

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Analytické hodnotenie liečiv s využitím HPLC IV.

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Kristína Mojšová

Vedúci práce : RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Hradec Králové, 2018

Prehlásenie autorky:

„ Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa

Podpis:

Pod'akovanie

Ďakujem môjmu vedúcemu práce RNDr. Milanovi Mokrému za jeho odborné vedenie, metodickú pomoc a cenné rady, ktoré mi poskytol pri vypracovaní diplomovej práce. Moje pod'akovanie patrí tiež celému kolektívu Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy. Taktiež ďakujem mojej rodine za neustálu podporu a trpezlivosť pri štúdiu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Kristína Mojšová

Školiteľ: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Názov diplomovej práce: Analytické hodnotenie liečiv s využitím HPLC IV.

Táto práca sa zaoberá vývojom vhodnej metódy pre analýzu ketoprofenu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Ako stacionárna fáza bola použitá kolóna LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm), mobilná fáza obsahovala zmes metanolu a roztoku KH_2PO_4 (pH 3,4) v pomere 60:40 (v/v). Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min, teplota kolóny 25 °C a látky boli detegované pri vlnovej dĺžke 254 nm. Za týchto podmienok bol výsledný retenčný čas ketoprofenu 7,9 minút. Pre kvantitatívne hodnotenie bol ako vhodný vnútorný štandard zvolený benetazon. V ďalšej časti práce boli hľadané podmienky pre chirálnu separáciu analyzovaného liečiva za použitia normálneho ako aj reverzného módu. Pre analýzu ketoprofenu bola zvolená kolóna Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm od firmy Daicel Chemical industries a mobilná fáza heptán : 2-propanol v pomere 97:3 s prídavkom 0,6 ml kyseliny mravčej. Pri prietoku 0,7 ml/min boli získané retenčné časy okolo 20 minút. Na záver bola vykonaná extrakcia ketoprofenu z ľudskej plazmy, pre ktorú bola vybraná metóda extrakcie v systéme kvapalina-kvapalina s priemernou výtťažnosťou 102,42 %. V rámci validácie vyvinutej metódy boli hodnotené parametre ako presnosť, správnosť, linearita, selektivita a detekčný a kvantitatívny limit.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Candidate: Kristína Mojšová

Supervisor: RNDr. Milan Mokrý, CSc.

Title of master's thesis: Analytical evaluation of drugs using HPLC IV.

This thesis describes development of the suitable method for ketoprofen analysis by high performance liquid chromatography. For this aim a LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) column was used as a stationary phase and mobile phase contained mixture of methanol and aqueous KH₂PO₄ buffer (pH 3,4) in a ratio of 60:40 (v/v). The flow rate was set to 1 ml/min, temperature on the column was 25 °C and substances were detected at a wave length of 254 nm. Under these conditions final retention time of ketoprofen was 7,9 minutes. Benetazon was chosen as an appropriate internal standard for the quantitative evaluation. In the next part we were looking for suitable conditions for the chiral separation of the analyzed drug by using normal and reverse mode. Separation of ketoprofen's enantiomers was carried out on a Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm, from Daicel Chemical Industries using a mobile phase of heptane and 2-propanol in a ratio of 97:3, with the addition of 0,6 ml formic acid. At a flow rate of 0,7 ml/min, retention times took about 20 minutes. Finally, extraction of ketoprofen from human plasma was performed, as the best method was chosen a liquid-liquid extraction with an average yield of 102,42 %. After the development of the method, these validation parameters were evaluated: precision, accuracy, linearity, selectivity, limit of detection and limit of quantification.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. CIEĽ PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ	10
3.1 DEFINÍCIA A ROZDELENIE CHROMATOGRAFICKÝCH METÓD	10
3.2 HPLC	13
3.2.1 Prístrojové vybavenie HPLC.....	13
3.2.2 Hodnotenie HPLC chromatogramu.....	18
3.3 ZÁKLADNÉ CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY	21
3.3.1 Retenčné charakteristiky	21
3.3.2 Účinnosť chromatografickej kolóny	21
3.3.3 Rozlíšenie.....	22
3.3.4 Pomer signálu k šumu	23
3.3.5 Opakovateľnosť.....	23
3.3.6 Selektivita.....	24
3.4 SÚČASNÉ TRENDY V KVPALINOVEJ CHROMATOGRAFII.....	25
3.4.1 UHPLC.....	25
3.4.2 Povrchovo porézne častice.....	26
3.4.3 Monolitické kolóny	26
3.5 CHIRÁLNA CHROMATOGRAFIA	28
3.5.1 Mechanizmy chirálnej separácie	28
3.5.2 Nepriame metódy chirálnej separácie	29
3.5.3 Priame metódy chirálnej separácie.....	29
3.5.4 Chirálny selektory	30
3.6 ÚPRAVA BIOLOGICKÝCH VZORIEK.....	35
3.6.1 Priame dávkovanie biologickej vzorky na kolónu	35
3.6.2 Deproteinácia	36
3.6.3 Extrakcia kvapalina – kvapalina (LLE)	37
3.6.4 Extrakcia pevnou fázou (SPE)	38
3.6.5 Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME).....	39
3.7 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANEJ LÁTKY	41
3.7.1 Ketoprofén a dexketoprofén.....	43
3.7.2 Práca zaoberajúca sa HPLC analýzou ketoprofenu	43
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	49
4.1 POUŽITÉ PRÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, POMÔCKY	49
4.1.1 Prístroje	49
4.1.2 Chromatografické kolóny.....	50
4.1.3 Chemikálie	50
4.1.4 Štandardy	50
4.1.5 Pomôcky.....	51

4.2	CHROMATOGRAFICKÉ PODMIENKY PRE HPLC ANALÝZU KETOPROFÉNU	52
4.2.1	Výber mobilnej fázy.....	52
4.2.2	Výber vnútorného štandardu	53
4.2.3	Overenie linearity.....	53
4.2.4	Vypracovanie podmienok pre separáciu enantiomérov	54
4.2.5	Analýza v biologickom materiáli.....	56
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	59
5.1	CHROMATOGRAFICKÉ PODMIENKY PRE HPLC ANALÝZU KETOPROFÉNU	59
5.1.1	Stacionárna a mobilná fáza	59
5.1.2	Vnútorný štandard.....	60
5.1.3	Výber vlnovej dĺžky.....	61
5.1.4	Overenie linearity.....	62
5.2	CHIRÁLNA ANALÝZA KETOPROFÉNU POMOCOU HPLC	63
5.2.1	Stacionárna a mobilná fáza	63
5.3	ANALÝZA V BIOLOGICKOM MATERIÁLI	65
5.3.1	Overenie linearity v plazme	66
5.3.2	Selektivita.....	67
5.3.3	Detekčný a kvantitatívny limit.....	67
5.3.4	Presnosť, správnosť.....	68
5.3.5	Opakovateľnosť nástreku.....	69
6.	ZÁVER	70
7.	ZOZNAM SKRATIEK.....	71
8.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	72

