch ako kationový výmenník.	pH 1-10 teplota do 150 °C	Analýza proteínov na základe kationového výmenníka.

Tab. 5 Ďalšie kolóny na báze ZrO_2 od firmy ZirChrom Separations, Inc. ²⁹

Kolóna	Úprava povrchu	Vlastnosti	Využitie
ZirChrom®-PHASE	Nemodifikované častice ZrO_2 , systém NP-SF.	pH 1-14 teplota do 150 °C	Ako alternatíva hydroxyapatitu.
ZirChrom®-Chiral	ZrO_2 so zakotvenými chirálnymi selektormi.	pH 1-8 teplota do 50 °C	Separácia enantiomérov.

Popis kolóny ZirChrom®-PBD

ZirChrom®-PBD kolóna sa pripravuje impregnáciou pórovitého zirkónia s roztokom PBD a voľným radikálovým iniciátorom v hexáne, následným opatrným odstránením hexánu pomocou riadeného odparenia, po ktorom nasleduje tepelné rozloženie iniciátora. Kolóny potiahnuté polymérom sú úplne odlišné od chemicky viazaných kolón, pretože neexistujú kovalentné väzby, ktoré držia tento polymér na povrchu. Sú to nerozpustné materiály, vysoko zosieťované a impregnované v póroch častíc substrátu namiesto povrchových povlakov. To je znázornené na *Obr. 8*, na ktorom môžeme vidieť poprepletanú štruktúru PBD.²⁴



Obr. 8 Štruktúra ZirChrom®-PBD³⁰

ZirChrom®-PBD je SF podobná uhl'ovodíkovým reverzným fázam. V porovnaní s ODS fázami vykazuje táto kolóna podobnú retenciu, selektivitu a účinnosť pri analýze neelektrolytov. Výrazný rozdiel je však pri analýze látok aniónového alebo kationového typu. Na povrchu zirkónia sú väzbové miesta typu Lewisových kyselín, ktoré sa môžu čiastočne blokovat' pridaním tlmivých roztokov vo forme Lewisových zásad. Povrch tak získava záporný náboj a separácia iónových látok je odlišná ako na ODS kolónach na báze kremíku.²⁴

V roku 2017 bola validovaná nová metóda na separáciu triptanov, selektívnych agonistov serotonínového receptora 5-HT₁, s využitím tejto kolóny. Separácia týchto vysoko bázičných látok bola problematická na stacionárnych fázach na báze kremíku, no s využitím ZirChrom®-PBD kolóny bola umožnená izokratická analýza štyroch triptanov (sumatriptanu, zolmitriptanu, eletriptanu a rizatriptanu) v relatívne krátkom čase (10 minút).³¹

3.4. Izolácia liečiv z biologického materiálu

Bioanalýza liečiv je jeden z dôležitých smerov farmaceutickej analýzy, ktorý umožňuje získať presné informácie o osude liečiva v organizme. K analýze sa využíva biologický materiál tvorený zložitou maticou, ktorú je nutné vhodne upraviť. Biologickým materiálom je napr. krv, plazma, sérum, moč či feces.

Komplexný analytický metodologický prístup zahŕňa 3 kroky:

- príprava biologickej vzorky,
- izolácia stanovovanej látky,
- kvalitatívna/kvantitatívna analýza.

Dôležitými faktormi pri úprave biologickej vzorky sú:

- Minimalizácia účinkov matrice.
- Eliminácia variability vzorky, aby sa dosiahla reprodukovateľnosť kvantitatívnej analýzy.
- Zvýšenie detekcie vďaka dostatočnej koncentrácii analyzovanej látky v upravenej vzorke a vďaka odstráneniu interferujúcich látok v matici.
- Vhodnosť úpravy pre požadovanú analýzu.^{32, 33}

Medzi základné metódy úpravy biologického materiálu pred HPLC analýzou patria deproteínácia, extrakcia kvapalina-kvapalina (*liquid-liquid extraction*) a extrakcia tuhou fázou (*solid phase extraction*).

3.4.1. Deproteinácia (DPP)

Deproteinácia je najjednoduchšia metóda úpravy biologickej vzorky. Jej jednoduchosť ju postavila na dôležité miesto v oblasti úpravy krvi, plazmy či séra. Automatické a poloautomatické metódy majú v oblasti výskumu časté uplatnenie.³³

Jedná sa o vyzrážanie proteínov zo vzorky založené na pridaní deproteinačného činidla. Vhodným deproteinačným činidlom sú organické rozpúšťadlá, silné anorganické kyseliny alebo soli. Po tomto kroku nasleduje centrifugácia alebo ultrafiltrácia.

Supernatant však často obsahuje množstvo zložiek, ktoré môžu narušiť následnú analýzu. Ďalšou nevýhodou je možnosť naviazania stanovovanej látky na precipitát, čo vedie k nepresným výsledkom v kvantitatívnej analýze. Okrem toho dochádza k zriedeniu analyzovanej vzorky a tým k nutnosti použiť citlivejšie analytické metódy.^{33, 34}

3.4.2. Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE)

Metóda LLE bola vyvinutá s cieľom dosiahnuť produktívnejšiu metódu úpravy biologickej vzorky pred analýzou. Je to novšia metóda, ktorej princípom je extrakcia látok z vodného roztoku (donorová fáza) do rozpúšťadla, ktoré nie je miešateľné s vodou (akceptorová fáza).

Základným princípom je prechod látok neionizovaných a málo polárnych. Jednou z nevýhod LLE je spotreba veľkého množstva organického rozpúšťadla, čo z tejto metódy robí drahý spôsob analýzy biologického materiálu. Ďalšou nevýhodou LLE je povaha bežných organických rozpúšťadiel, ktoré neumožňujú priamu analýzu biologickej vzorky. Často je vyžadované náročné odparovanie a následné rozpustenie analyzovanej látky vo vhodnejšom rozpúšťadle. Výhodou je však vyššia koncentrácia vzorky a univerzálnosť tejto metódy.^{33, 34}

- **mikroextrakcia kvapalnou fázou (LPME)**

LPME je miniaturizácia LLE techniky, pri ktorej sa používa malý objem akceptorovej fázy (niekoľko mikrolitrov). Touto úpravou dochádza k odstráneniu veľkej časti nevýhod klasickej LLE. Existujú niekoľko rôznych modifikácií LPME.^{35, 36}

- **mikroextrakcia jednou kvapkou (SDME)**

Technológia SDME je založená na distribúcii analytov medzi mikrokvapkou nemiešateľného organického rozpúšťadla (akceptorová fáza) a vodným roztokom analytov (donorová fáza). Akceptorovú fázou tvorí zvyčajne približne 10 µl organického rozpúšťadla.³⁵

- **extrakcia pomocou dutého vlákna (HF-LPME)**

V HF-LPME je malé množstvo extrakčného rozpúšťadla umiestnené najčastejšie vo vnútri dutej trubice v tvare písmena U tvorenej dutým hydrofóbnym pórovitým vláknom. Duté vlákno je stabilizované s pomocou vodou nemiešateľného rozpúšťadla, ktoré je umiestnené v póroch a vytvára podpornú kvapalnú membránu. Výsledkom tohto usporiadania je, že analyty nie sú v priamom kontakte s hlavným extrakčným rozpúšťadlom. Analyty sú extrahované z vodnej fázy do podpornej kvapalnej membrány a až následne do vnútra dutého vlákna, kde sa nachádza akceptorová fáza.³⁵

- **disperzná mikroextrakcia kvapaliny do kvapaliny (DLLME)**

V DLLME je niekoľko mikrolitrov nepolárneho s vodou nemiešateľného rozpúšťadla (akceptorová fáza) a zároveň niekoľko mikrolitrov polárneho s vodou miešateľného rozpúšťadla vstreknutých do vodného roztoku analytu a zmes je následne miešaná. Výsledkom je, že s vodou nemiešateľné kvapôčky rozpúšťadla sú dispergované vo vodnom roztoku analytu vďaka s vodou miešateľnému rozpúšťadlu, ktoré slúži ako dispergačné činidlo. Po extrakcii sa zmes schladí, centrifuguje a následne sa oddelí rozpúšťadlo s extrahovanou látkou (akceptorová fáza), ktoré je podrobené ďalším úpravám.³⁵

3.4.3. Extrakcia tuhou fázou (SPE)

SPE je metóda vyvinutá a aplikovaná v bioanalýze liečiv až po LLE. Princípom tejto metódy je selektívne naviazanie analyzovanej látky na sorbent. Dochádza tak k odstráneniu fosfolipidov a proteínov, čo je kľúčovou výhodou tejto metódy.^{33, 34}

Sorbenty môžu byť vyvinuté na rôznom princípe retencie analyzovanej látky, napr. na princípe slabých alebo silných iónomeničov alebo na princípe väzby antigén a protilátka. Nevýhodou môže byť finančná náročnosť kolón pre SPE.^{33, 34}

- **mikroextrakcia v systéme kvapalina-tuhá fáza (SPME)**

Špeciálnym typom separácie je SPME. Je to inovatívna preparačná technológia bez použitia rozpúšťadla alebo s jeho minimálnym množstvom. Využíva vlákno

potiahnuté vrstvou kvapaliny (napr. polymér) alebo vrstvou pevnej látky (sorbet), prípadne ich kombináciu.^{35, 36, 37}

Po absorpcii látky z analyzovanej zmesi je možné vlákno s naviazanou látkou priamo vložiť do chromatografu, kde dochádza k desorpcii a následnej analýze. Táto metóda sa označuje za tzv. „green“ metódu, pretože je šetrná k životnému prostrediu. Malá spotreba rozpúšťadla, malé množstvo analyzovanej vzorky a možnosť opätovného použitia vlákna ako aj mnoho ďalších výhod posúvajú túto metódu stále viac do popredia.³⁵

- **disperzná mikroextrakcia v systéme kvapalina-tuhá fáza (DMSPE)**

V metóde DMSPE dochádza k dispergovaniu niekoľkých miligramov extrakčného sorbetu do roztoku analytu. Výsledná suspenzia je podrobená centrifugácii, pri ktorej dochádza k oddeleniu sorbetu. Ďalším krokom je desorpcia analytu vhodným rozpúšťadlom. Výhodou tejto metódy je lepší kontakt analytu so sorbetom a tým je dosiahnutá vyššia účinnosť extrakcie.³⁵

3.4.4. Nové materiály využívané v bioanalýze

Keďže analýza biologických vzoriek je veľmi náročná a často komplikovaná, dochádza k vývoju nových materiálov, ktoré splňujú kritéria vyžadované pre tieto analýzy. V literatúre sa za posledných 10 rokov objavilo množstvo materiálov, ktoré umožňujú prípravu vysoko účinných a selektívnych sorbetov pre moderné techniky prípravy biologických vzoriek.³⁸

Polyméry s molekulovými odtlačkami (MIPs)

MIPs (*molecular imprinted polymers*) sú vysoko zosieťované polyméry, ktoré majú umelo vytvorené rozpoznávacie miesto určené pre špecifickú skupinu analytov, prípadne pre jednu konkrétnu látku. Majú tak poskytovať vysokú selektivitu. Medzi templátovou molekulou a analytom môže dochádzať k interakciám kovalentným, nekovalentným a semikovalentným. MIPs sú čoraz častejšie využívané, napr. pre SPE 1-metyladenosínu z ľudského moču.^{32, 38}

3.5. Validácia bioanalytických metód

Validácia je proces, ktorého cieľom je preukázať, že daná metóda je vhodná k zamýšľanému použitiu. Zisťujú sa dôležité charakteristiky analytickej metódy a stanovujú sa podmienky, pri ktorých dodržiavaní je skúšaná metóda použiteľná.^{16, 39}

Validácia bioanalytických metód zahŕňa všetky postupy, ktoré dokazujú, že príslušné metódy používané na kvantitatívne stanovenie analytov v biologickej matrici sú spoľahlivé, reprodukovateľné a vhodné pre daný účel.³⁹

Dokumenty zamerané na validáciu bioanalytických alebo analytických metód vypracovali FDA, EMA a ICH.^{39, 40, 41}

Základnými parametrami validácie pre bioanalytické metódy sú selektivita, správnosť, presnosť, extrakčná účinnosť, linearita a stabilita analyzovanej látky v biologickej vzorke.³⁹

3.5.1. Selektivita

Selektivita (*selectivity*) je schopnosť analytickej metódy oddeliť a kvantifikovať stanovovanú látku v prítomnosti ďalších zložiek vo vzorke. Ďalšími potencionálne interferujúcimi zložkami v biologickej matrici sú endogénne zložky matrice, rozkladné produkty, metabolity, nečistoty, súbežne podávané lieky a iné exogénne xenobiotiká. Ako dôkaz selektivity slúži porovnanie analýzy štandardu a vzorky bez štandardu, ktorá obsahuje všetky ďalšie zložky (*blank sample*). Ak je metóda určená na kvantifikáciu viac ako jednej látky, musí byť testovaná selektivita každej látky.^{39, 40, 41}

3.5.2. Limit detekcie a kvantifikácie

Limit detekcie (LOD) je najnižšia detekovateľná koncentrácia stanovovanej látky, ktorá sa dá spoľahlivo odlišiť od šumu v pozadí, a ktorá sa nestanovuje kvantitatívne. Vyjadruje sa ako koncentrácia analyzovanej látky, pri ktorej sa pomer signálu k šumu

rovná hodnote 3. Nájdený limit detekcie sa následne overí analýzou príslušnej koncentrácie látky.^{16, 41}

Limit kvantifikácie (LOQ) je najnižšia koncentrácia analyzovanej látky v plazme, ktorá môže byť kvantifikovaná s prijateľnou presnosťou a správnosťou pri dodržiavaní uvedených experimentálnych podmienok. Obvykle to býva trojnásobok LOD. Vyjadruje sa ako koncentrácia, pri ktorej sa pomer signálu k šumu rovná hodnote 10.^{16, 41}

Dolný limit kvantifikácie (LLOQ) je najnižšie množstvo analyzovanej látky vo vzorke, ktoré môže byť kvantifikované s vhodnou presnosťou a správnosťou. Odozva analyzovanej látky pri LLOQ by mala byť aspoň päťnásobok odpovede v porovnaní s prázdnu matricou. Existuje niekoľko rôznych prístupov pre stanovenie LLOQ, ako napríklad na základe pomeru signálu k šumu zodpovedajúcej hodnote 10 (ako LOQ) alebo pomocou zistenia koncentrácie, pri ktorej je RSD 20 % (lineárna závislosť), a následného experimentálneho overenia.^{39, 42}

3.5.3. Správnosť

Správnosť (*accuracy*) vyjadruje zhodu medzi získaným výsledkom a správnu hodnotou. Zisťuje sa opakovanou analýzou vzoriek obsahujúcich známe množstvo analyzovanej látky. Mala by sa merať pri minimálne troch koncentráciách v rozmedzí očakávaných koncentrácií vzorky s minimálne piatimi stanoveniami na koncentráciu. Hodnota správnosti by mala byť v rozmedzí 15 % od skutočnej hodnoty s výnimkou LLOQ, kde by sa táto hodnota nemala odchyliť o viac ako 20 % od skutočnej hodnoty.^{16, 39}

3.5.4. Presnosť

Presnosť (*precision*) je miera zhody medzi jednotlivými výsledkami metódy opakovane získanými s jednou homogénnou vzorkou. Mala by sa merať pri minimálne troch koncentráciách v rozmedzí očakávaných koncentrácií vzorky s minimálne piatimi stanoveniami na koncentráciu. Hodnota presnosti by mala byť v rozmedzí 15 %

od skutočnej hodnoty s výnimkou LLOQ, kde by sa táto hodnota nemala odchýliť o viac ako 20 % od skutočnej hodnoty. ^{16, 39}

Rozlišujeme 3 úrovne presnosti:

- Opakovateľnosť: metóda sa opakuje rovnakým spôsobom, jedným pracovníkom, s rovnakými činidlami a na jednom prístroji.
- Medziľahlá presnosť: metóda sa vykonáva s rôznymi činidlami, pracovníkmi a prístrojmi, ale v jednom laboratóriu a s rovnakou zhomogenizovanou vzorkou.
- Reprodukovateľnosť: stanovenie prebieha ako medziľahlá presnosť, avšak v inom laboratóriu. ¹⁶

3.5.5. Extrakčná účinnosť

Extrakčná účinnosť (*recovery*) vyjadruje stratu analyzovanej látky pri extrakcii. Nemusí byť 100 %, ale hodnota musí byť opakovateľná. Stanovuje sa porovnaním plochy píku analyzovanej látky po extrakcii so známym množstvom analyzovanej látky a príslušne nariadenou vzorkou štandardu (bez biologického materiálu). ³⁹

3.5.6. Linearita

Linearita (*linearity*) sa stanovuje najčastejšie pomocou kalibračnej priamky, ktorá vyjadruje priamoúmerný vzťah medzi odozvou detektoru a koncentráciou analyzovanej látky vo vzorke. Kalibračná priamka by mala byť tvorená minimálne zo 6 rôznych koncentrácií analyzovanej látky v rozmedzí, ktoré je potrebné pre analýzu reálnych vzoriek. Mala by obsahovať hodnotu LLOQ, ktorá tvorí najnižší štandard na kalibračnej krivke. Hodnota presnosti a správnosti pri LLOQ sa nemôže odchýliť o viac ako 20 % od skutočnej hodnoty. Hodnoty presnosti a správnosti pri ďalších analýzach sa nemôžu odchýliť o viac ako 15 % od skutočnej hodnoty. ^{16, 39, 41}

3.5.7. Stabilita

Vyhodnotenie stability látok zabezpečuje to, aby každý krok, ktorý sa vykonáva počas prípravy a analýzy vzoriek, ako aj podmienky skladovania, neovplyvňovali koncentráciu analyzovanej látky.⁴⁰