1. Úvod

HPLC je bez pochyb jednou z tých analytických metód, ktoré zaznamenali v uplynulých rokoch najväčší rozvoj. Klasická kolónová kvapalinová chromatografia je najstaršou zo všetkých chromatografických metód. Bola objavená Cvetom už v roku 1906, ktorý ako prvý rozdelil na stĺpci sorbentu listové farbivá. Prvými kvapalinovými chromatografmi boli automatické analyzátory aminokyselín, vyvinuté začiatkom päťdesiatich rokov. Táto technika bola avšak veľmi prácna, zdĺhavá a účinnosť delenia bola veľmi malá. Až po aplikácii množstva poznatkov z plynovej chromatografie či iných disciplín sa kvapalinová chromatografia stala dnes vysoko účinnou analytickou metódou s automatickou detekciou chromatografovaných látok. Jej význam neustále rastie, pretože umožňuje analyzovať prakticky všetky organické látky v množstvách od desiatok percent do stotisícín percenta, a to v rozpätí relatívnych molekulových hmotností od stovky do niekoľko desiatok či tisíc. Kvapalinovú chromatografiu je teda možno použiť k analýze vysokomolekulárnych a biochemicky významných látok, predovšetkým vo farmaceutickom priemysle, klinickej chémii a biochémií, ďalej v farbiarskom, chemickom, potravinárskom priemysle a tiež pre kontrolu čistoty životného prostredia. ^{1,2}

Vo farmaceutickom odvetví sa využíva hlavne pre kontrolne-analytické hodnotenie liečiv, teda pre overenie totožnosti, stanovenie obsahu a kontrolu čistoty daných liečivých látok. Má význam takisto v analýze zložených liečivých prípravkov, pri monitorovaní liečiv a ich metabolitov v telových tekutinách. Okrem toho nachádza využitie pri analýze látok z rastlinného materiálu a uplatňuje sa tiež v stabilitných štúdiách, kde podáva obraz o priebehu rozkladného procesu. ³

2. Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bolo nájsť vhodnú metódu pre analýzu ketoprofenu pomocou HPLC. Úlohou bolo určiť podmienky, pri ktorých by sa táto látka spolu so vnútorným štandardom eluovala v prijateľnom retenčnom čase. To spočívalo v optimalizácii zloženia mobilnej fázy, vo výbere vhodného vnútorného štandardu a v zostavení kalibračnej krivky nutnej pre kvantifikáciu metódy. Ďalšou úlohou bolo nájsť podmienky pre chirálnu separáciu ketoprofenu za zisku jeho dvoch enantiomérov. Nakoniec bolo potrebné vykonať extrakciu analyzovanej látky z ľudskej plazmy a zistené poznatky využiť k jej stanoveniu.

3. Teoretická časť

3.1 Definícia a rozdelenie chromatografických metód

Chromatografia je separačná metóda, pri ktorej sa separujú zložky obsiahnuté vo vzorke. Zakladá sa na rozdielnej afinite jednotlivých látok k dvom navzájom sa nemiešajúcim fázam, s ktorými sú v styku a ktoré sú relatívne proti sebe v neustálom pohybe. Jedna z fáz, ktorá je umiestnená v kolóne alebo v plošnej vrstve sa nazýva *stacionárna*, druhá, ktorá unáša separované látky lóžou stacionárnej fáze je *mobilná fáza*. Pri styku SF a MF s delenými látkami dochádza ku vzájomným interakciám, ktoré sú základným predpokladom pre ich separáciu.

Podmienkou rozdelenia látok pri vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii, rovnako ako pri všetkých chromatografických metódach je skutočnosť, že jednotlivé zlúčeniny sa vyskytujú v relatívne väčšom množstve v jednej z obidvoch fáz a majú tendenciu dospieť k rovnovážnemu rozdeleniu medzi obidve fázy. Tento proces je nepretržitý. Ak sú jednotlivé zlúčeniny viac rozpustné v mobilnej ako v stacionárnej fáze, putujú rýchlejšie, ak sú rozpustnejšie v stacionárnej fáze viac ako v mobilnej fáze, putujú pomalšie. Vlastné rozdelenie látok pri tomto postupe je jednak výsledkom rozdielnej rýchlosti ich putovania kolónou, jednak výsledkom rozdielu pri vzniku rovnovážneho stavu a jeho ustálenia. Ak roztok obsahujúci zmes látok prichádza do styku s ďalšou tekutinou, s ktorou je nemiešateľný, alebo s pevným povrchom, má každá jednotlivá zložka roztoku tendenciu rozdeliť sa medzi pôvodnú a novú fázu.⁴

Distribúciu zložiek medzi dve fázy možno vyjadriť *distribučnou (rozdeľovacou) konštantou* K_D , kde c_s je koncentrácia zložky v SF a c_m v MF.

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Čím vyššia je hodnota distribučnej konštanty pre danú látku, tým dlhšiu dobu zotrývajú jej molekuly v SF, a tým väčšia bude jej retencia, ktorá je hodnotená pomocou retenčných faktorov (k). Pre delenie jednotlivých látok je teda nutné, aby sa líšili svojimi distribučnými konštantami. ⁵

Rozdelenie chromatografických metód

Podľa podstaty separačného procesu:

- a) *Adsorpčná chromatografia* - založená na rozdielnej schopnosti delených látok pútať sa na povrch adsorbentov
- b) *Rozdeľovacia chromatografia* - založená na rozdielnej schopnosti látok rozdeliť sa medzi dve tekuté fázy (medzi SF a MF)
- c) *Chromatografia výmeny iónov* - založená na schopnosti látok vytvárať heteropolárne väzby so sorbentom, ktorý obsahuje ióny opačného náboja ako majú delené látky
- d) *Gélová chromatografia* - založená na rozdielnej veľkosti molekúl jednotlivých zmesí vzhľadom na póry náplne, ktorá je stacionárnou fázou
- e) *Afinitná chromatografia* - stacionárna fáza je schopná viazať zo vzorku práve určité zložky, ku ktorým má úzko selektívny vzťah (afinitu)

Podľa skupenstva mobilnej fázy:

- a) *Plynová chromatografia* - mobilná fáza je plyn
- b) *Kvapalinová chromatografia* - mobilná fáza je kvapalina

Podľa usporiadania stacionárnej fázy:

- a) *Kolónová (stĺpcová) chromatografia* - stacionárna fáza má tvar stĺpca
- b) *Plošné techniky* - stacionárna fáza je umiestnená na sklenenej doske, hliníkovej fólii či inom podklade (tenkovrstvová chromatografia TLC)

alebo je súčasťou chromatografického papiera (papierová chromatografia) ⁶

Podľa spôsobu zavedenia vzorky na kolónu:

- a) *Frontálna chromatografia* - vzorka sa nanáša na kolónu kontinuálne, je rozpustená v mobilnej fáze
- b) *Vytesňovacia chromatografia* - vzorka sa na kolónu nanáša diskontinuálne, používajú sa MF s väčšou schopnosťou sorbovať so SF, než ako majú zložky vzorky
- c) *Elučná chromatografia* - vzorka sa nanáša diskontinuálne, jej zložky sú na kolóne silnejšie sorbované ako molekuly MF

Izokratická elúcia prebieha za konštantného zloženia MF. Pri *gradientovej elúcii* sa mení elučná sila MF v priebehu separácie. ²

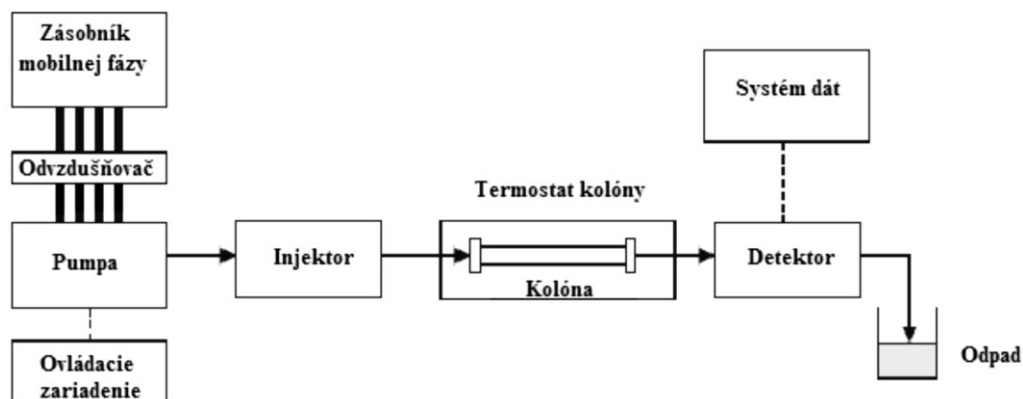
3.2 HPLC

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia je analytická separačná metóda, ktorá sa v súčasnosti veľmi uplatňuje v analýze liečiv. Umožňuje kvalitatívnu i kvantitatívnu analýzu separovaných zložiek, a to vo veľmi krátkom čase, s vysokou citlivosťou a selektivitou. Jej hlavnou prednosťou je široká možnosť využitia rôznych vzájomných interakcií MF so SF a s delenými látkami, čo umožňuje ovplyvňovať retenciu chromatografovaných látok a selektivitu ich delenia. Výhodná je taktiež malá spotreba vzorky, reprodukovateľnosť rozdelenia a možnosť automatizácie. Umožňuje separovať aj termolabilné kvapalné a tuhé látky a jej výhodou je presnosť pri kvantitatívnej analýze. Možnosti využitia sú väčšie ako pri iných chromatografických metódach, čo je dané okrem iného malými rozmermi častíc tvoriacich náplň kolóny, ako aj relatívne vyššou rýchlosťou MF, ktorá vyžaduje použiť vysoké vstupné tlaky. Hlavnou nevýhodou HPLC je predovšetkým vysoká obstarávacia cena zariadenia v porovnaní s niektorými inými analytickými zariadeniami. Kolóny pre HPLC sú taktiež veľmi nákladné, s relatívne nízkou životnosťou, vysoká je i cena roztokov používaných ako mobilná fáza pre HPLC analýzy.³

3.2.1 Prístrojové vybavenie HPLC

Kvapalinový chromatograf sa skladá z častí, ktoré majú nasledujúce funkcie:

- a) uchovávanie a transport mobilnej fáze (zásobníky mobilnej fáze, vysokotlakové čerpadlo, degaser)
- b) dávkovanie vzorky (autosampler, manuálny dávkovací ventil)
- c) separácia látok (chromatografická kolóna, termostat kolóny)
- d) detekcia látok (detektor)
- e) záznam dát pre následné vyhodnotenie (počítač a software)⁵



Obr.1 Schéma kvapalinového chromatografu

3.2.1.1 Zásobníky mobilnej fázy

Mobilná fáza je uchovávaná v zásobníku, ktorý je spravidla tvorený sklenenou nádobou spojenou pružnou trubicou s vysokotlakovým čerpadlom. Pružná trubica je v zásobníku ukončená fritou, ktorá bráni vstupu tuhých častíc do čerpadla. Zásobník musí byť dobre uzavretý, aby kvapalina a jej pary neunikali do okolitej atmosféry a nedochádzalo ku kontaminácii mobilnej fázy. Pri gradientovej elúcii je nutné použiť viacero zásobníkov, ku zmiešaniu jednotlivých kvapalín dochádza v zmiešavacom zariadení.