Stabilita analyzovanej látky vo vzorke závisí sa mnohých podmienkach, ako spôsob uchovávanía, chemické vlastnosti analyzovanej látky, druhu matrice či obalu. Nie je preto možné výsledky stability analyzovanej látky v biologickom materiáli aplikovať na iné vzorky. Konkrétne podmienky (teplota, čas) pre stanovenie stability sa volia podľa spôsobu zaobchádzania s reálnymi vzorkami. Stabilita analyzovanej látky sa sleduje pri dlhodobom (zmrazenie) a krátkodobom (pokojová teplota) skladovaní. Rovnako sa sleduje aj stabilita analyzovanej látky po extrakcii z biologického materiálu.³⁹

3.5.8. Robustnosť

Robustnosť (*robustness*) vyjadruje vplyv premenlivých podmienok na výsledky analýzy. Cieľom je upozorniť na podmienky, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky analýzy. Ak sú merania náchylné na odchýlky v analytických podmienkach, mali by byť vhodné kontrolované alebo by to malo byť uvedené v postupe.^{16, 41}

3.6. Chromatografické podmienky pre stanovenie kvetiapínu a jeho metabolitov v literatúre

Tab. 6 Chromatografické podmienky pre stanovenie kvetiapínu a jeho metabolitov pomocou kvapalinovej chromatografie uvedené v literatúre

Metóda č.1	
SF	Gemini C6-Phenyl (250×4,6 mm, 5 µm)
MF	10% metanol v tlmivom roztoku, pH 3,1:acetonitril
Druh analýzy	Gradientová elúcia
Detekcia	UV, 215 nm
t _R (min)	Quet – 2,19 min; Nor_Quet – 30,68 min
Zdroj	43
Metóda č.2	
SF	Amethyst C18-P (250×4,6 mm, 5 µm)
MF	Octan amónny (0,03 mol/l):metanol v pomere 25:75 (v/v)
Druh analýzy	Izokratická elúcia
Detekcia	UV, 238 nm
t _R (min)	Quet – 8,2 min
Zdroj	44
Metóda č.3	
SF	Nova-Pack C18 (150x4,6 mm, 5 µm)
MF	Acetonitril:metanol:fosfátový tlmivý roztok 0,025M v objemovom pomere 40:30:30 (v/v)
Druh analýzy	Izokratická elúcia
Detekcia	UV, 225 nm
t _R (min)	Quet – 3,88 min
Zdroj	45
Metóda č.4	
SF	ZirChrom®-PBD (150x4,6 mm, 5 µm)
MF	Acetonitril:octanový amónny (6mM, pH 6)
Druh analýzy	Gradientová elúcia
Detekcia	UV, 254 nm
t _R (min)	Quet – 5,62 min, Nor_Quet – 9,85 min, 7-OH_Quet – 4,79 min
Zdroj	46

3.7. Úprava biologického materiálu pred HPLC analýzou v literatúre

Tab. 7 Úprava plazmy pred HPLC analýzou uvedená v literatúre

DPP č. 1	
Činidlo	ACN
Špeciálna úprava vzorky	Rekonštrukcia vzorky pomocou ACN.
Zdroj	45
DPP č. 2	
Činidlo	2% metanolickej roztok kyseliny mravčej
Špeciálna úprava vzorky	Úprava 0,1% vodným roztokom kyseliny mravčej.
Zdroj	47
LLE č. 1	
Činidlo	Etylacetát
Špeciálna úprava vzorky	Úprava 30% roztokom NH ₄ OH. Vzorka bola rekonštruovaná pomocou MF.
Zdroj	48
LLE č. 2	
Činidlo	Etylacetát
Špeciálna úprava vzorky	Úprava 0,1M roztokom NaOH. Vzorka bola rekonštruovaná pomocou etanolu.
Zdroj	49
SPE	
Špeciálna úprava vzorky	Úprava 0,5M NaOH. Zmes bola extrahovaná pomocou Oasis HLB extrakčnej kolóny, ktorá bola aktivovaná metanolom. SPE prebiehala v prostredí vákua. Na preplach sa použil 2% vodný roztok amoniaku. Vzorka bola následne eluovaná do sklenenej trubice s použitím 2% metanolickej roztoku kyseliny octovej. Roztok bol vysušený dusíkom a rozpustený v MF.
Zdroj	50

4. Experimentálna časť

4.1. Chemikálie, prístroje a pomôcky

4.1.1. Použité chemikálie

- pracovný štandard kvetiapín fumarát, Sigma Aldrich, Nemecko
- pracovný štandard 7-hydroxykvetiapín (1 mg v 1 ml), Sigma Aldrich, Nemecko
- pracovný štandard norkvetiapín (1 mg v 1 ml), Sigma Aldrich, Nemecko
- flunitrazepam, Léčiva-Spofa, Česká republika
- nitrazepam, Léčiva-Spofa, Česká republika
- oxazepam, Léčiva-Spofa, Česká republika
- diazepam, Léčiva-Spofa, Česká republika
- medazepam, Léčiva-Spofa, Česká republika
- risperidon, Risperidon Torrent, India
- acetonitril, Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Nemecko
- metanol, Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Nemecko
- octan amónny, Penta, Česká republika
- kyselina octová (99,8–100,5%), Sigma Aldrich, Nemecko
- chloroform, Penta, Česká republika
- dichlórmetán, Penta, Česká republika
- etylacetát, Penta, Česká republika
- amoniak (25–29%), Penta, Česká republika
- kyselina mravčia, ACS reagent, Sigma Aldrich, Nemecko
- kyselina trifluoroctvá, FluoroChem, Veľká Británia
- trietylamin, Penta, Česká republika
- hydroxid sodný, Dr. Kulich Pharma, Česká republika
- čistená voda
- králičia plazma

4.1.2. Zostava pre HPLC

- kontrolná jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A3 VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- termostat kolóny: CTO-20AS VP Shimadzu
- predkolóna: ZirChrom®-PBD, 10x4 mm, ZirChrom Separations, Inc., USA
- chromatografická kolóna: ZirChrom®-PBD, 150x4,6 mm s časticami veľkosti 5 µm, ZirChrom Separations, Inc., USA
- detektor: UV-VIS, SPD-20A VP Shimadzu
- počítačový program: CTO-20AS VP Shimadzu
- riadiaca jednotka: CBM-20A VP Shimadzu

4.1.3. Použité prístroje

- digitálne váhy: Sartorius AG typ A200S, Nemecko
- pH meter: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Nemecko
- magnetické miešadlo: IKA Color Squid, Nemecko
- trepačka: Vortex, VELP Scientifica, Taliansko
- centrifúga: IEC CL31R Multispeed, Thermo elektron corporation, USA

4.1.4. Pomôcky

- kadičky, odmerné banky, odmerné banky so závitom, odmerné valce, skúmavky, delené a nedelené pipety, sklenené tyčinky, lodičky, vialky, inserty, mikropipety
- balónik k pipetovaniu, stojan na skúmavky, laboratórne lyžice, stričky, membránový filter 0,45 µm, alobal

4.2. Obecné postupy

4.2.1. Príprava roztokov

Roztok kvetiapínu

Roztok kvetiapínu bol pripravený navážením 1 mg kvetiapínu do 10ml odmernej banky. Banka bola doplnená 50% ACN a následne uchovávaná v chladničke. Výsledná koncentrácia kvetiapínu bola 0,1 mg/ml.

Roztoky metabolitov kvetiapínu

Roztoky 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu boli pripravené odobratím 20 μ l z pracovných štandardov 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu s koncentráciou 1 mg/ml a následne zriedené 180 μ l metanolu. Výsledná koncentrácia roztokov bola 0,1 mg/ml.

Roztok vnútorného štandardu

Ako vnútorný štandard boli testované látky flunitrazepam, nitrazepam, oxazepam, diazepam, medazepam, risperidon, zolpidem a lamotrigin. Ich roztoky sa pripravili rozpustením 0,5 mg danej látky v 5 ml 50% metanolu a následne boli uchovávané v chladničke. Výsledná koncentrácia týchto roztokov bola 0,1 mg/ml.

Zmes látok

Zo zásobných roztokov s koncentráciou 0,1 mg/ml bolo odobrané 100 μ l kvetiapínu, 100 μ l 7-hydroxykvetiapínu, 100 μ l norkvetiapínu a 50 μ l flunitrazepamu. Jednotlivé zložky sa dôkladne premiešali a následne sa 200 μ l roztoku odobralo do insertu a použilo k analýze. Výsledné koncentrácie látok boli 28,6 μ g/ml kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu a 14,3 μ g/ml flunitrazepamu.

4.2.2. Deproteinácia

Deproteinácia pomocou 2% metanolickeho roztoku kyseliny mravcej

K 50 μ l králičej plazmy sa pomocou mikropipety pridalo 5 μ l kvetiapínu a 5 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 1 mg/ml. Na deproteináciu sa použilo 430 μ l 2% metanolickeho roztoku kyseliny mravcej. Zmes sa trepala 2 minúty a následne centrifugovala 5 minút pri 9 000 otáčkach za minútu. Odobralo sa 400 μ l supernatantu, ku ktorému sa pridalo 400 μ l 0,1% vodného roztoku kyseliny mravcej. Zmes bola podrobená HPLC analýze.

Deproteinácia pomocou ACN

K 50 μ l králičej plazmy sa pomocou mikropipety pridalo 5 μ l kvetiapínu a 5 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 1 mg/ml. Na deproteináciu sa použilo 500 μ l ACN. Zmes sa trepala 2 minúty a následne centrifugovala 5 minút pri 9 000 otáčkach za minútu. Odobralo sa 400 μ l supernatantu, ku ktorému sa pridalo 400 μ l 0,1% vodného roztoku kyseliny mravcej. Zmes bola podrobená HPLC analýze.

4.2.3. LLE

LLE s rôznymi extrakčnými rozpúšťadlami

K 1 ml králičej plazmy sa pridalo 50 μ l kvetiapínu, 50 μ l 7-hydroxykvetiapínu, 100 μ l norkvetiapínu a 10 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 0,1 mg/ml. Zmes sa premiešala a následne bola upravená 100 μ l koncentrovaného amoniaku. Po premiešaní sa pridalo 5 ml chloroformu/5 ml dichlórmetánu/5 ml etylacetátu. Zmes sa trepala 5 minút a následne 10 minút centrifugovala pri 9 000 otáčkach za minútu. Bolo odoberatých 4 ml supernatantu, ktorý bol následne odparený pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustil v 100 μ l metanolu, vložil do insertu a bol podrobený HPLC analýze.

LLE s rôznou acidobázickou úpravou

K 200 μ l králičej plazmy sa pridalo 10 μ l kvetiapínu, 10 μ l 7-hydroxykvetiapínu, 20 μ l norkvetiapínu a 2 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 0,1 mg/ml. Zmes sa premiešala a následne bola upravená 20 μ l 0,1% vodného roztoku kyseliny mravčej/ 20 μ l koncentrovaného amoniaku/20 μ l roztoku NaOH (0,1 mol/l). Po premiešaní sa pridalo 500 μ l chloroformu. Zmes sa trepala 2 minúty a následne 10 minút centrifugovala pri 9 000 otáčkach za minútu. Bolo odobratých 450 μ l supernatantu, ktorý bol následne odparený pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustil v 100 μ l metanolu, vložil do insertu a bol podrobený HPLC analýze.

Jednostupňová LLE

K 200 μ l králičej plazmy sa pridalo 10 μ l kvetiapínu, 10 μ l 7-hydroxykvetiapínu, 20 μ l norkvetiapínu a 2 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 0,1 mg/ml. Zmes sa premiešala a následne bola upravená 20 μ l koncentrovaného amoniaku. Po premiešaní sa pridalo 200 μ l/300 μ l/400 μ l/500 μ l/600 μ l chloroformu. Zmes sa trepala 2 minúty a následne 10 minút centrifugovala pri 9 000 otáčkach za minútu. Bolo odobratých 150 μ l/250 μ l/350 μ l/450 μ l/550 μ l supernatantu. Supernatant bol následne odparený pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustil v 100 μ l metanolu, vložil do insertu a bol podrobený HPLC analýze.

Viacstupňová LLE

K 200 μ l králičej plazmy sa pridalo 10 μ l kvetiapínu, 10 μ l 7-hydroxykvetiapínu, 20 μ l norkvetiapínu a 2 μ l flunitrazepamu s koncentráciou 0,1 mg/ml. Zmes sa premiešala a následne bola upravená 20 μ l koncentrovaného amoniaku. Po premiešaní sa pridalo 200 μ l/300 μ l/400 μ l chloroformu. Zmes sa trepala 2 minúty a následne 10 minút centrifugovala pri 9 000 otáčkach za minútu. Bolo odobratých 150 μ l/250 μ l/350 μ l supernatantu. Do skúmavky sa znovu primiešalo 200 μ l/300 μ l/400 μ l chloroformu a proces sa zopakoval. Supernatant (150+150 μ l/250+250 μ l/350+350 μ l) bol následne odparený pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustil v 100 μ l metanolu, vložil do insertu a bol podrobený HPLC analýze.

4.2.4. Príprava mobilnej fázy

Mobilná fáza s 6mM octanovým tlmivým roztokom (CH_3CONH_4), pH 4,0; pH 5,0 alebo pH 6,0

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: organická zložka tvorená ACN
- MF B: anorganická zložka tvorená 6mM tlmivým octanovým roztokom

ACN bol použitý bez ďalšej úpravy. Tlmivý roztok bol pripravený navážením 0,2312 g octanu amónneho ($M_{\text{CH}_3\text{CONH}_4} = 77,0825 \text{ g}$) do kadičky. Octan amónny bol následne rozpustený v 500 ml čistenej vody. Bol tak pripravený 6mM roztok octanu amónneho. Pomocou kyseliny octovej bolo pH upravované na požadovanú hodnotu, a to na pH 4,0, pH 5,0 alebo pH 6,0. Takto pripravený roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm mikrofilter a následne umiestnený do zásobnej nádoby pre MF B.

Mobilná fáza s 6mM octanovým tlmivým roztokom (CH_3CONH_4), pH 7,0 alebo pH 9,0

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: organická zložka tvorená ACN
- MF B: anorganická zložka tvorená 6mM tlmivým octanovým roztokom

ACN bol použitý bez ďalšej úpravy. Tlmivý roztok bol pripravený navážením 0,2312 g octanu amónneho ($M_{\text{CH}_3\text{CONH}_4} = 77,0825 \text{ g}$) do kadičky. Octan amónny bol následne rozpustený v 500 ml čistenej vody. Bol tak pripravený 6mM roztok octanu amónneho. Pomocou TEA bolo pH upravované na požadovanú hodnotu, a to na pH 7,0 alebo pH 9,0. Takto pripravený roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm mikrofilter a následne umiestnený do zásobnej nádoby pre MF B.

Mobilná fáza s 25mM kyselinou octovou (CH₃COOH), pH 3,1

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: organická zložka tvorená ACN
- MF B: anorganická zložka tvorená 25mM roztokom kyseliny octovej

ACN bol použitý bez ďalšej úpravy. Roztok kyseliny octovej bol pripravený zmiešaním 1,5 ml koncentrovanej kyseliny octovej ($M_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 1,05 \text{ g/cm}^3$) s 1000 ml čistenej vody. Takto pripravený roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm mikrofilter a následne umiestnený do zásobnej nádoby pre MF B.

Mobilná fáza s 10mM kyselinou octovou, pH 3,5

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: organická zložka tvorená ACN
- MF B: anorganická zložka tvorená 10mM roztokom kyseliny octovej

ACN bol použitý bez ďalšej úpravy. Roztok kyseliny octovej bol pripravený zmiešaním 570 μl koncentrovanej kyseliny octovej ($M_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 1,05 \text{ g/cm}^3$) s 1000 ml čistenej vody a upravený pomocou amoniaku na pH 3,5. Takto pripravený roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm mikrofilter a následne umiestnený do zásobnej nádoby pre MF B.

Mobilná fáza s 10mM kyselinou trifluorooctovou (CF₃COOH), pH 1,9

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: organická zložka tvorená ACN
- MF B: anorganická zložka tvorená 10mM roztokom TFA

ACN bol použitý bez ďalšej úpravy. Roztok kyseliny TFA bol pripravený zmiešaním 0,8 ml TFA ($M_{\text{CF}_3\text{COOH}} = 114,02 \text{ g/mol}$, $\rho_{\text{CF}_3\text{COOH}} = 1,49 \text{ g/cm}^3$) s 1000 ml čistenej vody. Takto pripravený roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm mikrofilter a následne umiestnený do zásobnej nádoby pre MF B.

Kombinovaná MF I.

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: 6mM octanový tlmivý roztok (CH_3CONH_4), pH 4,0:ACN v pomere 80:20 (v/v) alebo 90:10 (v/v)
- MF B: 25mM kyselina octová, pH 3,1:ACN v pomere 30:70 (v/v) alebo 40:60 (v/v)

Príprava MF A:

6mM roztok octanu amónneho bol pripravený navážením 0,1849 g/0,2081 g octanu amónneho do kadičky a následným rozpustením tejto látky pomocou 400 ml/450 ml čistenej vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH upravené na pH 4,0. K roztoku sa pridalo 100 ml/50 ml ACN, čím vznikol pomer 80:20 (v/v)/90:10 (v/v) týchto dvoch zložiek. Zmes sa dôkladne premiešala a prefiltrovala cez 0,45 μm mikrofilter. Na záver bola umiestnená do zásobnej nádoby pre MF A.