Pred samotným meraním je potrebné mobilnú fázu odvzdušniť, aby pri zmene tlaku v kolóne nedochádzalo k uvoľneniu bubliniek rozpusteného plynu, ktoré by mohlo narušiť funkciu čerpadla či detekciu analytu. V súčasnej dobe sú používané dva princípy odplynenia mobilnej fázy – prebublávanie s héliom alebo vakuový degaser. Degaser odstraňuje rozpustené plyny automaticky a to tak, že mobilná fáza je vedená cez poréznu trubicu v evakuovanom priestore.
6,7

3.2.1.2 Vysokotlakové čerpadlo

Vysokotlakové čerpadlá zabezpečujú konštantné a kontinuálne prúdenie mobilnej fázy zo zásobníkov na kolónu. Pracujú v širokom rozmedzí tlakov 1 až 100 MPa a dosahujú prietokov 0,1-10 ml/min. Konštrukčný materiál, z ktorého je čerpadlo zostavené, musí byť odolný voči korozívnym vlastnostiam dopravovaných kvapalín. Pokiaľ nie je zaistený stabilný prietok

mobilnej fáze, dochádza ku kolísaniu retenčných časov, nepresným výsledkom kvantitatívnej analýzy a zvyšovaniu šumu u niektorých detektorov.

Čerpadlá možno rozdeliť na bezpulzové a pulzové. *Pulzové čerpadlá* majú objem pracovnej komory pomerne malý a k dosiahnutiu potrebného prietoku dochádza mnohokrát opakovaným stlačením a vypudením mobilnej fázy z pracovnej komory čerpadla. *Bezpulzové čerpadlá* pracujú s ďaleko väčším objemom pracovnej komory, čo umožňuje vykonať radu analýz bez opätovného plnenia čerpadla. ^{2, 5}

3.2.1.3 Dávkovacie zariadenia

Dávkovače slúžia na opakovateľné dávkovanie vzorky do chromatografického systému bez prerušenia toku mobilnej fázy. Dávkovanie musí byť reprodukovateľné a presné, pretože pri nedokonalom dávkovaní môže dochádzať k významnému rozmývaniu pík. V súčasnosti sa ako dávkovacie zariadenia používajú manuálne slučkové dávkovače alebo, a to v ďaleko väčšej miere, automatické dávkovače rôznej konštrukcie – tzv. *autosamplery*. Pracujú na princípe prepínacích ventilov. Slučka so známym konštantným objemom sa najprv naplní vzorkou, potom sa otočením rotora prepojí s čerpadlom a mobilná fáza vytlačí jej obsah do chromatografickej kolóny. ^{5, 8}

Autosampler je spojený so zásobníkom vzoriek, v ktorom sú umiestnené vialky s roztokom vzorky. Ten je pomocou ihly, ktorá prepichne uzáver vialky, dávkovaný do prúdu mobilnej fázy. Analyt je následne unášaný na kolónu, na ktorej dochádza k separácii jednotlivých zložiek .

3.2.1.4 Chromatografická kolóna

Kolóna je základom celého chromatografického systému. Kolóny pre HPLC sú rovné trubice s hladkým vnútorným povrchom zhotovené z materiálov, ktoré by mali byť odolné voči vysokým pracovným tlakom (až 100 MPa), ako aj chemickým vplyvom mobilnej fázy a separovaných látok. Vhodnými materiálmi sú nehrdzavejúca oceľ a špeciálne tvrdené bórosilikátové sklo. Rozmery kolón závisia od aplikácie a od veľkosti častíc náplne. HPLC chromatografické kolóny pre analytické účely sú najčastejšie dlhé 10-25 cm

s vnútorným priemerom 3-5 mm a mobilná fáza nimi preteká spravidla rýchlosťou 1-2 ml/min. ⁵

Kolóny sú naplnené vhodnými sorbentmi. V HPLC sa najčastejšie používajú tzv. **chemicky viazané stacionárne fázy**. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagélových zrníek sú vhodnou chemickou reakciou naviazané rôzne radikály. Najčastejšie sa jedná o uhl'ovodíkové reťazce obsahujúce spravidla 8 alebo 18 uhlíkových atómov. Jedná sa o nepolárne chemicky viazané fázy (tzv. reverzné fázy). V prípade stredne polárnej fázy radikál obsahuje trojuhlíkový reťazec zakončený skupinami – NH₂, - CN a i. Menej často sa používajú polárne sorbenty ako silikagél či oxid hlinitý. Svoje využitie v HPLC nachádzajú aj sorbenty ako oxid zirkoničitý, oxid titaničitý či grafit. Najväčšou výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita, na rozdiel od silikagélu je stabilný v celom rozsahu pH, pri vysokom tlaku a tiež pri teplotách do 200 °C. Ďalším materiálom, ktorý môže tvoriť náplň kolóny, sú porézne polyméry, najčastejšie je to zosieťovaný polystyrén, menej často substituované methakryláty a polyvinyalkoholy. Pre potreby chromatografie výmeny iónov sa ako sorbenty používajú vhodné ionexy. ³

Aby sa zabránilo poškodeniu kolóny, sú hodne používané ochranné kolóny umiestnené medzi dávkovacím zariadením a kolónou, tzv. predkolóny. Spôsobujú len malé rozšírenie pásov a chránia kolónu pred nečistotami a nerozpustnými materiálmi. ⁶

3.2.1.5 *Detektor*

Detektor slúži k indikácii látok vychádzajúcich z chromatografickej kolóny. Zaznamenáva rozdiel v signále medzi priechodom čistej mobilnej fázy a mobilnej fázy obsahujúcej analyt. Detektory možno rozdeliť na koncentračné a hmotnostné. *Koncentračné detektory* reagujú na zmenu koncentrácie zložky nezávisle na rýchlosti mobilnej fázy, *hmotnostné detektory* zaznamenávajú zmenu hmotnostného toku zložky do detektoru. Iný spôsob delenia je na *detektory nedeštrukčné a deštrukčné*. V nedeštrukčných detektoroch nedochádza k chemickej zmene detegovaného komponentu, zatiaľ čo v deštrukčných detektoroch sa detegovaný komponent ireverzibilne mení. ⁵

Požiadavkou pre detektory v HPLC je dostatočne vysoká selektivita pre analyty a malá citlivosť voči mobilnej fáze. Prietoková cela musí byť dobre utesnená a taktiež musí odolávať tlaku mobilnej fázy. Medzi najpoužívanejšie detektory patrí fotometrický, fluorescenčný a hmotnostno-spektrometrický.⁶

Spektrofotometrické detektory sú založené na princípe absorpcie elektromagnetického žiarenia v oblasti vlnových dĺžok od 190 do 800 nm. K detekcii liečiv sa využíva predovšetkým UV oblasť spektra, menej viditeľná oblasť a minimálne infračervená oblasť spektra. Používajú sa detektory s fixnou vlnovou dĺžkou (najčastejšie 254 nm alebo 280 nm) alebo detektory, pri ktorých možno meniť vlnovú dĺžku podľa potreby. Diode array detektor sníma celé absorpčné spektrum a hodnotí liečivo pri niekoľko vlnových dĺžkach. Tento typ detektorov sa vyznačuje značnou citlivosťou (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a možno ich použiť pri gradientovej elúcii.