Príprava MF B:

25mM roztok kyseliny octovej bol pripravený zmiešaním 215 μl /290 μl kyseliny octovej s 150 ml/200 ml čistenej vody. Bolo namerané pH 3,1. K roztoku sa pridalo 350 ml/300 ml ACN, čím vznikol pomer 30:70 (v/v)/40:60 (v/v) týchto dvoch zložiek. Zmes sa dôkladne premiešala a prefiltrovala cez 0,45 μm mikrofilter. Na záver bola umiestnená do zásobnej nádoby pre MF B.

Kombinovaná MF II.

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: 6mM octanový tlmivý roztok (CH_3CONH_4), pH 4,0:ACN v pomere 90:10 (v/v)
- MF B: 10mM TFA, pH 1,9:ACN v pomere 40:60 (v/v)

Príprava MF A:

6mM roztok octanu amónneho bol pripravený navážením 0,2081 g octanu amónneho do kadičky a následným rozpustením tejto látky pomocou 450 ml čistenej

vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH upravené na pH 4,0. K roztoku sa pridalo 50 ml ACN, čím vznikol pomer 90:10 (v/v) týchto dvoch zložiek. Zmes sa dôkladne premiešala a prefiltrovala cez 0,45 µm mikrofilter. Na záver bola umiestnená do zásobnej nádoby pre MF A.

Príprava MF B:

10mM roztok TFA bol pripravený zmiešaním 153 µl TFA s 200 ml čistenej vody. Bolo namerané pH 1,9. K roztoku sa pridalo 300 ml ACN, čím vznikol pomer 40:60 (v/v) týchto dvoch zložiek. Zmes sa dôkladne premiešala a prefiltrovala cez 0,45 µm mikrofilter. Na záver bola umiestnená do zásobnej nádoby pre MF B.

4.2.5. Príprava HPLC systému pred analýzou

Pred každou analýzou alebo pri akejkoľvek zmene v zložení mobilnej fázy bolo nutné HPLC systém prepláchnuť mobilnou fázou. Aby sa predišlo vplyvu predchádzajúcej mobilnej fázy na ďalšiu analýzu, bolo nevyhnutné ustálenie chromatografických podmienok. To sa docielilo 90 minútovým pretekaním MF systémom. Kratší čas bol považovaný za nedostatočný.

4.2.6. Východiskové chromatografické podmienky

- Teplota: 30 °C
- Prietok: 1,0 ml/min
- Detekcia: UV, 254 nm
- Vstrekaný objem: 10 µl
- Koncentrácia analyzovaných látok: 0,1 mg/ml
- MF A: čistý ACN
- MF B: 6mM octanový tlmivý roztok, pH 6,0
- Gradientová analýza

Tab. 8 Gradient č. 1, východiskové podmienky

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	5	95
1,00-5,00	5→70	95→30
5,00-11,00	70	30
11,00-13,00	70→5	30→95
13,00-15,00	5	95

4.2.7. Vývoj HPLC analýzy

Pri vývoji novej chromatografickej metódy sa pracovalo s jednotlivými analyzovanými látkami samostatne, ich koncentrácia bola 0,1 mg/ml. Neskôr sa používala zmes analyzovaných látok, ktorá obsahovala ich zníženú koncentráciu. Podrobné informácie o tejto zmesi sú uvedené v kapitole 4.2.1.

Základnými podmienkami pre analýzu bola teplota 30 °C, prietok 1,0 ml/min, vstrekaný objem 10 µl a UV detekcia pri 254 nm. Testovala sa analýza pri zvýšenej teplote a pri iných vlnových dĺžkach, no východiskové podmienky boli podľa výsledkov najvhodnejšie.

Na začiatku vývoja HPLC analýzy tvorili mobilnú fázu ACN a octanový tlmivý roztok (pH 6,0; 6mM). Tieto podmienky vychádzali z predchádzajúcej diplomovej práce uvedenej v zdroji č. 46. Analýza prebiehala vo forme gradientovej elúcie, ktorá sa postupne upravovala podľa retenčných vlastností analyzovaných látok.

V ďalšom kroku vývoja došlo k zmene pH octanového tlmivého roztoku. Mobilná fáza bola stále rovnako tvorená ACN a 6mM octanovým tlmivým roztokom, no pH sa upravovalo pomocou kyseliny octovej na pH 5,0 a neskôr na pH 4,0. Prebiehala analýza pomocou izokratickej a neskôr aj gradientovej elúcie, no vzhľadom na nevhodné výsledky sa od tohto postupu vývoja HPLC analýzy ustúpilo.

Vzhľadom k tomu, že v predchádzajúcej diplomovej práci neboli podrobne skúmané retenčné vlastnosti látok pri vyššom pH, analýza pokračovala s MF tvorenou

ACN a 6mM octanovým tlmivým roztokom, ktorého pH bolo upravované pomocou TEA na vyššie hodnoty pH, a to konkrétne na pH 7,0 a pH 9,0.

Keďže zvýšenie pH nemalo vplyv na lepšiu separáciu látok, vývoj HPLC metódy sa zameril na analýzu separácie látok pri nižšom pH. Mobilná fáza bola tvorená ACN a 25mM roztokom kyseliny octovej, pH 3,1. Analýza začala izokratickou elúciou, ktorú neskôr vystriedala gradientová analýza. Následne bol použitý 10mM roztok kyseliny octovej upravený amoniakom na pH 3,5 ako MF B. Ako ďalšia MF B bol použitý 10mM roztok TFA pH 1,9.

Separácia látok pri nižšom pH sa zdala byť výhodnejšia, no neumožňovala dôkladné oddelenie analyzovaných látok. K ďalšej analýze tak boli používané kombinované mobilné fázy uvedené v kapitole 4.2.4. Analýza prebiehala gradientovou elúciou, ktorá sa postupne vyvíjala podľa výsledkov separácie analyzovaných látok.

4.2.8. Vývoj úpravy biologickej vzorky pred analýzou

Prvým krokom bolo stanovenie vnútorného štandardu. Testovali sa tieto látky: nitrazepam, oxazepam, diazepam, medazepam, flunitrazepam, risperidon, zolpidem a lamotrigin. Ako vhodný vnútorný štandard bol zvolený flunitrazepam.

Boli testované dve rôzne metódy izolácie liečiv z plazmy, a to LLE a deproteinácia.

Deproteinácia bola prevedená dvoma rôznymi postupmi. Pomocou 430 μ l 2% metanolického roztoku kyseliny mravčej a v druhom prípade pomocou 500 μ l ACN.

Ďalším použitým postupom úpravy biologickej vzorky pred analýzou bola LLE. Boli menené extrakčné rozpúšťadla, a to chloroform, dichlórmetán a etylacetát. Ďalším meneným parametrom bola úprava acidobázických vlastností vzorky pomocou 0,1% vodného roztoku kyseliny mravčej, NH_3 alebo NaOH. Boli testované extrakcie jednostupňové aj viacstupňové.

5. Výsledky a diskusia

5.1. Optimalizácia chromatografických podmienok

5.1.1. Využitie octanového tlmivého roztoku ako súčasť MF

6mM octanový tlmivý roztok, pH 6,0

Východiskové podmienky pre vývoj HPLC analýzy sú uvedené v kapitole 4.2.6. Pre zjednodušenie analýzy bolo použité nasledujúce zloženie MF, ktoré po zmene gradientu zodpovedalo analýze v zdroji č.46.

- MF A: čistý ACN
- MF B: 6mM octanový tlmivý roztok upravený kyselinou octovou na pH 6,0

Tab. 9 Gradient č. 1

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	5	95
1,00-5,00	5→70	95→30
5,00-11,00	70	30
11,00-13,00	70→5	30→95
13,00-15,00	5	95

Komentár: Snaha zopakovať výsledky uvedené v zdroji č. 46 bola neúspešná. Norkvetiapín sa pri prvom nástreku vôbec neobjavil na chromatograme a ani po opakovaných nástrekoch vzorky sa nepodarilo získať uspokojivé výsledky. Predĺženie doby analýzy ani zmeny v gradiente neprispeli k zlepšeniu výsledkov analýzy. Ďalším krokom bola zmena v zložení MF.

6mM octanový tlmivý roztok, pH 5,0

Zloženie mobilnej fázy:

- MF A: ACN
- MF B: 6mM octanový tlmivý roztok upravený kyselinou octovou na pH 5,0

Izokratická analýza

Podľa predchádzajúcej diplomovej práce sa pri zvyšovaní organickej zložky (ACN) v MF skracaie retenčný čas norkvetiapínu. Tieto výsledky boli získané pri 30%, 40% a 50% zastúpení ACN v MF.⁴⁶ Na začiatku analýzy bolo analyzované retenčné správanie sa norkvetiapínu pomocou izokratickej analýzy pri 60%, 65%, 70%, 75% a 80% zastúpení ACN v MF.

Tab. 10 Retenčný čas norkvetiapínu, izokratická analýza, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

MF A (%)	t_R (min)
60	14,5
65	14,1
70	13,8
75	14,1
80	15,0

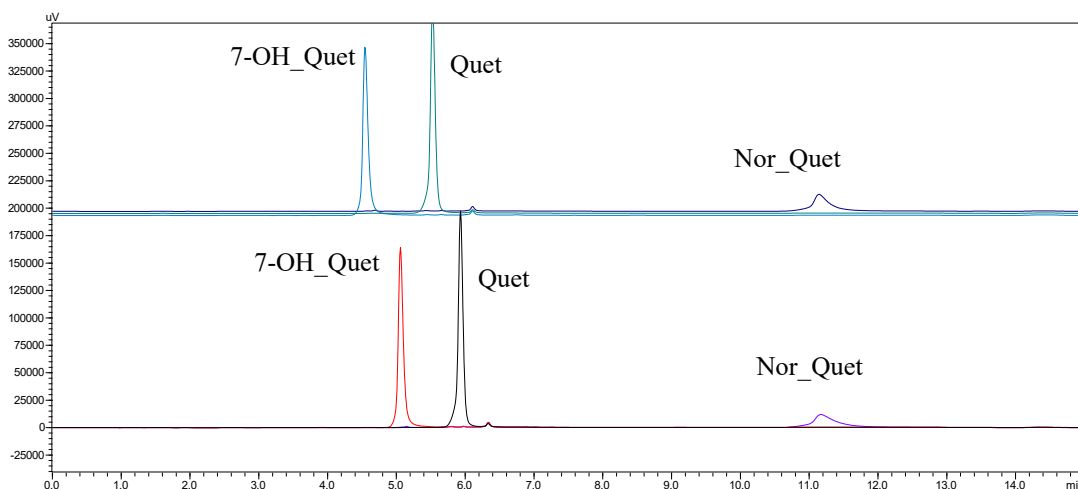
Komentár: Na základe izokratickej analýzy sa zistilo, že retenčný čas norkvetiapínu sa pri zvyšovaní ACN v danej MF výrazne nemení. Najkratší retenčný čas bol zaznamenaný pri použití MF tvorenej zo 70 % ACN a 30 % tlmivého roztoku. Pri nižšom aj vyššom obsahu ACN v MF došlo k predĺženiu t_R norkvetiapínu.

Na základe výsledkov izokratickej analýzy a údajov získaných z predchádzajúcej diplomovej práce boli použité nasledujúce gradienty pri zachovaní východiskových podmienok.

Gradientová analýza

Tab. 11 Gradient č. 2

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	5	95
0,20-5,00	5→70	95→30
5,00-11,00	70	30
11,00-13,00	70→5	30→95
13,00-15,00	5	95



Obr. 9 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 1 (dole) a gradientu č. 2 (hore); teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Gradient č. 1 je uvedený v Tab. 9. Pri zmene pH octanového tlmivého roztoku na pH 5 a zachovaní gradientu č. 1 sa podarilo získať chromatogram, v ktorom bol norkvetiapín už v prvom nástreku. Jeho retenčný čas bol viac ako 11 min. Pri nižšej hodnote pH MF bol norkvetiapín výraznejšie disociovaný, a preto boli pravdepodobne dominantnejšie kation-výmenné interakcie nad hydrofóbnymi interakciami. Kvetiapín, 7-hydroxykvetiapín a norkvetiapín boli zreteľne oddelené, no analýza trvala dlhšiu dobu (15 min), ktorú bolo potrebné skrátiť.

Pri pokuse skrátiť analýzu bol navrhnutý gradient č. 2, pri ktorom bol urýchlený začiatok analýzy. Z pôvodného klesania mobilnej fázy B z 95 % na 30 % v čase 1,00 min až 5,00 min v gradiente č. 1 bolo nastavené klesanie už od 0,20 min až do 5,00 min v gradiente č. 2. Väčší vplyv organickej zložky v gradiente č. 2 sa prejavil kratšími retenčnými časmi kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu, pravdepodobne kvôli výraznejšiemu vplyvu reverzne-fázového mechanizmu na retencii daných látok. Retenčný čas norkvetiapínu sa výrazne nezmenil, no jeho pík vykazoval symetrickejší tvar.

V ďalších gradientoch bolo skúmané, do akej miery je možné skrátiť analýzu, meniť pomery organickej a anorganickej zložky, meniť rýchlosť výmeny MF B za MF A. Nepodarilo sa skrátiť dobu analýzy ani získať lepšie výsledky ako v predchádzajúcich dvoch gradientoch. Pri zvýšení organickej zložky v MF dochádzalo k deformáciám pík norkvetiapínu na chromatograme. Vzhľadom k tomu, že výsledky neboli uspokojivé, nie sú tieto gradienty (č. 3 až č. 10) v tejto diplomovej práci uvedené.

6mM octanový tlmivý roztok, pH 4,0

Zloženie mobilnej fázy:

- MF A: ACN
- MF B: 6mM octanový tlmivý roztok, pH 4,0

Izokratická analýza

Pri vývoji HPLC analýzy bolo skúmané retenčné správanie sa analytov pri poklese pH octanového tlmivého roztoku z pH 5,0 až na pH 4,0. Pík norkvetiapínu sa však pri izokratickej analýze deformoval, preto sa z ďalšieho skúmania, ako sa dané analyty pri zložení tejto mobilnej fázy na danej kolóne správajú, ustúpilo.

6mM octanový tlmivý roztok, pH 7,0 a pH 9,0

Zloženie mobilnej fázy:

- MF A: ACN
- MF B: 6mM octanový tlmivý roztok upravený TEA na pH 7,0 a pH 9,0

Vzhľadom k tomu, že v predchádzajúcej diplomovej práci nebolo podrobne skúmané spávanie látok pri vyššom pH, analýza pokračovala s MF tvorenou ACN a 6mM octanovým tlmivým roztokom, ktorého pH bolo upravované pomocou TEA na vyššie hodnoty pH (pH 7,0 a pH 9,0).

Izokratická analýza, pH 7,0

Tab. 12 Retenčný čas norkvetiapínu, izokratická analýza, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

MF A (%)	t_R (min)
90	nedá sa určiť
80	nedá sa určiť
70	14,0
60	18,7

Komentár: Pri zvýšení pH octanového tlmivého roztoku na pH 7,0 bol norkvetiapín podrobený izokratickej analýze. Norkvetiapín sa pri 90% a 80% zastúpení ACN v MF deformoval, preto sa nedal presne určiť jeho retenčný čas. Pri znížení organickej zložky na 70 % bol jeho retenčný čas najkratší ($t_R = 14,0$ min). S následným znižovaním ACN v MF dochádzalo k predĺženiu retenčného času norkvetiapínu, pravdepodobne kvôli zníženému podielu reverzne-fázového mechanizmu na retencii látky. Retenčný čas norkvetiapínu sa nepodarilo výraznejšie skrátiť, preto sa od ďalšej analýzy pri daných podmienkach ustúpilo.

Izokratická analýza, pH 9,0

Tab. 13 Retenčný čas norkvetiapínu, izokratická analýza, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

MF A (%)	t_R (min)
90	22,0
80	13,3
70	15,0
60	19,1

Komentár: S klesajúcim percentuálnym zastúpením ACN v MF najprv retenčný čas norkvetiapínu klesal, no následne začal zase stúpať. Najkratší retenčný čas norkvetiapínu bol zaznamenaný pri 80% zastúpení ACN v MF, a to $t_R = 13,3$ min. Pri použití tejto MF tak nebolo docielené výraznejšie skrátenie retenčného času norkvetiapínu.

Tab. 14 Porovnanie t_R (min) norkvetiapínu pri rôznych hodnotách pH MF B

MF A (%)	pH 5	pH 7	pH 9
80	15,0	nedá sa určiť	22,0
70	13,8	14,0	15,0
60	14,5	18,7	19,1

V *Tab. 14* sú zhrnuté výsledky izokratickej analýzy norkvetiapínu pri rôznych hodnotách pH mobilnej fázy B. S rastúcim pH MF B dochádzalo k predĺženiu retenčného času norkvetiapínu. Bolo to pravdepodobne spôsobené tým, že pri nižších hodnotách pH

bol norkvetiapín vo väčšej miere disociovaný ako pri vyšších hodnotách pH MF B. Pri nižších hodnotách pH boli dominantnejšie kation-výmenné interakcie, zatiaľ čo pri vyšších hodnotách pH sa prevažne uplatňoval reverzne-fázový mechanizmus na retencii látky.