Fluorescenčné detektory nachádzajú využitie v prípadoch, keď analyzované liečivo vykazuje fluorescenciu. Látky, ktoré nefluoreskujú, možno previesť reakciou s vhodnými činidlami na fluoreskujúce deriváty. Tieto detektory sú menej univerzálne ako UV detektory, ale citlivejšie (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektívnejšie a sú taktiež použiteľné pri gradientovej elúcii.

Veľmi sofistikovaným detektorom, ktorý možno použiť v plynovej i kvapalinovej chromatografii je **hmotnostný spektrometer**, ktorý pracuje na nasledovnom princípe. Neutrálne molekuly liečiva v plynnom stave sú najprv ionizované nárazmi elektrónov, za využitia termoionizácie či elektroionizácie. Nabité častice sú v magnetickom alebo vo vysokofrekvenčnom poli rozdelené podľa hmotnosti a náboja a výsledkom je hmotnostné spektrum. Spojenie HPLC-MS je vysoko selektívne, vysoko citlivé a poskytuje radu údajov potrebných pre identifikáciu liečiv.

Refraktometrický detektor meria rozdielny index lomu medzi čistou mobilnou fázou a eluátom obsahujúcim analyt. Je prakticky univerzálny, ale pre jeho malú citlivosť, nutnosť termostatovania a nemožnosť použitia pri gradientovej elúcii sa využíva v analýze liečiv len ojedinele.

Elektrochemické detektory nachádzajú uplatnenie pri hodnotení liečiv, ktoré obsahujú zložky oxidovateľné či redukovateľné na elektróde. Tieto detektory sú značne citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale väčšinu z nich nemožno použiť pri gradientovej elúcii.³

3.2.2 Hodnotenie HPLC chromatogramu

Záznam z chromatografu sa nazýva chromatogram. Tento záznam udáva časovú závislosť intenzity veličiny, ktorá je sledovaná detektorom. Chromatografický záznam je charakterizovaný krivkami gausovského tvaru, ktoré možno nazvať elučné krivky či píky.

3.2.2.1 Kvalitatívna analýza

Kvalitatívna analýza slúži k identifikácii alebo dôkazu určitej látky vo vzorke. Základnou kvalitatívnou charakteristikou v HPLC je retenčný čas t_R . Jedná sa o relatívnu veličinu, ktorá závisí na zložení mobilnej fázy, prietokovej rýchlosti a type stacionárnej fázy, avšak pri identických chromatografických podmienkach je pre danú substanciu konštantná. Najčastejším dôkazom totožnosti je zhoda retenčných časov chromatografického píku liečiva v analyzovanej vzorke s retenčným časom píku štandardu.³

3.2.2.2 Kvantitatívna analýza

Pri stanovení množstva analytu vo vzorku je možné použiť viacero postupov kvantitatívnej analýzy. Všetky ale majú relatívny charakter, pretože neznáma koncentrácia sa stanovuje porovnaním získaných hodnôt so štandardom. Základom je vždy vzťah medzi nameranou plochou alebo výškou chromatografického píku a množstvom eluovanej látky. Sledovať výšku píku pripadá v úvahu len v prípade symetrických píkov a tejto možnosti sa využíva minimálne. Omnoho častejšie sa pre stanovenie používa plocha píku získaná integráciou pomocou chromatografického softwaru.⁵

Pri použití **metódy vonkajšieho štandardu** sa porovnáva odozva píku skúmaného roztoku s odpovedajúcou odozvou u porovnávacieho roztoku štandardu. Najprv sa nastriekne roztok analyzovaného vzorku, signál sa

zaznamená a až potom nasleduje nástrek vonkajšieho štandardu a jeho detekcia.

$$n_{VZ} = \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} \times n_{ST}$$

A_{VZ} je plocha píku u skúmaného roztoku, A_{ST} je plocha píku u porovnávacieho roztoku štandardu, n_{VZ} je množstvo látky vo vzorke skúmaného roztoku a n_{ST} je množstvo štandardu v porovnávacom roztoku.

Metóda vnútorného štandardu spočíva v prídavku rovnakého množstva vnútorného štandardu k skúmanému roztoku a k porovnávaciemu roztoku. Vnútorný štandard by mal napodobňovať správanie hodnoteného analytu vo vzorke, pretože sa často stáva, že počas prípravy vzorky analytu dochádza ku kvantitatívnym stratám. Vhodne zvolený vnútorný štandard môže tieto straty kompenzovať. Následne sa porovnáva pomer plôch stanovovanej látky a vnútorného štandardu u skúmaného roztoku a porovnávacieho roztoku.

$$c_{VZ} = \frac{A_{VZ} \times A_{IS}}{A_{ST} \times A_{IS}} \times c_{ST}$$

A_{VZ} je plocha pod píkom u skúmaného roztoku, A_{ST} je plocha pod píkom u porovnávacieho roztoku, A_{IS} je plocha píku vnútorného štandardu, c_{VZ} je koncentrácia vzorky analytu v skúmanom roztoku, c_{ST} je koncentrácia štandardu v porovnávacom roztoku.^{9, 10}

Vnútorný štandard by mal spĺňať nasledovné parametre:

- mal by byť štruktúrne podobný analytu,
- mal by sa eluovať v blízkosti analytu, jeho pík by nemal interferovať s píkmi analytu,
- nemal by byť prítomný v pôvodnej vzorke,
- mal by byť stabilný, nereaktívny vo vzťahu ku zložkám vzorky, výplni kolóny, alebo mobilnej fáze,
- jeho chemické správanie by malo byť podobné správaniu analytu,
- požaduje sa, aby bol dostupný v dostatočnej čistote.

Metóda normalizácie spočíva vo vypočítaní percentuálneho obsahu skúmanej látky z celkovej plochy všetkých pík, ktorá tvorí 100 %.

$$A1 + A2 + A3 = 100\%$$

$$A1 = x \%$$

Kalibračným postupom sa stanoví obsah skúmanej látky na základe kalibračnej závislosti koncentrácie a odozvy.

$$y = kx + q \Rightarrow x = \frac{y - q}{k}$$

pričom y je veľkosť odozvy, x je koncentrácia analytu, k reprezentuje sklon priamky a q je konštanta popisujúca podmienky merania. ¹¹

3.3 Základné chromatografické charakteristiky

3.3.1 Retenčné charakteristiky

Základnou charakteristickou veličinou pre každú delenú látku je retenčný čas t_R či retenčný objem V_R . **Retenčný čas** je doba, ktorá uplynie od nástreku vzorku do dosiahnutia maxima elučnej krivky (vrcholu píku). **Retenčný objem** je potom objem mobilnej fáze, ktorá pretečie kolónou za túto dobu.

Medzi týmito dvoma veličinami existuje vzťah :

$$V_R = F_m \cdot t_R$$

F_m udáva objemový prietok mobilnej fáze v ml/min, teda množstvo mobilnej fáze pretečené kolónou za jednotku času.

Obecným vyjadrením retencie látky je **retenčný faktor k**. Udáva relatívne zadržanie zložky na kolóne a môžeme ho vyjadriť ako:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Retenčný čas/objem inertnej látky, ktorá nie je na kolóne zadržovaná a pohybuje sa rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza je označovaný ako **mŕtvy retenčný čas t_0** , resp. **mŕtvy retenčný objem V_0** .

Doba, ktorú delené látky strávia v stacionárnej fáze, je redukovaný retenčný čas t'_R . Je vyjadrovaný ako rozdiel retenčného času danej látky a mŕtveho retenčného času.⁵

3.3.2 Účinnosť chromatografickej kolóny

Účinnosťou kolóny charakterizujeme jej schopnosť separovať zložky zmesi. Možno ju vyjadriť ako bezrozmernú veličinu – **počet teoretických priehradiek N**. Teoretická priehradka je pomyselná časť kolóny, v ktorej dochádza k ustanoveniu rovnováhy medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Táto veličina charakterizuje mieru rozširovania elučných zón a je teda

ukazovateľom kvality chromatografickej separácie. Čím vyšší je počet teoretických priehradiek, tým nastáva menšie rozmývanie elučnej zóny analytu, a tým je kolóna účinnejšia. Počet teoretických priehradiek závisí na mnohých faktoroch, ako napríklad retenčný faktor danej látky, dĺžka kolóny, rýchlosť prietoku mobilnej fáze, teplota a viskozita mobilnej fáze. Obecné ho možno vypočítať pomocou nasledujúceho vzťahu :

$$N = konst \left(\frac{V_R}{w} \right)^2$$

kde w je šírka píku v jeho príslušnej výške. Najčastejšie sa využíva hodnota v 50 % jeho výšky, označovaná ako w_h .

Aby sa dali jednotlivé kolóny rôznej dĺžky porovnávať, bol zavedený parameter **výškový ekvivalent teoretickej priehradky**, ktorý možno definovať ako dĺžku kolóny pripadajúcu na jednu priehradku.

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

Praktickou veličinou kvality chromatografickej separácie je tzv. **asymetria píku**. Existujú dve metódy vyjadrenia asymetrie píku, a to síce faktor chvostovania T_f a faktor asymetrie A . Ideálna symetria píku je získaná, ak je hodnota faktoru asymetrie A rovná jednej. Ak je hodnota A väčšia ako jedna, dochádza k chvostovaniu píku, pri hodnote menšej než jedna dochádza k frontovaniu píku.^{5,6}

3.3.3 Rozlíšenie

Rozlíšenie je bezrozmerná veličina, ktorá kvantifikuje schopnosť chromatografického systému vzájomne oddeliť dva analyty. Pre dostatočnú separáciu látok by mala mať hodnotu $R_{1,2} > 1,5$, pri ktorej dochádza k 0,1 % prekrytiu dvoch separujúcich sa pík. Vyjadruje sa ako rozdiel retenčných časov separovaných látok t_{R1} , t_{R2} delený hodnotou šírky pík v ich polovičnej výške w_{h1} , w_{h2} .⁵

$$R_s = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

3.3.4 Pomer signálu k šumu

Šum v priebehu analýzy značí kolísanie odozvy detektoru, čím výrazne limituje citlivosť detektoru a znižuje presnosť stanovenia. Táto nepravidelnosť je spôsobená zmenou elektrického signálu, nestabilitou lampy detektoru, vlastnosťou detekčnej cely, teplotnými fluktuáciami a mnohými ďalšími faktormi. Ku spoľahlivému kvalitatívnemu hodnoteniu musí byť výška píku minimálne trikrát vyššia než výška šumu a pre kvantitatívne hodnotenie obsahu musí mať pík výšku aspoň desaťkrát väčšiu ako je výška šumu.

Pomer signálu k šumu možno vypočítať podľa vzťahu :

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

kde **H** predstavuje výšku píku, ktorý odpovedá zložke na chromatograme predpísaného porovnávacieho roztoku a **h** znamená rozpätie šumu pozadia počas slepej skúšky.⁵

3.3.5 Opakovateľnosť

Opakovateľnosť odozvy sa vyjadruje ako odhad relatívnej smerodajnej odchýlky RSD% pre radu následných meraní porovnávacieho roztoku. Pre rôzny počet meraní v rámci opakovateľnosti je povolená maximálna smerodajná odchýlka.

Vypočíta sa podľa vzorca :

$$RSD\% = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum (y_i - y)^2}{n - 1}}$$

kde **y_i** značí jednotlivé hodnoty vyjadrené ako plocha píku, výška píku či pomer plôch, **y** predstavuje priemer jednotlivých hodnôt, **n** je počet jednotlivých hodnôt.¹²

3.3.6 Selektivita

Selektivita (tiež označovaná ako relatívna retencia či retenčný pomer) sa značí symbolom $\alpha_{1,2}$ a vyjadruje, nakoľko sú od seba vzdialené ťažiská píkov dvoch látok. Čím je táto hodnota vyššia, tým je systém selektívnejší.

Je daná vzťahom:

$$\alpha_{1,2} = \frac{k_2}{k_1}$$

kde k_1 , k_2 sú retenčné faktory látok 1 a 2.