5.1.2. Využitie 25mM roztoku kyseliny octovej ako súčasť MF

Zloženie mobilnej fázy:

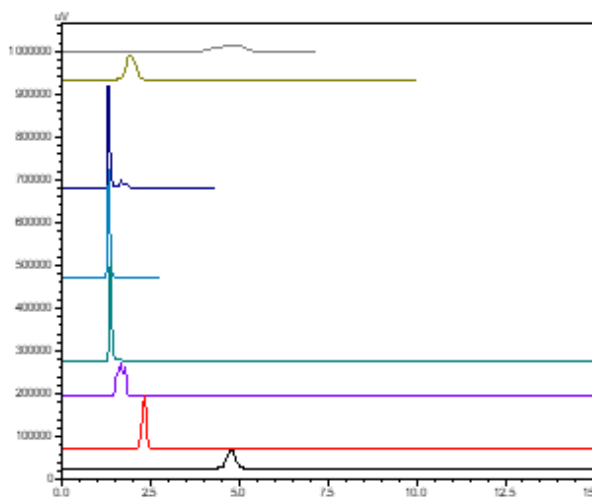
- MF A: ACN
- MF B: 25mM roztok kyseliny octovej, pH 3,1

Izokratická analýza

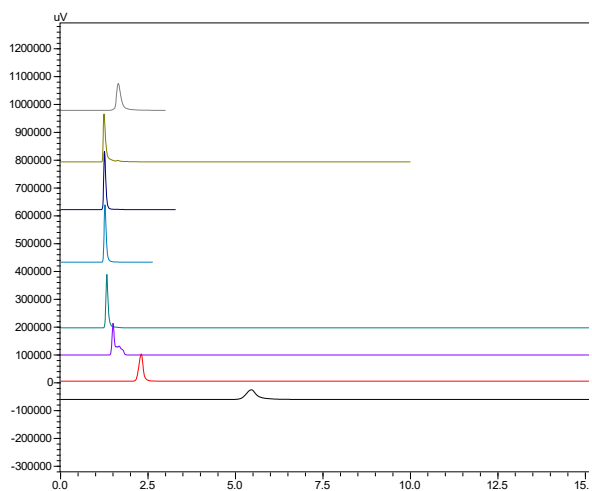
V Tab. 15 sú uvedené výsledky izokratickej analýzy kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu pri rôznom zastúpení organickej a anorganickej zložky v MF. Oproti predchádzajúcim analýzám došlo pri tomto zložení MF k výraznejšiemu poklesu retencie jednotlivých látok pri izokratickej analýze. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že analyzované látky sú ešte výraznejšie disociované a prevládajú vo väčšej miere kation-výmenné interakcie nad reverzne-fázovým mechanizmom interakcií.

Tab. 15 Zhrnutie izokratickej analýzy kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu s využitím 25mM roztoku kyseliny octovej ako MF B a ACN ako MF A, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

MF A (%)	tr (min)			Poznámka
	Norkvetiapín	Kvetiapín	7-hydroxykvetiapín	
10	nedá sa určiť	4,8	1,6	Nor_Quet nesymetrický
20	nedá sa určiť	1,9	1,5	Nor_Quet nesymetrický
30	3,3	1,3	1,3	Quet a 7-Quet sa prekrývajú
50	2,4	1,4	1,3	Quet a 7-Quet sa prekrývajú
60	2,3	1,4	1,3	Quet a 7-Quet sa prekrývajú
70	3,0	1,2	1,7	Quet a 7-Quet sa prekrývajú
80	6,8	2,3	2,3	Quet a 7-Quet sa prekrývajú
90	17,5	4,5	5,5	Quet a 7-Quet sa prekrývajú



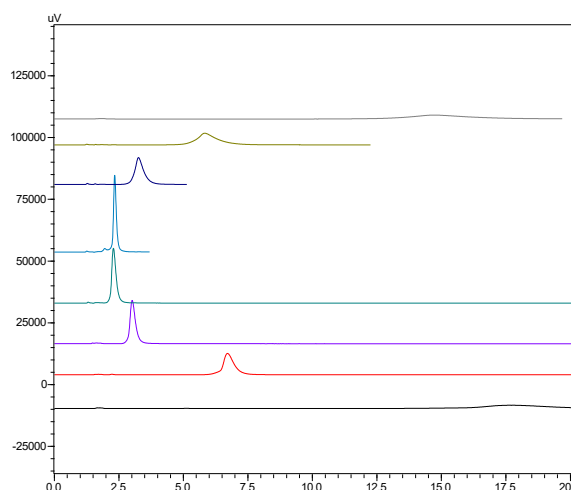
Obr. 10 Správanie kvetiapínu v závislosti na meniacom sa pomere anorganickej a organickej zložky pri izokratickej analýze. Zhora dole 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ACN v MF, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm



Obr. 11 Správanie 7-hydroxykvetiapínu v závislosti na meniacom sa pomere anorganickej a organickej zložky pri izokratickej analýze. Zhora dole 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ACN v MF, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Na Obr. 10 je znázornené retenčné správanie sa kvetiapínu pri izokratickej analýze. Pri nízkom obsahu ACN v MF (10 %, 20 %, 30 %) sa pík kvetiapínu štiepil a bol nesymetrický alebo sa tzv. chvostoval. Pri rovnakom pomere obidvoch zložiek v MF bol t_R kvetiapínu 1,3 min. Jeho pík bol symetrický a neštiepil sa. Pri výraznejšej prevahe ACN v MF (nad 70 %) došlo znovu k deformácii píku kvetiapínu.

Na Obr. 11 je znázornené správanie 7-OH_Quet pri rovnakých podmienkach analýzy. Na rozdiel od Quet bola jeho retencia pri nižšom obsahu ACN v MF výrazne nižšia a jeho pík bol vo výrazne menšej miere deformovaný. Naopak, pri vyššom obsahu ACN v MF, bola retencia 7-OH_Quet vyššia ako retencia Quet. Tieto odchýlky v správaní sú spôsobené odlišnou lipofilitou a bazicitou látok a zastúpením rôznych mechanizmov interakcií na ich retencii.



Obr. 12 Správanie norkvetiapínu v závislosti na meniacom sa pomere anorganickej a organickej zložky pri izokratickej analýze. Zhora dole 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % obsah ACN v MF, teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

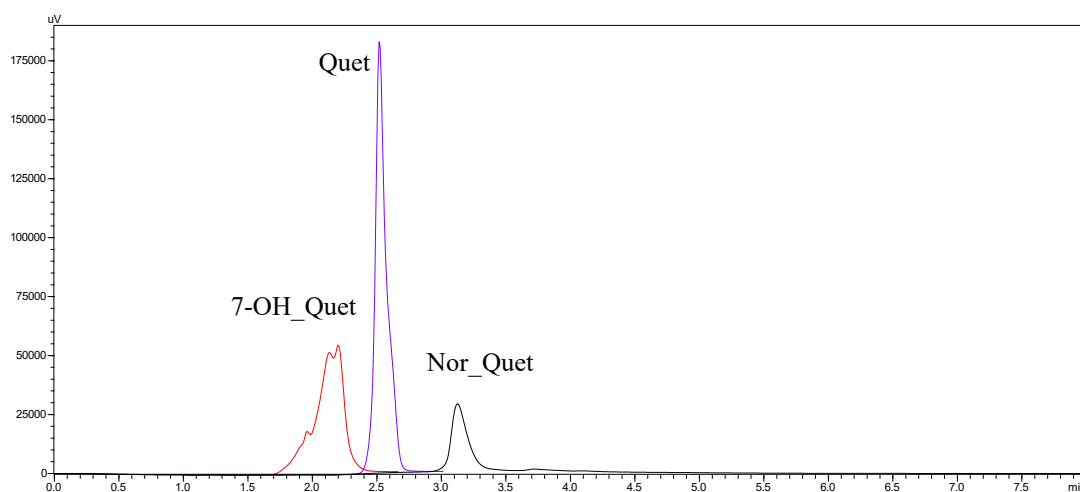
Komentár: Správanie norkvetiapínu (Obr. 12) pri izokratickej analýze bolo porovnateľné so správaním predchádzajúcich dvoch látok. Líšilo sa tým, že nedochádzalo k výraznému štiepeniu norkvetiapínu, avšak píky tejto látky sa pri nízkych a vysokých koncentráciách ACN výraznejšie tzv. chvostovali. Hodnota t_R norkvetiapínu nebola nižšia ako hodnoty t_R predchádzajúcich látok pri rovnakých podmienkach, čo znamenalo, že dochádzalo k výraznejšej retencii norkvetiapínu na SF. Príčinou bola výrazne vyššia lipofilita a bazicita norkvetiapínu.

Na základe výsledkov izokratickej analýzy bola snaha vyvinúť vhodnú gradientovú metódu, ktorá by umožňovala dokonalé oddelenie pík kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu a zároveň vďaka nízkym t_R norkvetiapínu výrazné skrátenie analýzy.

Gradientová analýza

Tab. 16 Gradient č. 11

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	10	90
0,20-2,00	10→60	90→40
2,00-7,00	60	40
7,00-7,80	60→10	40→90
7,80-8,00	10	90



Obr. 13 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 11; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

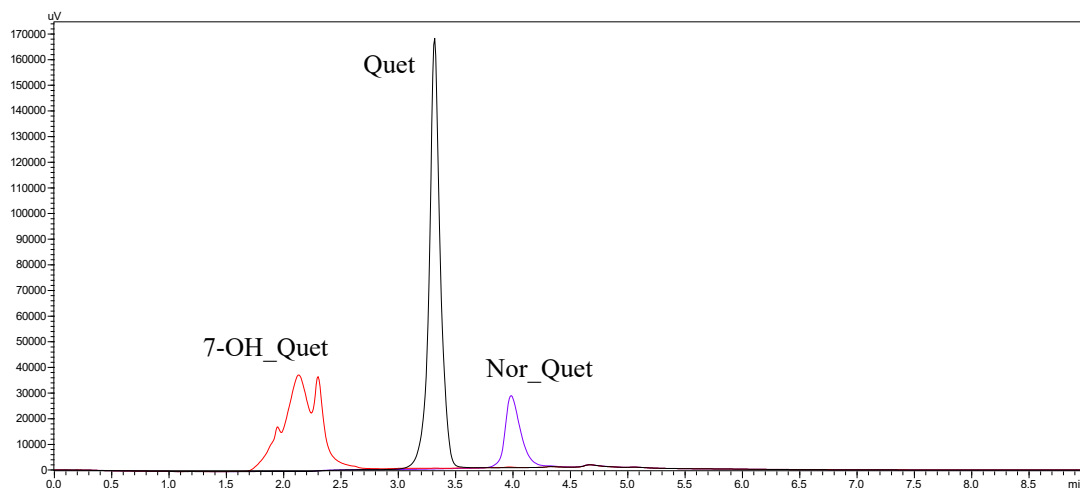
Komentár: Gradient č. 11 (Tab. 16) bol navrhnutý podľa výsledkov predchádzajúcej izokraticej analýzy. Na začiatku tohto gradientu bol znížený obsah ACN v MF, čo umožňovalo rozdelenie pík Quet a 7-OH_Quet. Následne dochádzalo k zníženiu MF B z 90 % na 40 % a tým k zvýšeniu ACN z 10 % na 60 % v MF, čím boli nastavené ideálne podmienky pre rýchlu elúciu Nor_Quet.

Retenčné časy látok nepresahovali čas 4 min, čo umožňovalo výrazné skrátenie analýzy. Pík 7-OH_Quet sa však štiepil a bol nesymetrický, čo neumožňovalo ďalšie použitie tohto gradientu. Celkový čas tejto analýzy bol skrátený na 8,00 min, čo predstavovalo významnú zmenu vo vývoji metódy na separáciu tejto zmesi látok.

Z predchádzajúcich výsledkov vyplývalo, že rýchla zmena zloženia MF na začiatku analýzy bola pre 7-OH_Quet nežiadúca a jeho pík sa preto štiepil. Preto bol navrhnutý gradient č. 12.

Tab. 17 Gradient č. 12

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	10	90
1,00-3,00	10→60	90→40
3,00-8,00	60	40
8,00-8,80	60→10	40→90
8,80-9,00	10	90



Obr. 14 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 12; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

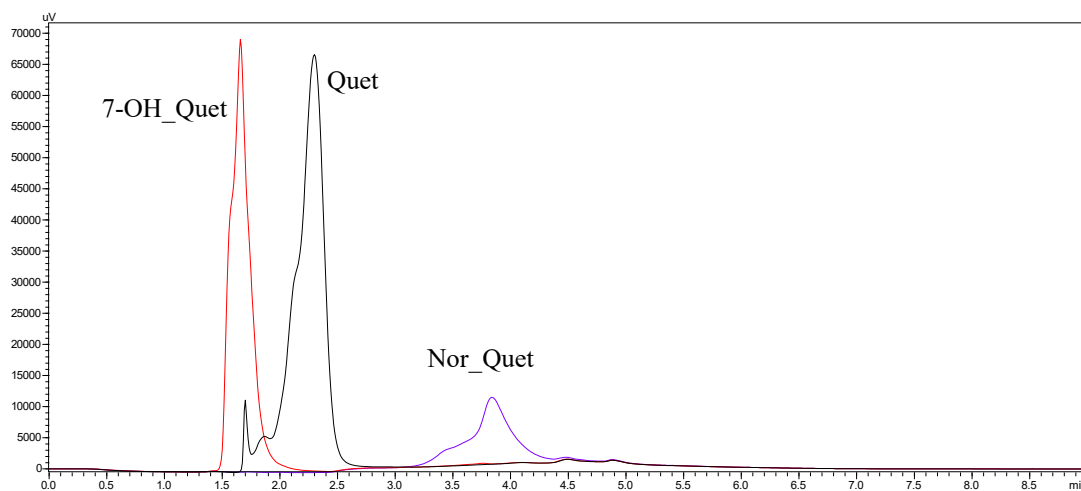
Komentár: V gradiente č. 12 došlo k predĺženiu začiatku analýzy oproti predchádzajúcemu gradientu, a to z 0,20 min až do 1,00 min bolo zloženie MF 10 % ACN a 90 % MF B. Touto zmenou došlo k predĺženiu t_R jednotlivých analytov a výraznejšiemu oddeleniu pík Quet a 7-OH_Quet. Pík 7-OH_Quet bol znovu deformovaný.

Bol navrhnutý gradient č. 13, v ktorom došlo k pozmeneniu druhého časového úseku analýzy, k jeho predĺženiu o 2 min oproti gradientu č. 11. Výsledkom bolo predĺženie t_R jednotlivých látok, no stále dochádzalo k deformácii píku 7-OH_Quet, preto tento gradient nie je uvedený.

Ďalším krokom pri vývoji metódy na separáciu danej zmesi bola zmena v počiatočnom zložení MF. V gradiente č. 14 bol na začiatku analýzy zvýšený podiel ACN na 20 %, v gradiente č. 15 na 30 % a v gradiente č. 16 na 40 %. Tieto gradienty boli odvodené od gradientu č. 12, pretože pri jeho použití bolo najlepšie rozlíšenie píkov Quet a 7-OH_Quet.

Tab. 18 Gradient č. 14

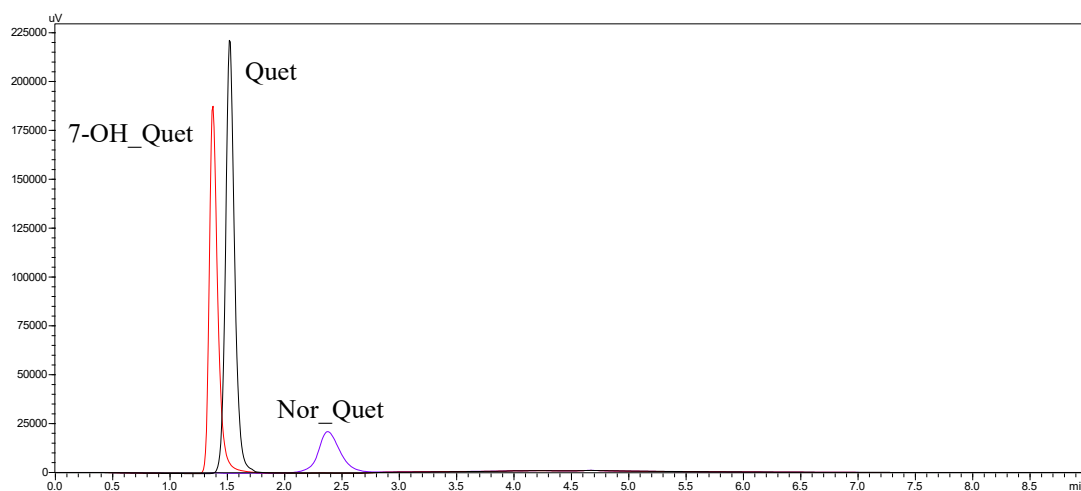
Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	20	80
1,00-3,00	20→60	80→40
3,00-8,00	60	40
8,00-8,80	60→20	40→80
8,80-9,00	20	80



Obr. 15 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 14; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Tab. 19 Gradient č. 15

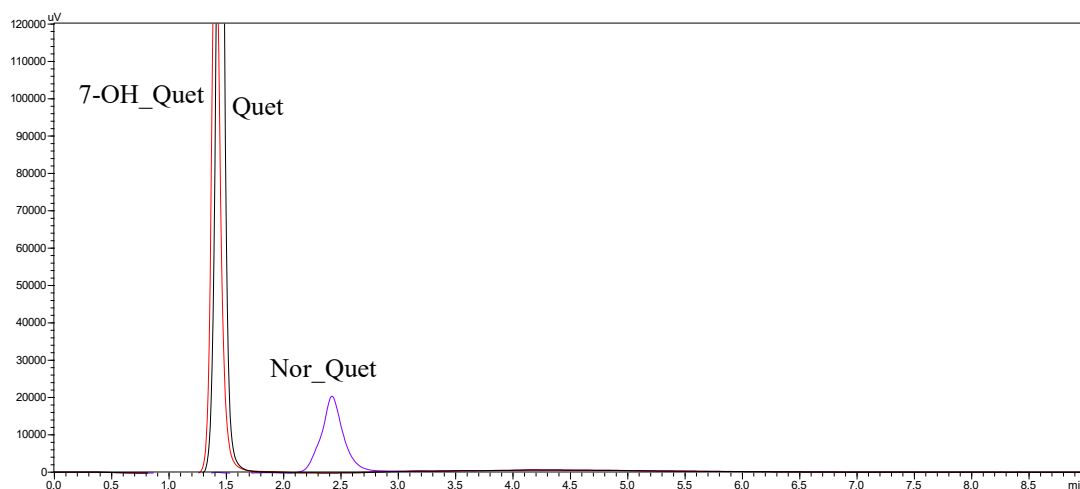
Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	30	70
1,00-3,00	30→60	70→40
3,00-8,00	60	40
8,00-8,80	60→30	40→70
8,80-9,00	30	70