3.4 Súčasné trendy v kvapalinovej chromatografii

V poslednom období je výskum v oblasti kvapalinovej chromatografie zameraný na vyvinutie nových technológií, ktoré by mali urýchliť proces separácie. Cieľom je získať čo najrýchlejšiu chromatografickú separáciu, pri ktorej by zostali zachované či dokonca zlepšené vlastnosti, čo sa týka účinnosti, rozlíšenia, ale aj citlivosti daného merania. Nástrojom pre získanie týchto vlastností bolo zmenšenie častíc sorbentu až na veľkosť menšiu než 2 μm , čo však prinieslo so sebou podstatné zvýšenie spätného tlaku v systéme. Následne bola vyvinutá UHPLC, separačná metóda, ktorej prístrojové vybavenie umožňuje pracovať aj pri veľmi vysokých tlakoch. Súčasne dochádzalo k rozvoju technológií, ktoré urýchľujú proces separácie iným spôsobom, a to buď pomocou zvýšenej teploty alebo s využitím stacionárnych fáz, u ktorých je dosahované veľmi vysokých prietokov mobilnej fázy. Tieto nové technológie sa nazývajú Fast LC alebo smery rýchlej chromatografie. Inými modernými smermi v oblasti kvapalinovej chromatografie sú dvojdimenziálna kvapalinová chromatografia 2D-LC a miniaturizované techniky (kapilárne a nano-LC). Umožňujú získať veľmi vysokých separačných účinností a ich využitie spočíva v separáciách veľmi komplexných zmesí.⁵

3.4.1 UHPLC

Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia využíva pre zvýšenie účinnosti chromatografického systému častice menšie než 2 μm . Optimálna separačná účinnosť je dosahovaná pri vyšších prietokových rýchlostiach. Táto účinnosť je zachovaná v širšom rozsahu lineárnych prietokových rýchlostí, a to vďaka nízkemu odporu proti prevode hmoty. Preto môžu byť častice menšie ako 2 μm používané pre dosiahnutie lepšej účinnosti, rozlíšenia píkov či skrátenia doby analýzy. Vďaka účinnosti týchto častíc možno výrazne skrátiť dĺžku kolónu, a tým možno použiť menší objem rozpúšťadiel.

UHPLC, na rozdiel od HPLC, ktorá pracuje pri tlakoch 30 - 40 MPa, využíva tlaky okolo 100 MPa. UHPLC systém musí okrem schopnosti pracovať za ultra-vysokých tlakov splňovať ďalšie požiadavky ako robustné čerpadlo

a dávkovací systém, rýchle dávkovacie cykly či presné dávkovanie veľmi malých objemov. Taktiež musí mať čo najmenšie meškanie gradientu a minimálne mimokolónové príspevky. Dôležitý je aj výber vhodnej stacionárnej fázy, ktorá by mala byť mechanicky stabilná pri vysokých tlakoch. Najčastejšie sa ako základný materiál používa silikagél alebo hybridný materiál. Nevýhodou oproti HPLC je však vyššia obstarávacia cena kolóny a prístroja, ktorý by vyvinul dostatočne vysoký tlak.⁵

3.4.2 Povrchovo porézne častice

Ďalším spôsobom ako zvýšiť rýchlosť a účinnosť chromatografickej separácie je použitie kolón naplnených povrchovo poréznymi časticami. Tieto častice sú tvorené neporéznym jadrom a vrstvou porézneho silikagélu. Vďaka pevnému jadru častice sa znižuje odpor proti prevodu hmoty a je možno používať vyššie prietoky mobilnej fázy bez straty chromatografickej účinnosti. Dôležité faktory, ktoré zodpovedajú za vyššiu účinnosť týchto častíc, sú relatívne malý priemer častíc, prítomnosť poréznej slupky, a tiež ďaleko pravidelnejšia distribúcia a hustota naplnenia kolóny v porovnaní s celkovo poréznymi časticami silikagélu. Hlavnou výhodou je teda vysoká účinnosť a rýchlosť chromatografickej analýzy bez nárastu spätného tlaku v systéme, ako je tomu u UHPLC. Naopak nevýhodou je fakt, že všetky zatiaľ dostupné stacionárne fázy s využitím týchto častíc sú na báze silikagélu. To prináša so sebou obmedzenia čo sa týka chemickej a teplotnej stability.⁵

3.4.3 Monolitické kolóny

Na rozdiel od konvenčných stacionárnych fáz, monolitické kolóny tvorí jediný kus pórovitého materiálu, ktorý zaplňuje celé vnútro separačnej kolóny. Monolitické kolóny majú dva typy pórov : veľké póry, ktoré zrýchľujú prenos hmoty medzi stacionárnou a mobilnou fázou a stredne veľké póry s dostatočne veľkým povrchom, vďaka čomu poskytujú vysokú separačnú kapacitu. Táto štruktúra umožňuje použitie monolitov pri značne vysokých rýchlostiach mobilných fáz bez výrazného zvýšenia tlaku a zároveň bez straty separačnej účinnosti, a to i pre separované makromolekuly.

Výhodou monolitov je ich jednoduchá príprava, široké možnosti modifikácie povrchu častíc, vyššia permeabilita ako aj výrazné skrátenie doby analýzy. Výhodná je tiež možnosť aplikácie prietokových gradientov či spojenie niekoľko kolón pre získanie účinnosti v rádoch až stotísíc teoretických priehradiek. Naopak nevýhodou je obmedzené množstvo komerčne dostupných stacionárnych fáz, inkompatibilita s detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie či vysoká spotreba rozpúšťadiel. Komerčne dostupné monolitické kolóny sú väčšinou založené na báze silikagélu, čo značne limituje oblasť ich využitia. ⁵

3.5 Chirálna chromatografia

Chirálna chromatografia nachádza využitie v analýze opticky aktívnych liečiv, kde je snaha o rozlíšenie jednotlivých optických izomérov, ktoré vykazujú rozdielne účinky na ľudský organizmus. Jednotlivé stereoizoméry sa môžu líšiť nielen farmakodynamickými, farmakokinetickými vlastnosťami, ale aj výskytom vedľajších účinkov. Preto sa dnes k liečebným účelom stále častejšie využíva len samotný eutomér, izomér, ktorý má vyššiu požadovanú aktivitu. Druhá zložka, distomer, ktorá je buď neúčinná, s vedľajšími účinkami alebo toxická, sa vylučuje.