Obr. 16 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 15; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Tab. 20 Gradient č. 16

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-1,00	40	60
1,00-3,00	40→60	60→40
3,00-8,00	60	40
8,00-8,80	60→40	40→60
8,80-9,00	40	60



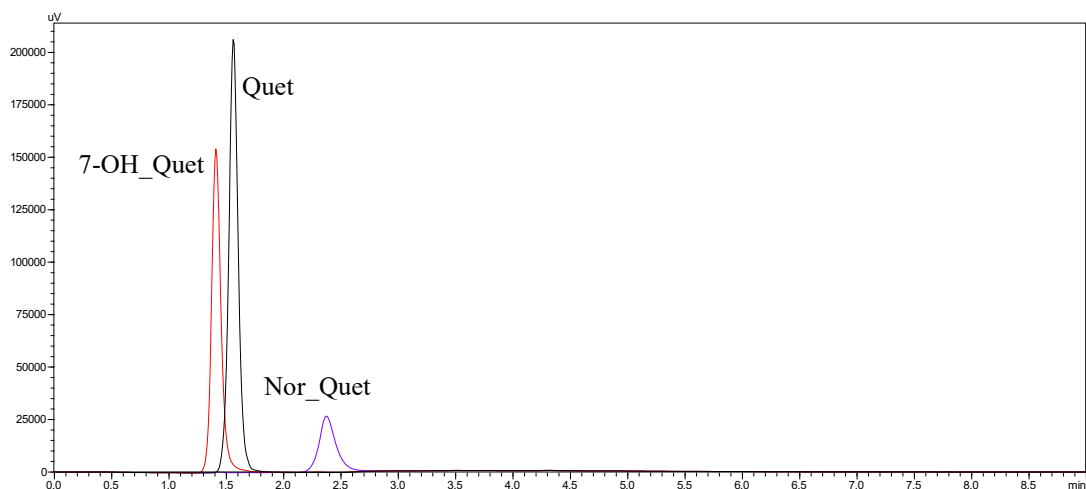
Obr. 17 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 16; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: V gradientoch č. 14, 15 a 16 došlo k postupnému zvýšeniu ACN na začiatku analýzy, a to z 10 % na 20 %, 30 % až 40 % oproti gradientu č. 12. Výsledkom tejto zmeny bola pri nižšom zvýšení ACN na začiatku analýzy deformácia pík analytov. Pri postupnom zvyšovaní ACN sa píky stávali symetrickejšie, avšak Quet a 7-OH_Quet sa postupne prekrývali. To bolo spôsobené zvýšením reverzne-fázového mechanizmu interakcií na retencii látok.

V ďalšom vývoji HPLC analýzy dochádzalo k rôznym obmenám gradientov. V snahe získať lepšie výsledky analýzy boli navrhnuté gradienty č. 17 a č. 18.

Tab. 21 Gradient č. 17

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,01	30	70
0,01-3,00	30→60	70→40
3,00-8,00	60	40
8,00-8,80	60→30	40→70
8,80-9,00	30	70

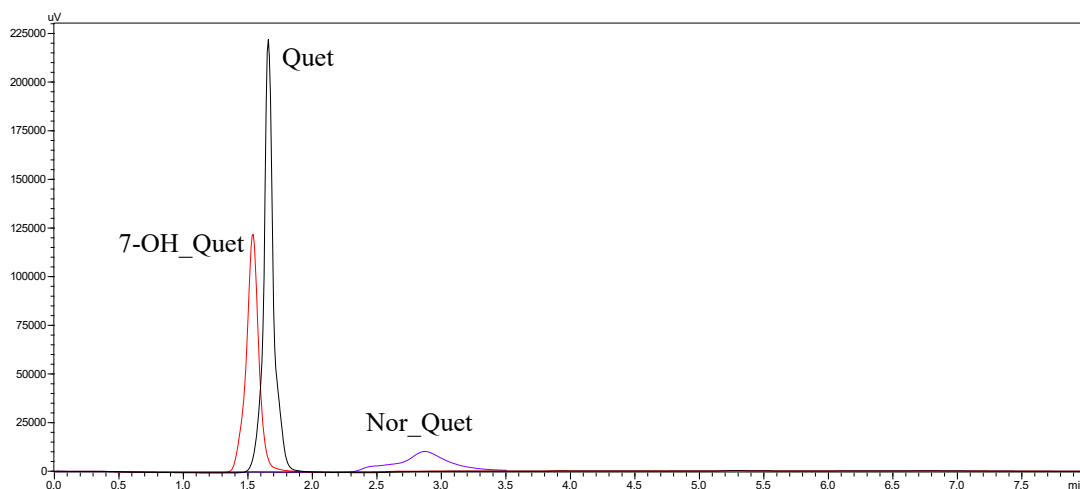


Obr. 18 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 17; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Gradient č. 17 je odvodený od gradientu č. 15, ktorého výsledky boli čiastočne uspokojivé. V gradiente č. 15 boli píky jednotlivých látok symetrické, pričom dochádzalo iba k čiastočnému prekrytiu pík Quet a 7-OH_Quet. Zmenu v gradiente č. 17 predstavuje zmena v pomere MF A a MF B v celkovom zložení MF, ktorá nastáva už od 0,01 min do 3,00 min. Oproti gradientu č. 15 však nedošlo k výraznej zmene.

Tab. 22 Gradient č. 18

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,01	30	70
0,01-5,00	30→60	70→40
5,00-7,00	60	40
7,00-7,80	60→30	40→70
7,80-8,00	30	70



Obr. 19 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 18; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Gradient č. 18 je odvodený od gradientu č. 17 predĺžením začiatkovej fázy analýzy z pôvodného intervalu 0,01–3,00 min až do 5,00 min. Výsledkom bola deformácia píku Nor_Quet. Píky Quet a 7-OH_Quet sa stále prekrývali.

V snahe dostatočne oddeliť píky Quet a 7-OH_Quet a zabrániť ich deformácii pri zachovaní krátkeho t_R Nor_Quet boli navrhnuté ďalšie gradienty, ktoré však neprinesli žiaden uspokojivý výsledok. Ich počet presahoval možnosti rozsahu tejto diplomovej práce, preto nie sú ďalej uvedené.

5.1.3. Využitie 10mM roztoku kyseliny octovej ako súčasť MF

Zloženie mobilnej fázy:

- MF A: ACN
- MF B: 10mM roztok kyseliny octovej upravený amoniakom na pH 3,5

Izokratická analýza

Izokratická analýza prebiehala s použitím rôznych pomerov MF A a MF B v celkovom zložení MF. Výsledkom bolo štiepenie analytov pri vyššom obsahu MF B. So znižujúcim sa obsahom MF B v celkovom zložení MF dochádzalo k vytváraniu symetrickejších píkov Quet a 7-OH_Quet. Pík Nor_Quet bol pri všetkých izokratických analýzach štiepený a nesymetrický, preto sa od ďalšej analýzy ustúpilo.

5.1.4. Využitie 10mM roztoku TFA ako súčasť MF

Zloženie mobilnej fázy:

- MF A: ACN
- MF B: 10mM roztok TFA, pH 1,9

Izokratická analýza

Pri izokratickej analýze bol menený pomer MF A a MF B v celkovom zložení MF. Merané pomery MF A a MF B:

- Analýza č. 1: 10 % MF A a 90 % MF B
- Analýza č. 2: 30 % MF A a 70 % MF B
- Analýza č. 3: 50 % MF A a 50 % MF B
- Analýza č. 4: 70 % MF A a 30 % MF B

Komentár: Pri analýze č. 1 dochádzalo k štiepeniu analyzovaných látok a k ich čiastočnému prekrytiu. V analýzach č. 2 až č. 4 sa analyzované látky prekrývali a ich retenčný čas bol približne 1,5 min. Na základe výsledkov sa od ďalšej analýzy pri tomto zložení MF ustúpilo.

5.1.5. Vývoj HPLC analýzy s využitím kombinovaných MF

Na základe informácií o správaní jednotlivých analytov pri použití rôznych MF boli vytvorené kombinované MF, ktoré mohli potencionálne docieľiť uspokojujúce výsledky separácie zmesi kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu. Na začiatku analýzy sa pracovalo s jednotlivými analyzovanými látkami samostatne. Ich koncentrácia bola 100 µg/ml. Neskôr sa používala zmes látok uvedená v kapitole 4.2.1. Analýza prebiehala súčasne s viacerými MF, pretože sa nedalo vopred predpokladať, ktorá MF by mohla byť vhodnejšia.

Kombinovaná MF I.

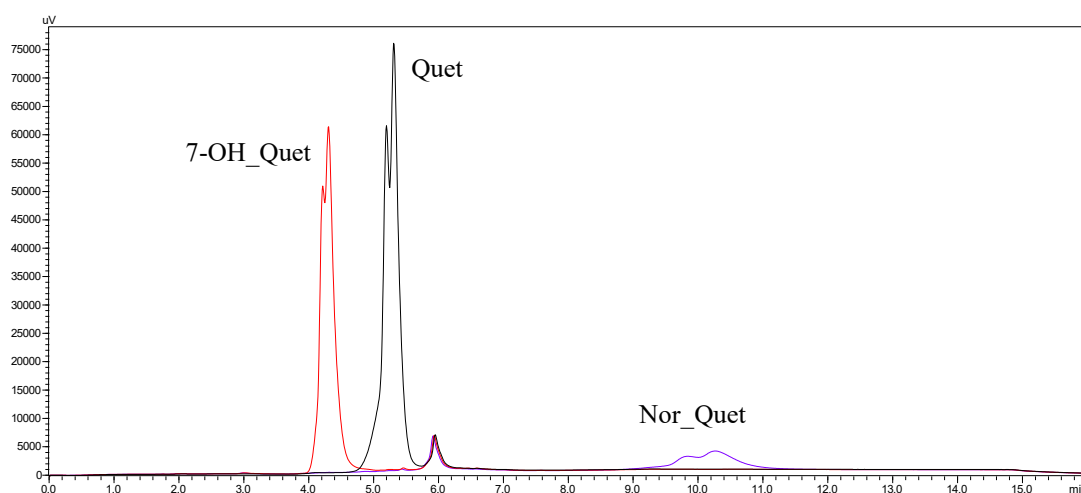
Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: 6mM octanový tlmivý roztok (CH_3CONH_4), pH4,0:ACN v pomere 80:20 (v/v) alebo 90:10 (v/v)
- MF B: 25mM kyselina octová, pH 3,1:ACN v pomere 30:70 (v/v) alebo 40:60 (v/v)

Gradient č. 19 bol vytvorený na základe výsledkov z predchádzajúcich analýz. Na začiatku gradientu bola MF tvorená 100 % MF A. Následne došlo k poklesu MF A a nárastu MF B, pričom v čase $t = 5,00$ min bola MF tvorená 100 % MF B. MF B mala za cieľ urýchliť elúciu Nor_Quet.

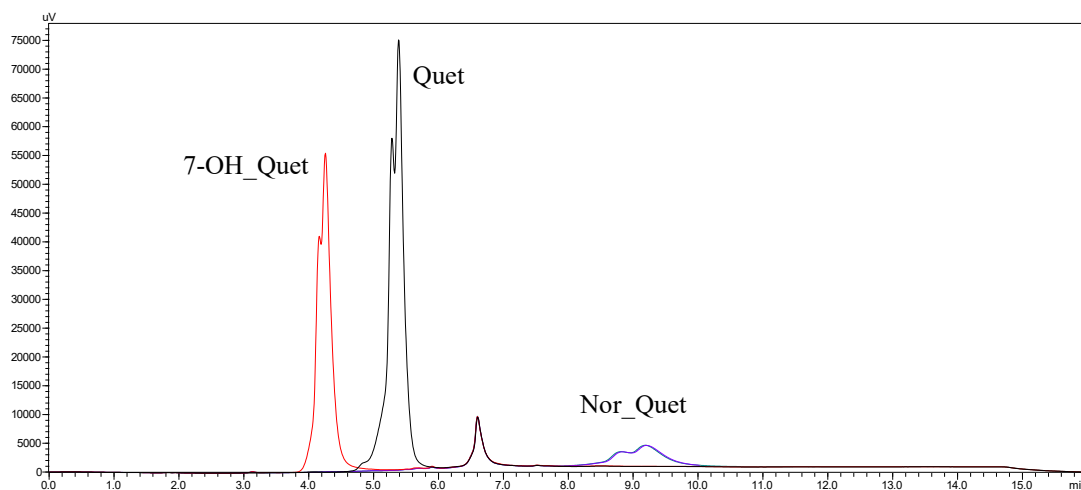
Tab. 23 Gradient č. 19

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-5,00	100→0	0→100
5,00-13,00	0	100
13,00-15,00	0→100	100→0
15,00-16,00	100	0



Obr. 20 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 19 a kombinovanej MF I. (MF A v pomere 80:20, MF B v pomere 30:70); teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Pri použití kombinovanej MF I. v danom pomere jednotlivých zložiek MF a gradientu č. 19 došlo k deformáciám píkov Quet, 7-OH_Quet a Nor_Quet.



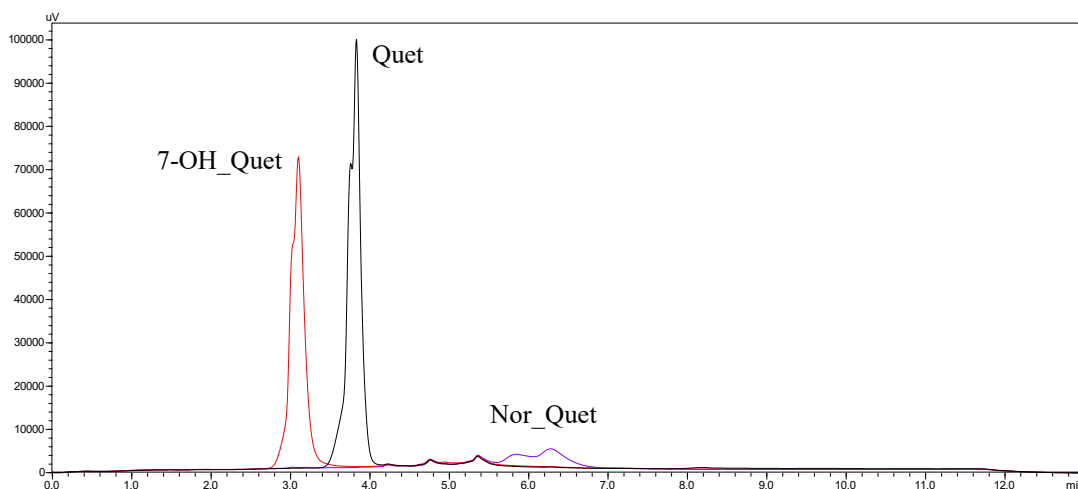
Obr. 21 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 19 a kombinovanej MF I. (MF A v pomere 90:10, MF B v pomere 40:60); teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Pri použití MF, ktorá sa skladala z MF A v pomere 90:10 a z MF B v pomere 40:60 bol retenčný čas Nor_Quet o 1 minútu kratší ako pri použití predchádzajúcej MF. Stále však dochádzalo k štiepeniu píkov analyzovaných látok.

Bol odvodený gradient č. 20, ktorý vychádzal z gradientu č. 19 v snahe získať symetrickejšie píky analyzovaných látok.

Tab. 24 Gradient č. 20

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-3,50	100→0	0→100
3,50-10,00	0	100
10,00-12,00	0→100	100→0
12,00-13,00	100	0



Obr. 22 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 20 a kombinovanej MF I. (MF A v pomere 90:10, MF B v pomere 40:60); teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

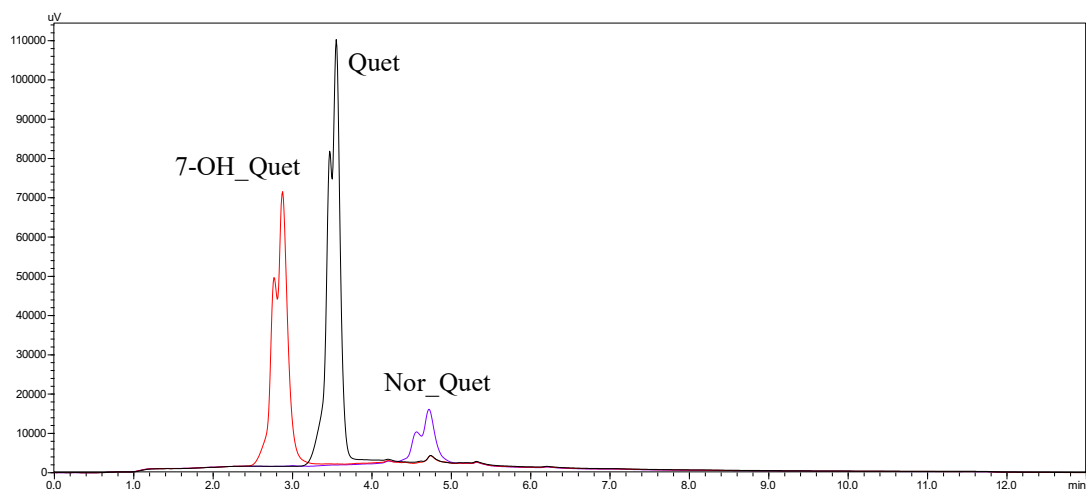
Komentár: Retenčný čas Nor_Quet bol výrazne kratší ako v predchádzajúcich analýzách, no jeho pík bol nesymetrický. Píky Quet a 7-OH_Quet boli symetrickejšie ako v predchádzajúcich analýzách.

Bolo použitých niekoľko ďalších gradientov, ktoré vzhľadom na rozsah tejto diplomovej práce nie sú ďalej uvedené. Keďže analýza nepriniesla uspokojivé výsledky, vývoj HPLC analýzy pokračoval s využitím novej kombinovanej MF.

Kombinovaná MF II.

Mobilná fáza sa skladala z 2 zložiek:

- MF A: 6mM octanový tlmivý roztok (CH_3CONH_4), pH 4,0:ACN v pomere 90:10 (v/v)
- MF B: 10mM TFA, pH 1,9:ACN v pomere 40:60 (v/v)



Obr. 23 Záznam gradientovej analýzy jednotlivých látok pri použití gradientu č. 20 a kombinovanej MF II.; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: V snahe získať lepšie píky analytov bol použitý vyššie uvedený gradient č. 20 (Tab. 24) s použitím kombinovanej MF II. Výsledkom bolo skrátenie elúcie Nor_Quet, ale neustále dochádzalo k štiepeniu analyzovaných látok.

V ďalšej analýze bola použitá zmes látok, ktorá je uvedená v kapitole 4.2.1. Vývoj HPLC analýzy bol sprevádzaný vývojom metódy na izoláciu liečiv z plazmy, preto je súčasťou analyzovanej zmesi aj flunitrazepam, ktorý bol použitý ako vnútorný štandard.

Gradient č. 21 bol obmenou gradientu č. 20. Významnou zmenou bolo skrátenie 2. časového úseku, čiže zámény MF A za MF B. Táto zmena mala za cieľ získať symetrickejšie píky analyzovaných látok. Okrem toho došlo k skráteniu celkového času analýzy na základe predtým získaných výsledkov.

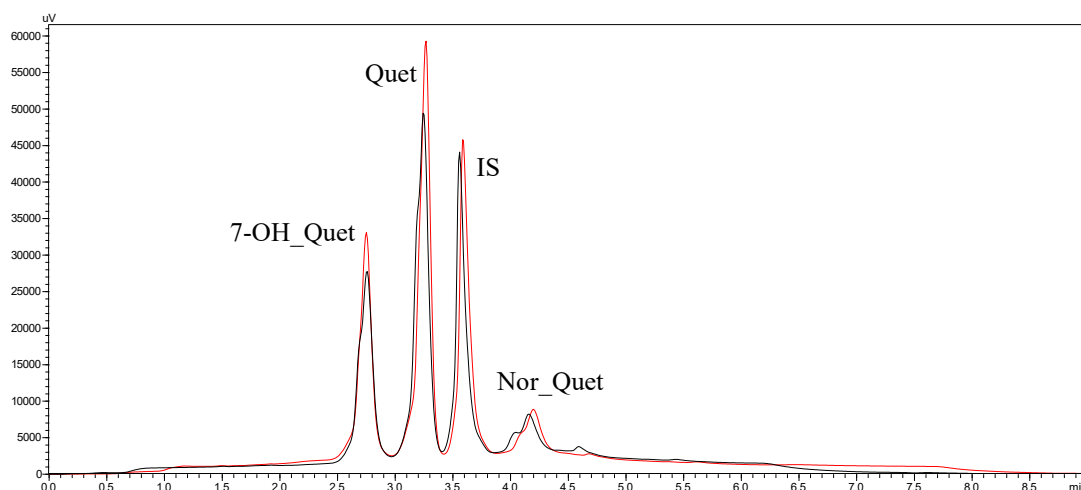
Tab. 25 Gradient č. 21

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-2,70	100→0	0→100
2,70-4,50	0	100
4,50-7,00	0→100	100→0
7,00-8,00	100	0

Gradient č. 22 bol odvodený od gradientu č. 21 predĺžením 3. časového úseku. Táto zmena mala zlepšiť separáciu Nor_Quet.

Tab. 26 Gradient č. 22

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-2,70	100→0	0→100
2,70-6,00	0	100
6,00-8,00	0→100	100→0
8,00-9,00	100	0



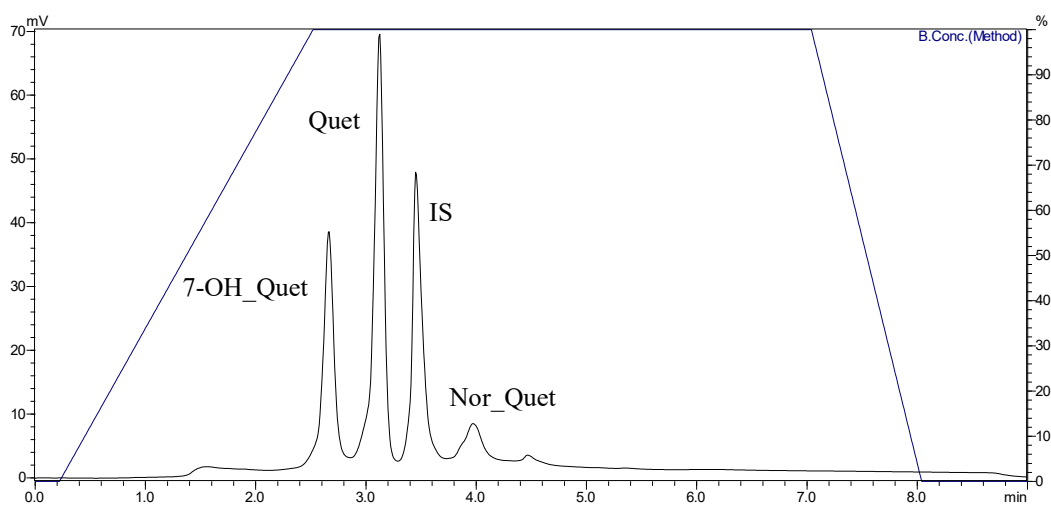
Obr. 24 Záznam gradientovej analýzy zmesi látok pri použití gradientu č. 21 (čierna), gradientu č. 22 (červená) a kombinovanej MF II.; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Výsledkom použitia gradientu č. 21 bolo skrátenie retenčného času Nor_Quet a získanie symetrickejších píkov ako v predchádzajúcich analýzach. Za píkom Nor_Quet však bol prítomný šum, ktorý bol vyvolaný zmenou v zložení MF počas analýzy. Pri použití gradientu č. 22 došlo k odstráneniu daného šumu, pričom výsledky analýzy boli takmer zhodné s predchádzajúcou analýzou.

Gradient č. 23 bol odvodený od gradientu č. 22 skrátením druhého časového úseku analýzy. Dôvodom použitia tohto gradientu bolo snaha posunúť retenčný čas Nor_Quet.

Tab. 27 Gradient č. 23

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-2,50	100→0	0→100
2,50-7,00	0	100
7,00-8,00	0→100	100→0
8,00-9,00	100	0



Obr. 25 Záznam gradientovej analýzy zmesi látok pri použití gradientu č. 23 a kombinovanej MF II.; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Komentár: Pri použití gradientu č. 23 sa podarilo skrátiť retenčný čas Nor_Quet. Píky jednotlivých analytov boli symetrické a dostatočne oddelené. Doba analýzy bola 9,00 min.

Ako vhodná metóda pre kvantitatívnu analýzu kvetiapínu a jeho metabolitov bola zvolená gradientová analýza pomocou gradientu č. 23 (Tab. 27).

5.1.6. Výsledná HPLC analýza

Podmienky:

- Teplota: 30 °C
- Prietok: 1,0 ml/min
- Detekcia: UV, 254 nm
- Vstrekaný objem: 10 µl
- MF A: 6mM octanový tlmivý roztok (CH_3CONH_4), pH 4,0:ACN v pomere 90:10 (v/v)
- MF B: 10mM TFA, pH 1,9:ACN v pomere 40:60 (v/v)
- Gradientová analýza: Gradient č. 23 (*Tab. 27*)
- Chromatogram: *Obr. 25*

5.2. Optimalizácia úpravy biologickej vzorky pred HPLC analýzou

5.2.1. Deproteinácia

Deproteinácia bola prevedená pomocou 2 činidiel, a to 2% metanolickeho roztoku kyseliny mravej a ACN. Bola testovaná deproteinácia vzorky obsahujúcej roztok kvetiapínu a flunitrazepamu v plazme. Ich koncentrácia bola 100 µg/ml plazmy. Látky norkvetiapín a 7-hydroxykvetiapín neboli testované. Postup úpravy biologickej vzorky je uvedený v kapitole 4.2.2.

Tab. 28 Hodnoty extrakčnej účinnosti pre kvetiapín v plazme, DPP (%)

	2% metanolickeý roztok kyseliny mravej	ACN
Kvetiapín	36,56	22,53

Na základne výsledkov extrakčnej účinnosti kvetiapínu sa od ďalšej analýzy pomocou deproteinácie ustúpilo. Lepšie výsledky boli dosiahnuté pomocou LLE.

5.2.2. LLE

Použitie rôznych extrakčných rozpúšťadiel

V Tab. 29 je porovnanie extrakčnej účinnosti pri použití troch extrakčných rozpúšťadiel. Koncentrácie stanovovaných látok v plazme boli 5 µg/ml kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu, 10 µg/ml norkvetiapínu a 1 µg/ml flunitrazepamu. Postup úpravy plazmy je uvedený v kapitole 4.2.3.

Tab. 29 Hodnoty extrakčnej účinnosti pre analyzované látky v plazme, LLE (%)

	Chloroform	Dichlórmetán	Etylacetát
Kvetiapín	43,66	46,32	40,72
7-hydroxykvetiapín	60,53	55,62	7,00
Norkvetiapín	24,95	21,10	18,21

Na základe výsledkov extrakčnej účinnosti bol ako najvhodnejšie rozpúšťadlo zvolený chloroform.

Jednostupňové a viacstupňové LLE

Použité koncentrácie látok v plazme boli 5 µg/ml kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu, 10 µg/ml norkvetiapínu a 1 µg/ml flunitrazepamu. Postup úpravy biologickej vzorky je uvedený v kapitole 4.2.3. Pri jednotlivých analýzach bola vypočítaná extrakčná účinnosť analyzovaných látok.

Tab. 30 Hodnoty extrakčnej účinnosti pri použití jednostupňovej extrakcie (%)

Chloroform	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl	600 µl
Kvetiapín	19,69	30,14	25,55	23,43	29,21
7-hydroxykvetiapín	31,53	35,71	41,68	53,21	56,73
Norkvetiapín	9,06	11,58	15,32	23,23	19,18

Tab. 31 Hodnoty extrakčnej účinnosti pri použití viacstupňovej extrakcie (%)

Chloroform	2×400 µl	2×300 µl	2×200 µl
Kvetiapín	36,01	32,54	29,26
7-hydroxykvetiapín	58,33	43,23	32,61
Norkvetiapín	21,31	19,98	10,53

Najlepšie výsledky boli zaznamenané pri viacstupňovej extrakcii s použitím 2×400 µl chloroformu.

Acidobázická úprava vzorky

Vzorky plazmy spolu s analyzovanými látkami boli upravované pomocou viacerých činidiel. Postup úpravy biologickej vzorky jednotlivými činidlami je uvedený v kapitole 4.2.3. Na úpravu acidobázických vlastností vzorky bol použitý koncentrovaný roztok amoniaku, roztok NaOH (0,1mol/l) a 0,1% vodný roztok kyseliny mravčej. Použité koncentrácie látok v plazme boli 5 µg/ml kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu, 10 µg/ml norkvetiapínu a 1 µg/ml flunitrazepamu.

Tab. 32 Hodnoty extrakčnej účinnosti pre analyzované látky v plazme (%)

	NH ₃	NaOH (0,1 mol/l)	0,1% roztok kyseliny mravčej
Kvetiapín	33,06	38,61	20,64
7-hydroxykvetiapín	53,18	50,54	32,42
Norkvetiapín	30,77	27,04	17,99

Na základe výsledkov extrakčnej účinnosti bol ako najvhodnejšie činidlo zvolený koncentrovaný roztok amoniaku.

5.2.3. Výsledná LLE

K 200 µl králičej plazmy sa pridalo 10 µl kvetiapínu, 10 µl 7-hydroxykvetiapínu, 20 µl norkvetiapínu a 2 µl flunitrazepamu s koncentráciou 0,1 mg/ml. Zmes sa premiešala a následne bola upravená 20 µl koncentrovaného amoniaku. Po premiešaní sa pridalo 400 µl chloroformu. Zmes sa trepala 2 minúty a následne 10 minút centrifugovala pri 9 000 otáčkach za minútu. Bolo odobratých 350 µl supernatantu. Do skúmavky sa znovu primiešalo 400 µl chloroformu a proces sa zopakoval. Supernatant (350+350 µl) bol následne odparený pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustil v 100 µl metanolu, vložil do insertu a bol podrobený HPLC analýze.

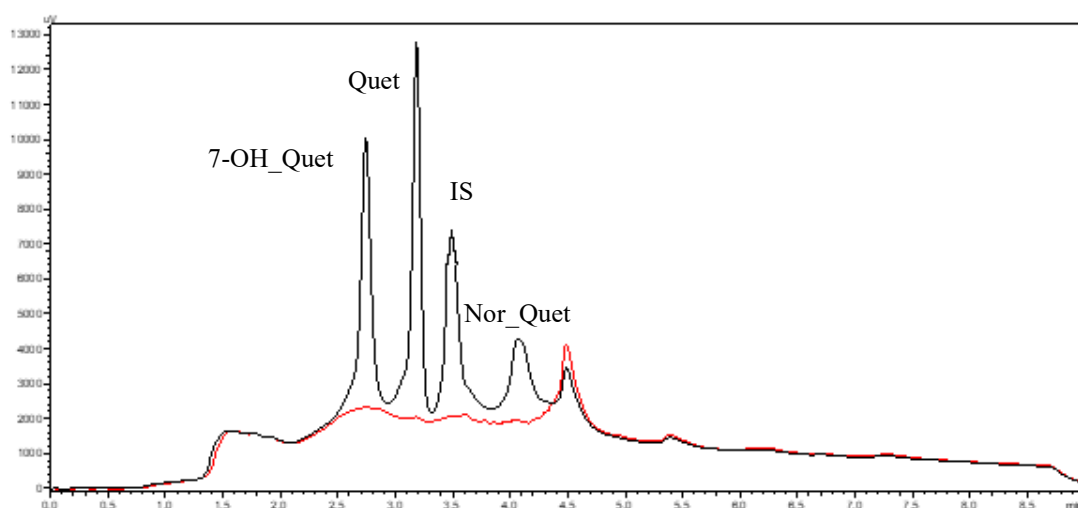
5.3. Validácia metódy

LLE kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu a následná HPLC analýza bola validovaná podľa doporučení FDA a ICH. Validačnými parametrami boli selektivita, LOD, LOQ, správnosť, presnosť, extrakčná účinnosť, linearita, stabilita analyzovaných látok a robustnosť.

5.3.1. Selektivita

Pre zistenie selektivity bola použitá vzorka plazmy s analyzovanými látkami s koncentraciami 5 $\mu\text{g/ml}$ kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu, 10 $\mu\text{g/ml}$ norkvetiapínu a 1 $\mu\text{g/ml}$ IS (flunitrazepam) v plazme. Bola použitá kombinovaná MF II. a gradient č. 23 (Tab. 27).

Metóda je selektívna, pretože píky analyzovaných látok sú dostatočne oddelené a neinterferujú s píkmi balastov z plazmy.



Obr. 26 Chromatogram prázdnej plazmy (červený) a plazmy obsahujúcej kvetiapín, 7-hydroxykvetiapín, norkvetiapín a IS (čierny), teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

5.3.2. Limit detekcie a kvantifikácie

LOD a LOQ boli stanovené pre kvetiapín, 7-hydroxykvetiapín a norkvetiapín. Hodnoty LOD a LOQ sú vyjadrené pomocou koncentrácie stanovovaných látok v plazme.

Hodnoty LLOQ boli stanovené z grafu závislosti RSD (%) na koncentrácii látok v plazme a následne experimentálne overené. Pre kvetiapín boli použité koncentrácie v plazme 0,12; 0,10 a 0,04 µg/ml, pre 7-hydroxykvetiapín 0,13; 0,10 a 0,04 µg/ml a pre norkvetiapín 0,20; 0,15 a 0,06 µg/ml.

Tab. 33 Hodnoty LOD, LOQ a LLOQ

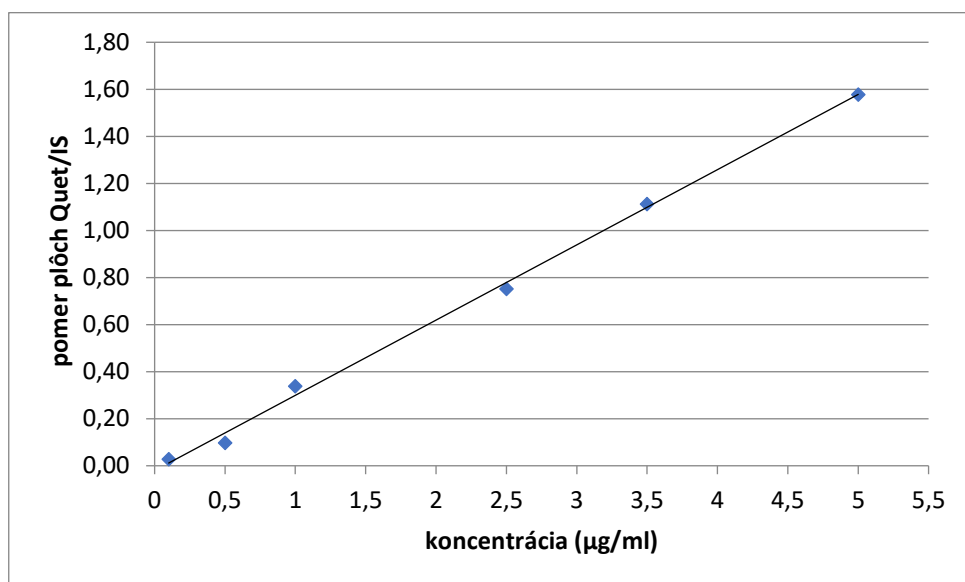
	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	LLOQ (µg/ml)
Kvetiapín	0,04	0,12	0,09
7-hydroxykvetiapín	0,04	0,13	0,10
Norkvetiapín	0,06	0,20	0,18

5.3.3. Linearita

Zobrazením linearity je kalibračná priamka, ktorá znázorňuje závislosť odozvy detektora na koncentrácii analyzovanej látky vo vzorke. Kalibračná priamka bola meraná pri 6 koncentráciách. Všetky koncentračné stupne boli hodnotené z 5 vzoriek. Získané výsledky boli spracované pomocou metódy lineárnej regresie. Koncentrácia IS bola 1 µg/ml plazmy.

Tab. 34 Hodnoty kalibračnej priamky pre kvetiapín

Koncentrácia Quet v plazme ($\mu\text{g/ml}$)	Pomer plôch Quet/IS
5,0	1,5786
3,5	1,1124
2,5	0,7516
1,0	0,3385
0,5	0,0974
0,1	0,0279



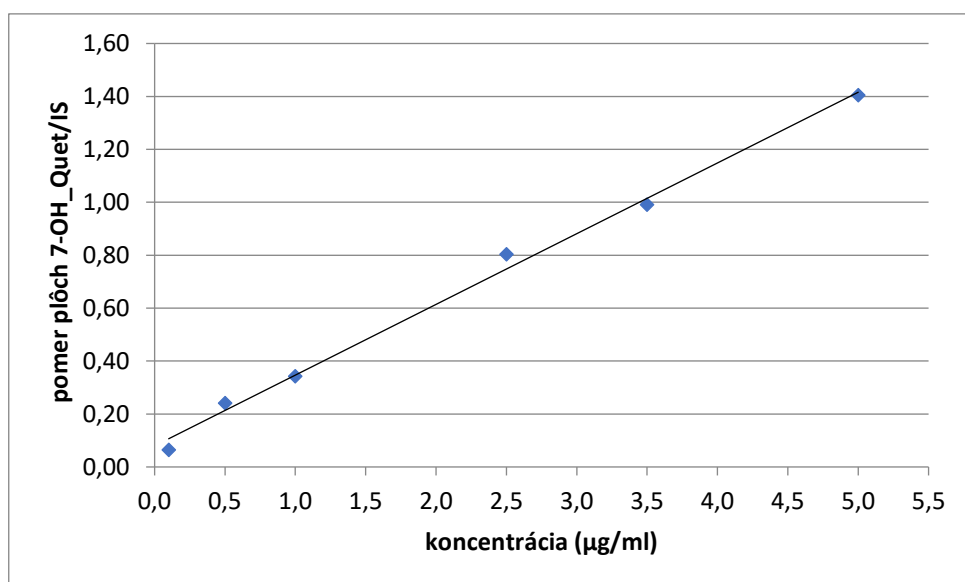
Obr. 27 Graf závislosti pomeru plôch Quet/IS na koncentrácii kvetiapínu v plazme

Regresná rovnica : $y = 0,3198x - 0,0205$

Korelačný koeficient: $R = 0,9988$

Tab. 35 Hodnoty kalibračnej priamky pre 7-hydroxykvetiapín

Koncentrácia 7-OH_Quet v plazme ($\mu\text{g/ml}$)	Pomer plôch 7-OH_Quet/IS
5,0	1,4044
3,5	0,9906
2,5	0,8035
1,0	0,3422
0,5	0,2410
0,1	0,0645



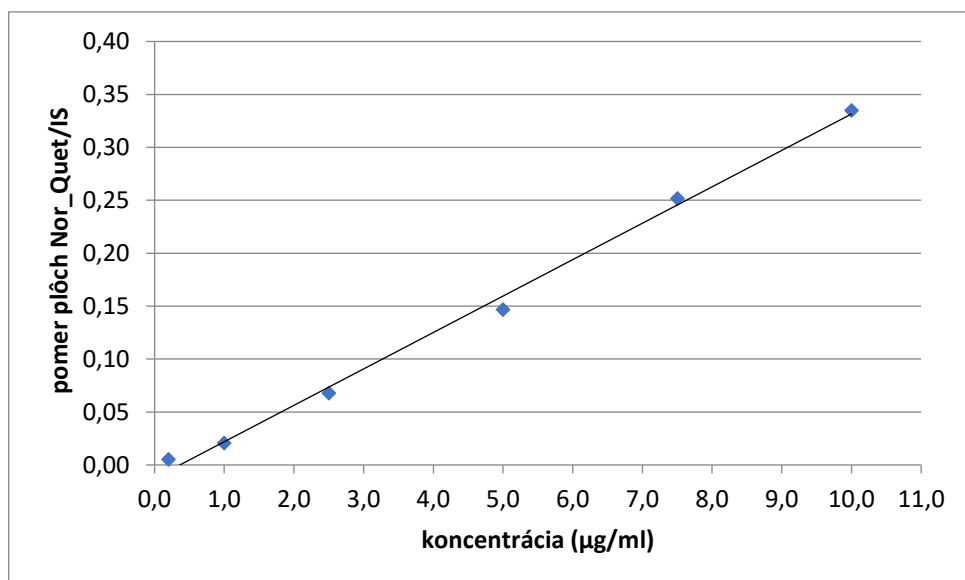
Obr. 28 Graf závislosti pomeru plôch 7-OH_Quet/IS na koncentrácii 7-hydroxykvetiapínu v plazme

Regresná rovnica : $y = 0,2672x + 0,0799$

Korelačný koeficient: $R = 0,9975$

Tab. 36 Hodnoty kalibračnej priamky pre norkvetiapín

Koncentrácia Nor_Quet v plazme ($\mu\text{g/ml}$)	Pomer plôch Nor_Quet/IS
10,0	0,3347
7,5	0,2516
5,0	0,1467
2,5	0,0679
1,0	0,0205
0,2	0,0051



Obr. 29 Graf závislosti pomeru plôch Nor_Quet/IS na koncentrácii norkvetiapínu v plazme

Regresná rovnica : $y = 0,0344x - 0,0124$

Korelačný koeficient: $R = 0,9979$

5.3.4. Správnosť

Správnosť bola určená na troch koncentračných hladinách. Všetky koncentračné hladiny boli hodnotené z 5 vzoriek LLE. Hodnotené koncentrácie kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu v plazme boli 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml a 5 µg/ml. Hodnotené koncentrácie norkvetiapínu v plazme boli 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml a 10 µg/ml. Koncentrácia IS v plazme bola 1 µg/ml. Hodnota správnosti by mala byť v rozmedzí 15 % od skutočnej hodnoty s výnimkou LLOQ, kde by sa táto hodnota nemala odchýliť o viac ako 20 % od skutočnej hodnoty. Výsledky sú uvedené v *Tab. 37*, *Tab. 38* a *Tab. 39*.

Koncentrácia Quet (µg/ml)	Plocha píku Quet	Priemer Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Quet/IS	Vypočítaná koncentrácia (µg/ml)	Odchýlka (%)
5,00	46639	46377	31275	31454	1,47	4,70	-6,09
	46442		31641				
	46049		31447				
	47055	47335	32473	32474	1,46	4,64	-7,15
	47440		32481				
	47509		32468				
	42807	42279	30640	30623	1,38	4,40	-11,98
	41625		30624				
	42405		30606				
	46528	46526	31419	31431	1,48	4,71	+5,73
	46406		31427				
	46645		31448				
	50162	50186	30496	30485	1,65	5,24	-4,70
	50093		30475				
	50302		30484				
2,50	22058	22125	30463	30482	0,73	2,34	-6,23
	22061		30486				
	22256		30496				
	24290	24116	32603	32587	0,74	2,39	-4,44
	24129		32596				
	23928		32563				
	22050	22048	31540	31549	0,70	2,26	-9,61
	22090		31572				
	22005		31535				
	25274	25378	31293	30909	0,82	2,64	+5,74
	25119		30692				
	25742		30742				
	23838	23561	31651	31661	0,74	2,40	-3,93
	23333		31678				
	23511		31654				

Koncentrácia Quet (µg/ml)	Plocha píku Quet	Priemer Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Quet/IS	Vypočítaná koncentrácia (µg/ml)	Odchýlka (%)
0,50	4139	4134	31106	31130	0,13	0,48	-3,65
	4142		31011				
	4121		31274				
	3998	3971	30761	30372	0,13	0,48	-4,93
	3917		30192				
	3999		30162				
	3776	3786	32173	32255	0,12	0,43	-13,32
	3795		32337				
	3788		32255				
	4501	4510	30855	30493	0,15	0,53	+5,85
	4536		30069				
	4494		30554				
	4064	4052	31430	31553	0,13	0,47	-6,39
	4004		31569				
	4088		31659				

Tab. 37 Stanovenie správnosti pre kvetiapín

Koncentrácia 7OHQ (µg/ml)	Plocha píku 7OHQ	Priemer 7OHQ	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch 7OHQ/IS	Vypočítaná koncentrácia (µg/ml)	Odchýlka (%)
5,00	44135	44498	31275	31454	1,41	4,95	-1,07
	44702		31641				
	44657		31447				
	45756	45693	32473	32474	1,41	4,92	-1,63
	45986		32481				
	45338		32468				
	40218	40211	30640	30623	1,31	4,57	-8,60
	40274		30624				
	40142		30606				
	45052	45496	31419	31431	1,45	5,07	+1,36
	45636		31427				
	45801		31448				
	48275	48317	30496	30485	1,58	5,58	+11,55
	48489		30475				
	48188		30484				
2,50	23112	23385	30463	30482	0,77	2,55	+1,86
	23504		30486				
	23538		30496				
	26251	26946	32603	32587	0,83	2,77	+10,72
	27958		32596				
	26629		32563				
	23993	24098	31540	31549	0,76	2,53	+1,37
	24333		31572				
	23969		31535				
	21700	21550	31293	30909	0,70	2,29	-8,51
	21730		30692				
	21219		30742				
	22132	22078	31651	31661	0,70	2,29	-8,49
	22045		31678				
	22058		31654				

Koncentrácia 7OHQ ($\mu\text{g/ml}$)	Plocha píku 7OHQ	Priemer 7OHQ	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch 7OHQ/IS	Vypočítaná koncentrácia ($\mu\text{g/ml}$)	Odchýlka (%)
0,50	7221	7194	31106	31130	0,23	0,56	+11,92
	7197		31011				
	7163		31274				
	6799	6791	30761	30372	0,22	0,53	+6,37
	6781		30192				
	6793		30162				
	6561	6477	32173	32255	0,20	0,45	-10,53
	6454		32337				
	6415		32255				
	6971	6963	30855	30493	0,23	0,55	+9,89
	6934		30069				
	6983		30554				
	6727	6762	31430	31553	0,21	0,50	-0,51
	6775		31569				
	6784		31659				

Tab. 38 Stanovenie správnosti pre 7-hydroxykvetiapín

Koncentrácia NQuet (µg/ml)	Plocha píku NQuet	Priemer NQuet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch NQuet/IS	Vypočítaná koncentrácia (µg/ml)	Odchýlka (%)
10,00	9546	9597	31275	31454	0,31	9,34	-6,64
	9586		31641				
	9660		31447				
	10720	10779	32473	32474	0,33	10,12	+1,24
	10769		32481				
	10848		32468				
	9278	9266	30640	30623	0,30	9,26	-7,39
	9235		30624				
	9285		30606				
	11300	11659	31419	31431	0,37	11,27	+12,72
	11351		31427				
	12326		31448				
	10256	10273	30496	30485	0,34	10,27	+2,73
	10280		30475				
	10283		30484				
5,00	5172	5173	30463	30482	0,17	5,35	+7,06
	5182		30486				
	5165		30496				
	5368	5374	32603	32587	0,16	5,21	+4,24
	5389		32596				
	5364		32563				
	4865	4850	31540	31549	0,15	4,88	-2,33
	4852		31572				
	4834		31535				
	4952	5008	31293	30909	0,16	5,13	+2,54
	4998		30692				
	5074		30742				
	4523	4568	31651	31661	0,14	4,60	-7,90
	4587		31678				
	4593		31654				

Koncentrácia NQuet (µg/ml)	Plocha píku NQuet	Priemer NQuet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch NQuet/IS	Vypočítaná koncentrácia (µg/ml)	Odchýlka (%)
1,00	648	650	31106	31130	0,02	0,98	-2,44
	647		31011				
	654		31274				
	771	777	30761	30372	0,03	1,11	+11,39
	754		30192				
	805		30162				
	555	584	32173	32255	0,02	0,89	-10,57
	592		32337				
	605		32255				
	549	576	30855	30493	0,02	0,92	-8,30
	591		30069				
	587		30554				
	689	681	31430	31553	0,02	1,00	-0,38
	701		31569				
	652		31659				

Tab. 39 Stanovenie správnosti pre norkvetiapín

5.3.5. Presnosť

Presnosť bola určená na troch koncentračných hladinách. Všetky koncentračné hladiny boli hodnotené z 5 vzoriek LLE. Hodnotené koncentrácie kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu v plazme boli 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml a 5 µg/ml. Hodnotené koncentrácie norkvetiapínu v plazme boli 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml a 10 µg/ml. Koncentrácia IS v plazme bola 1 µg/ml. Hodnoty presnosti by mali byť v rozmedzí 15 % od skutočnej hodnoty s výnimkou LLOQ, kde by sa táto hodnota nemala odchýliť o viac ako 20 % od skutočnej hodnoty. Výsledky sú uvedené v *Tab. 40*, *Tab. 41* a *Tab. 42*.

Koncentrácia Quet (µg/ml)	Plocha píku Quet	Priemer Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Quet/IS	RSD
5,00	47514	48015	30956	31477	1,53	9,42
	48439		31753			
	48091		31722			
	41720	42360	30251	30361	1,40	
	42698		30399			
	42662		30433			
	53366	54520	32471	32911	1,66	
	55214		33087			
	54981		33174			
	53356	54303	31804	32139	1,69	
	54771		32362			
	54782		32252			
	50520	50329	31547	31514	1,60	
	49545		31270			
50921	31725					
2,50	22217	22350	31655	31801	0,70	9,07
	22698		32282			
	22136		31466			
	24485	24661	33618	33967	0,73	
	24763		34072			
	24735		34210			
	20005	20261	29786	29375	0,69	
	20345		29129			
	20432		29210			
	21546	21793	30516	30796	0,71	
	22087		31118			
	21747		30755			
	19015	19137	27976	27889	0,69	
	19175		27842			
19222	27849					

Koncentrácia Quet (µg/ml)	Plocha píku Quet	Priemer Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Quet/IS	RSD
0,50	3825	3835	31606	31464	0,12	7,40
	3847		31011			
	3832		31774			
	3741	3746	30781	30348	0,12	
	3789		30112			
	3709		30152			
	3868	3865	31173	31255	0,12	
	3841		31337			
	3887		31255			
	4426	4435	32865	32459	0,14	
	4452		32060			
	4428		32453			
	4305	4358	31340	31429	0,14	
	4391		31231			
	4377		31716			

Tab. 40 Stanovenie presnosti pre kvetiapín

Koncentrácia 7OHQ (µg/ml)	Plocha píku 7OHQ	Priemer 7OHQ	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch 7OHQ/IS	RSD (%)
5,00	49645	50736	30956	31477	1,61	7,00
	51141		31753			
	51423		31722			
	43329	43806	30251	30361	1,44	
	44115		30399			
	43975		30433			
	42932	43720	32471	32911	1,33	
	44149		33087			
	44079		33174			
	41519	42174	31804	32139	1,31	
	42642		32362			
	42362		32252			
	44638	44144	31547	31514	1,40	
	43641		31270			
44154	31725					
2,50	21972	22042	31655	31801	0,69	2,79
	22326		32282			
	21828		31466			
	23094	23348	33618	33967	0,69	
	23431		34072			
	23520		34210			
	22165	21850	29786	29375	0,74	
	21608		29129			
	21777		29210			
	21601	21810	30516	30796	0,71	
	22018		31118			
	21811		30755			
	22563	22502	27976	27889	0,81	
	22410		27842			
22534	27849					

Koncentrácia 7OHQ (µg/ml)	Plocha píku 7OHQ	Priemer 7OHQ	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch 7OHQ/IS	RSD (%)
0,50	7254	6976	31606	31464	0,22,	5,36
	6843		31011			
	6832		31774			
	6398	6363	30781	30348	0,21	
	6368		30112			
	6322		30152			
	7083	7029	31173	31255	0,23	
	6901		31337			
	7103		31255			
	7436	7441	32865	32459	0,23	
	7402		32060			
	7486		32453			
	6931	7005	31340	31429	0,22	
	6980		31231			
	7104		31716			

Tab. 41 Stanovenie presnosti pre 7-hydroxykvetiapín

Koncentrácia Nor_Quet (µg/ml)	Plocha píku Nor_Quet	Priemer Nor_Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Nor_Quet/IS	RSD (%)
10,00	9105	9180	30956	31477	0,29	7,61
	9258		31753			
	9178		31722			
	10459	10479	30251	30361	0,35	
	10487		30399			
	10491		30433			
	10057	10091	32471	32911	0,31	
	10152		33087			
	10065		33174			
	11520	11488	31804	32139	0,36	
	11417		32362			
	11528		32252			
	10793	10779	31547	31514	0,34	
	10764		31270			
10781	31725					
5,00	4694	4689	31655	31801	0,15	10,66
	4690		32282			
	4682		31466			
	5374	5368	33618	33967	0,16	
	5374		34072			
	5357		34210			
	4456	4503	29786	29375	0,15	
	4562		29129			
	4491		29210			
	4665	4681	30516	30796	0,15	
	4689		31118			
	4689		30755			
	3830	3879	27976	27889	0,14	
	3917		27842			
3891	27849					

Koncentrácia Nor_Quet (µg/ml)	Plocha píku Nor_Quet	Priemer Nor_Quet	Plocha píku IS	Priemer IS	Pomer plôch Nor_Quet/IS	RSD (%)
1,00	805	809	31606	31464	0,03	8,13
	862		31011			
	759		31774			
	665	703	30781	30348	0,02	
	650		30112			
	794		30152			
	789	804	31173	31255	0,03	
	826		31337			
	796		31255			
	847	840	32865	32459	0,03	
	839		32060			
	834		32453			
	741	741	31340	31429	0,02	
	732		31231			
	749		31716			

Tab. 42 Stanovenie presnosti pre norkvetiapín

5.3.6. Extrakčná účinnosť

Extrakčná účinnosť sa definuje ako stonásobok množstva analyzovanej látky extrahovanej pomocou LLE z plazmy a množstva analyzovanej látky, ktoré bolo do plazmy pridané. Extrakčná účinnosť bola stanovená na troch koncentračných hladinách. Všetky koncentračné hladiny boli hodnotené z 5 vzoriek LLE. Výsledky sú uvedené v *Tab. 43* a *Tab. 44*.

Tab. 43 Hodnoty extrakčnej účinnosti kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu

	Kvetiapín	7-hydroxykvetiapín
0,5 µg/ml	36,82	53,46
2,5 µg/ml	34,43	48,43
5,0 µg/ml	38,72	56,33

Tab. 44 Hodnoty extrakčnej účinnosti norkvetiapínu

	Norkvetiapín
1,0 µg/ml	20,17
5,0 µg/ml	23,60
10,0 µg/ml	22,80

5.3.7. Stabilita

Stabilita vzoriek bola sledovaná po ich uložení v autosampleri pri teplote 25 °C. Týkalo sa to vzoriek obsahujúcich analyzované látky po LLE z plazmy. Po 24 hodinách nedochádzalo k zmenám v analýze vzoriek. Rozdiel v koncentráciách analyzovaných látok sa nelíšil o viac ako 1 %.

Pri sledovaní stability mobilnej fázy došlo k odchýlkam v analýze. Retenčné časy analyzovaných látok sa po 24 a 48 hodinách zhodovali s predchádzajúcimi výsledkami, no po 72 hodinách dochádzalo k zmenám v retenčných časoch analyzovaných látok. Je preto nutné pravidelne pripravovať novú mobilnú fázu.

5.3.8. Robustnosť

Bola testovaná miera vplyvu premenných experimentálnych podmienok na separáciu analyzovaných látok.

Bol sledovaný vplyv zloženia mobilnej fázy na analýzu. Pri zmene pH v MF A o 5 % dochádzalo k zlievaniu pík IS a kvetiapínu. Pri znížení koncentrácie TFA v MF B o 5 % dochádzalo k štiepeniu pík analyzovaných látok.

Ďalším sledovaný parametrom bola zmena teploty pri analýze. Pri zvýšení teploty analýzy na 50 °C dochádzalo k zníženej separácii pík kvetiapínu a 7-hydroxykvetiapínu.

Na základe výsledkov daných premenných experimentálnych podmienok táto metóda analýzy kvetiapínu a jeho dvoch metabolitov nie je výrazne robustná. Je nutné presné dodržiavanie podmienok analýzy.

5.3.9. Zhrnutie validácie

Tab. 45 Súhrn validačných parametrov pre kvetiapín

Selektivita	Preukázaná
LOD	0,04 µg/ml
LOQ	0,12 µg/ml
Extrakčná účinnosť	36,66 %
Správnosť	RSD = 5,78 % R _i v rozmedzí 88,02–105,85 %
Presnosť	RSD = 8,63 %
Linearita	$y = 0,3198x - 0,0205$ R = 0,9988
Robustnosť	Nízka

Tab. 46 Súhrn validačných parametrov pre 7-hydroxykvetiapín

Selektivita	Preukázaná
LOD	0,04 µg/ml
LOQ	0,13 µg/ml
Extrakčná účinnosť	52,74 %
Správnosť	RSD = 6,07 % R _i v rozmedzí 89,47–111,92 %
Presnosť	RSD = 5,05 %
Linearita	$y = 0,2672x + 0,0799$ R = 0,9975
Robustnosť	Nízka

Tab. 47 Súhrn validačných parametrov pre norkvetiapín

<i>Selektivita</i>	Preukázaná
<i>LOD</i>	0,06 µg/ml
<i>LOQ</i>	0,20 µg/ml
<i>Extrakčná účinnosť</i>	22,19 %
<i>Správnosť</i>	RSD = 8,84 % R _i v rozmedzí 89,43–112,72 %
<i>Presnosť</i>	RSD = 8,80 %
<i>Linearita</i>	$y = 0,0344x - 0,0124$ R = 0,9979
<i>Robustnosť</i>	Nízka

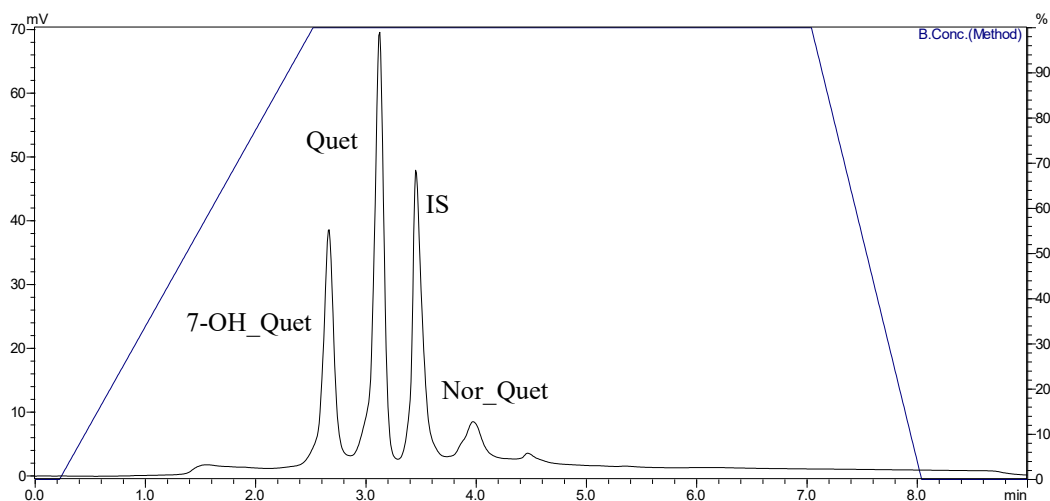
6. Záver

V teoretickej časti tejto diplomovej práce bola zhrnutá problematika HPLC analýzy, bioanalýzy liečiv a validácie bioanalytických metód. Bola spracovaná krátka rešerš, ktorá sa týkala prehľadu chromatografických podmienok pre stanovenie kvetiapínu a jeho metabolitov uvedených v literatúre (kapitola 3.6). Okrem toho boli spracované informácie o úprave biologického materiálu obsahujúceho stanovované látky (kapitola 3.7). Táto diplomová práca nadväzovala na diplomovú prácu uvedenú v zdroji č. 46.

V experimentálnej časti boli optimalizované podmienky pre HPLC analýzu kvetiapínu, 7-hydroxykvetiapínu a norkvetiapínu. Podarilo sa skrátiť dobu analýzy na 9,00 min. Bol použitý nižšie uvedený gradient č. 23 (Tab. 48). Chromatogram je uvedený na Obr. 30. Konkrétne podmienky analýzy sú uvedené v kapitole 5.1.6.

Tab. 48 Gradient č. 23

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,00-0,20	100	0
0,20-2,50	100→0	0→100
2,50-7,00	0	100
7,00-8,00	0→100	100→0
8,00-9,00	100	0



Obr. 30 Záznam gradientovej analýzy zmesi látok pri použití gradientu č. 23 a kombinovanej MF II.; teplota: 30 °C, prietok: 1,0 ml/min, detekcia: 254 nm

Následne bola optimalizovaná úprava plazmy pred HPLC analýzou. Ako vnútorný štandard bol zvolený flunitrazepam. Za vhodnú metódu bola zvolená LLE s použitím chloroformu (extrakčné rozpúšťadlo) a amoniaku (látka upravujúca acidobazické podmienky analýzy). Bola použitá viacstupňová extrakcia s použitím 2×400 µl chloroformu. Postup úpravy biologického materiálu pred HPLC analýzou je uvedený v kapitole 5.2.3.

Vyvinutá metóda bola validovaná a je možné ju použiť na stanovenie kvetiapínu a jeho dvoch metabolitov z plazmy. Validáčn é parametre (kapitola 5.3.9.) vyhovovali podmienkam stanoveným FDA a ICH pre bioanalýzu liečiv. Validácia preukázala nízku robustnosť metódy, preto je nutné presné dodržiavanie stanovených podmienok.

7. Zoznam použitých skratiek

7-OH_Quet – 7-hydroxykvetiapín

ACN – acetonitril

DLLME – disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (z angl. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

DMSPE – disperzná mikroextrakcia v systéme kvapalina-tuhá fáza (z angl. *Dispersive Micro Solid Phase Extraction*)

DPP – deproteinácia

EDTPA – ethylendiamin *N, N, N', N'*- tetrametylenfosfonová kyselina (z angl. *ethylenediamine-N, N, N', N'-tetra(methylenephosphonic) acid*)

EMA – Európska agentúra pre lieky (z angl. *European Medicines Agency*)

FDA – Americký úrad pre kontrolu potravín a liekov (z angl. *Food and Drug Administration*)

HF-LPME – extrakcia pomocou dutého vlákna (z angl. *Hollow Fiber-based Liquid-Phase Microextraction*)

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. *High Performance Liquid Chromatography*)

ICH – *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IS – vnútorný štandard (z angl. *Internal Standard*)

LLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (z angl. *Liquid-Liquid Extraction*)

LOD – limit detekcie (z angl. *Limit of Detection*)

LOQ – limit kvantifikácie (z angl. *Limit of Quantitation*)

LLOQ – dolný limit kvantifikácie (z angl. *Lower Limit of Quantification*)

LPME – mikroextrakcia kvapalnou fázou (z angl. *Liquid-Phase Microextraction*)

MARTA – multireceptoroví antagonisti (z angl. *Multiacting Receptor-Targeted Antagonists*)

MF – mobilná fáza

MIPs – polyméry s molekulovými odtlačkami (z angl. *Molecularly Imprinted Polymers*)

MS – hmotnostný spektrometer

MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria

Nor_Quet – norkvetiapín

NP-LC – kvapalinová chromatografia na normálnych fázach (z angl. *Normal Phase Liquid Chromatography*)

ODS – oktadecylsilikagel (z angl. *Oktadecylsilica*)

PBD – polybutadién

Quet – kvetiapín

resp. – respektíve

RP-LC – kvapalinová chromatografia na reverzných fázach (z angl. *Reversed Phase Liquid Chromatography*)

SDME – mikroextrakcia jednou kvapkou (z angl. *Single-Drop Microextraction*)

SF – stacionárna fáza

SPE – extrakcia tuhou fázou (z angl. *Solid Phase Extraction*)

SPME – mikroextrakcia na tuhej fáze (z angl. *Solid-Phase Microextraction*)

TEA – trietylamín

TFA – trifluoroctová kyselina

TLC – chromatografia na tenkej vrstve (z angl. *Thin Layer Chromatography*)

t_R – retenčný čas

UV – ultrafialová oblasť svetla (z angl. *Ultra Violet*)

8. Použitá literatura

1. Kolektív autorov. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7
2. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001657?lang=en®ion=CZ> [stiahnuté a modifikované 10. 04. 2018].
3. Saller, Ch. F.; Salama, A. I. Seroquel: Biochemical profile of a potential atypical antipsychotic. *Psychopharmacology (Berlin, Ger.)*, **1993**, *112*, 285–292.
4. Baune, B. T. New developments in the management of major depressive disorder and generalized anxiety disorder: role of quetiapine. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **2008**, *4*, 1181–1191.
5. Hasselstrom, J.; Linnet, K. In vitro studies on quetiapine metabolism using the substrate depletion approach with focus on drug-drug interactions. *Drug Metab. Drug Interact.*, **2006**, *21*, 187–211.
6. Bakken, G. V. et al. Metabolism of the active metabolite of quetiapine, *N*-desalkylquetiapine in vitro. *Drug Metab. Dispos.*, **2012**, *40*, 1778–1784.
7. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0129363&tab=texts> [stiahnuté 10. 04. 2018].
8. Bakken, G. V. et al. Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B₅. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*, 254–258.
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quetiapine#section=Experimental-Properties> [stiahnuté 07. 11. 2017].
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/132203#section=Top> [stiahnuté 07. 11. 2017].
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11369918#section=Top> [stiahnuté 07. 11. 2017].
12. <https://www.trc-canada.com/product-detail/?KIT1245> [stiahnuté a modifikované 10. 04. 2018].
13. López-Muñoz, F.; Alamo, C. Active metabolites as antidepressant drugs: the role of norquetiapine in the mechanism of action of quetiapine in the treatment of mood disorders. *Front. Psychiatry*, **2013**, *4*:102. doi: 10.3389/fpsy.2013.00102.

14. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/07849?lang=en®ion=CZ>
[stiahnuté a modifikované 10. 04. 2018].
15. Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
16. Klimeš, J. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami.* Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3
17. <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>
[stiahnuté 08. 11. 2017].
18. Zhang, B.; Li, X.; Yan, B. Advances in HPLC detection—towards universal detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *390*, 299–301.
19. Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
20. Nawrocki, J. et al. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1028*, 1–30.
21. Li, J.; Hu, Y.; Carr, W. P. Fast separations at elevated temperatures on polybutadiene-coated zirconia reversed-phase material. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 3884–3888.
22. Li, J.; Carr, W. P. Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using polybutadiene-coated zirconia. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2202–2206.
23. Nawrocki, J. et al. New materials for biotechnology: Chromatographic stationary phases based on zirconia. *Biotechnol. Prog.*, **1994**, *10*, 561–573.
24. Dunlap, Ch. J. et al. Peer reviewed: Zirconia stationary phases for extreme separations. *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 598–607.
25. Sanagi, M. M. et al. High temperature liquid chromatography of triazole fungicides on polybutadiene-coated zirconia stationary phase, *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1059*, 95–101.
26. Nawrocki, J. et al. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1028*, 31–62.
27. <https://www.zirchrom.com/newsletter.asp> [stiahnuté 08. 11. 2017].

28. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9659234> [stiahnuté 12. 11. 2017].
29. <https://www.zirchrom.com/Columns.asp> [stiahnuté 12. 11. 2017].
30. <https://www.zirchrom.com/newsletterprint.asp> [stiahnuté 12. 11. 2017].
31. Sameh, A.; Noha, N. A. Fast and efficient zirconia-based reversed phase chromatography for selective determination of triptans in rat plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, *143*, 241–251.
32. Gama, M. R.; Bottoli, C. B. G. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2017**, *1043*, 107–121.
33. Soltani, S.; Jouyban, A. Biological sample preparation: Attempts on productivity increasing in bioanalysis. *Bioanalysis*, **2014**, *6*, 1691–1710.
34. Raterink, R. J. et al. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2014**, *61*, 157–167.
35. Filippou, O. et al. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2017**, *1043*, 44–62.
36. Kole, P. L. et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, *25*, 199–217.
37. De Faria H. D. et al. New advances in restricted access materials for sample preparation: A Review. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, *959*, 43–65.
38. Nazario, C. E. D. et al. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2017**, *1043*, 81–95.
39. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> [stiahnuté 05. 02. 2018].
40. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf [stiahnuté 05. 02. 2018].
41. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf [stiahnuté 05. 02. 2018].

42. Tiwari, G.; Tiwari, R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharm. Methods*, **2010**, *1*, 25–38.
43. Silvia Gracia, M. et al. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of the antipsychotics clozapine, olanzapine and quetiapine, several beta-blockers and their metabolites. *Biomed. Chromatogr.*, **2017**, *31*, e3968.
44. Li, D. et al. Preparation of magnetic ODS-PAN thin-films for microextraction of quetiapine and clozapine in plasma and urine samples followed by HPLC-UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *125*, 319–328.
45. Youssef, R. M. et al. Selective RP-HPLC method for determination of quetiapine in presence of coadministered drugs: Application for long-term stability study of quetiapine in whole blood. *Acta Chromatogr.*, **2016**, *28*, 263–279.
46. Koldová, V. Hodnocení Quetiapinu pomocí HPLC. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.
47. Park, S. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of bupropion, quetiapine and escitalopram in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, **2015**, *29*, 612–618.
48. Carrenõ F. et al. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *119*, 152–158.
49. Iqbal, M. UHPLC-MS/MS assay using environment friendly organic solvents: A green approach for fast determination of quetiapine in rat plasma. *Arabian J. Chem.*, **2014**, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.039>.
50. Li, K. et al. Simultaneous determination of quetiapine and three metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2004**, *25*, 110–114.