Väčšina používaných chirálnych liečiv sa nachádza vo forme racemátu, teda ako zmes dvoch enantiomérov v rovnakom pomere. Separovať enantioméry za bežných chromatografických podmienok nie je možné, pretože v achirálnom prostredí majú rovnaké fyzikálne a chemické vlastnosti. Pre ich delenie sa využíva interakcia s tzv. chirálnym selektorom. Princípom je vznik dvoch diastereoizomérov, ktoré už majú iné chemické vlastnosti a možno ich teda od seba oddeliť ako dve odlišné látky.

3.5.1 Mechanizmy chirálnej separácie

Chirálna separácia prebieha na základe interakcie analytu so stacionárnou fázou, ktorá je chirálna. Dochádza k tvorbe dočasného diastereoméneho komplexu, na ktorom sa podieľajú rôzne typy molekulárnych interakcií. Medzi nich patrí tvorba vodíkových väzieb, komplexov, pôsobenie π - π interakcií, sférických efektov a dipólových interakcií. K rozlíšeniu dvoch enantiomérov je nutné, aby medzi analytom a chirálnym selektorom došlo ku kontaktu pomocou minimálne troch rôznych väzieb, pričom minimálne jedna z nich musí byť stereochemicky definovaná. Tento model býva označovaný ako *model trojbodovej interakcie*.⁵

3.5.2 Nepriame metódy chirálnej separácie

Princípom nepriamych metód analýzy chirálnych látok je transformácia enantiomerného páru na stabilné diastereoizoméry derivatizáciou s chirálnym selektorom ešte pred začiatkom separácie. Tieto izoméry môžu byť následne separované pomocou konvenčnej chromatografie ako na normálnych, tak i na reverzných fázach. Jedná sa o nepriamu techniku delenia, separácia prebieha v achirálnom prostredí. Výhodou tohto postupu je dobrá selektivita diastereoizomérov, možnosť zníženia detekčného limitu analyzovaných látok ako aj jednoduchá zámena elučného poradia enantiomérov. Nevýhody spočívajú v nutnosti validácie derivatizačného kroku (výťažok reakcie, tvorba vedľajších produktov, možnosť racemizácie), v nárokoch na čistotu derivatizačného činidla, v časovej a prístrojovej náročnosti metódy.¹³

3.5.3 Priame metódy chirálnej separácie

Priame metódy analýzy enantiomérov sú založené na ich priamej separácii v chirálnom prostredí. Jednotlivé izoméry sú delené na základe tvorby tzv. tranzitného diastereoizoméru, ktorý vzniká medzi chirálnym selektorom a enantiomérom počas separácie. Chirálny selektor môže byť pridaný do mobilnej fázy či naviazaný na stacionárnej fáze.

Omnoho častejšie sa používa kombinácia nechirálnych mobilnej fázy a chirálnej stacionárnej fázy, kde je chirálny selektor naviazaný na inertnom nosiči, najčastejšie na silikagéli. V prípade pridania chirálneho selektora do mobilnej fázy vzniká diastereoizomerný komplex, ktorý možno separovať na konvenčnej chromatografickej kolóne. Tento spôsob však nie je veľmi rozšírený z dôvodu nižšej selektivity a účinnosti chromatografického systému. Chirálna aditíva sú taktiež príliš drahé, často komerčne nedostupné a v mobilnej fáze môže dochádzať k ich rozkladu.

Výhodu priamej separácie predstavuje jednoduchosť a rýchlosť metódy, nevyžaduje sa derivatizácia, ale na druhej strane môže dochádzať k racemizácii počas separácie a chirálne kolóny sú podstatne finančne náročnejšie.⁵

3.5.4 Chirálné selektory

Chirálné selektory možno rozdeliť podľa ich pôvodu na prírodné, polosyntetické a syntetické. Medzi prírodné selektory radíme cyklodextríny, makrocyklické antibiotiká, proteíny a polysacharidy, medzi polosyntetické selektory sú radené derivatizované cyklodextríny, deriváty polysacharidov a modifikované makrocyklické antibiotiká. Do poslednej skupiny patria napríklad chirálne polyétery a methakrylátové polyméry. Prírodné chirálne selektory vykazujú nízku selektivitu, preto sú viac používané selektory polosyntetické a syntetické.⁵

3.5.4.1 Makrocyklické antibiotiká

Zo skupiny makrocyklických antibiotík sú ako chirálne stacionárne fázy používané vankomycin, teikoplanin a ristocetin A. Tieto molekuly obsahujú veľký počet chirálnych centier a ponúkajú i množstvo interakcií ako iónové, H-väzby, π - π , dipólové a hydrofóbne interakcie. Preto u nich existuje veľká pravdepodobnosť tvorby diastereomérnych komplexov s analytom, a teda i vysoká pravdepodobnosť chirálnej separácie. Všetky tri antibiotiká sa skladajú z aglykónovej „misky“ tvorenej makrocyklickým kruhom a peptidickým reťazcom, na ktorý sú éterovou väzbou pripojené rôzne počty cukrových jednotiek. Tieto CSP sú veľmi selektívne vo všetkých separačných módoch. Ich selektivitu ovplyvňuje hlavne zloženie mobilnej fázy, pH, organický modifikátor a teplota. Z dôvodu hydrolýzy nosiča a selektoru musí byť pH mobilnej fázy v rozmedzí 3,5-7. V polárne organickom móde sa ako mobilná fáza používa bezvodý metanol alebo acetonitril s prídavkom kyseliny, bázy či pufru. K výhodám týchto CSP patrí možnosť dosiahnuť lepšiu selektivitu výmenou kolóny bez zmeny mobilnej fázy, ako aj možnosť zapojenia dvoch či troch glykopeptidových fáz do série, čo má význam pre screening vhodnej CSP pre veľké série vzoriek.

3.5.4.2 Polysacharidy a ich deriváty

Ďalšími stacionárnymi fázami používanými v chirálnej chromatografii sú polysacharidy, predovšetkým amyulóza a celulóza. Jedná sa o opticky aktívne prírodné polysacharidy, ktoré možno použiť pre analýzu enantiomérov práve vďaka ich asymetrickej štruktúre. Celulóza je polymér, ktorý je tvorený D-(+) glukózovými jednotkami spojenými β -1,4-glykozidickou väzbou. Amylóza je tvorená D-(+) glukózovými jednotkami, ktoré sú medzi sebou spojené α -1,4-glykozidickou väzbou. Pre nízku selektivitu a problémy s manipuláciou sa však ako CSP nepoužívajú samotné polysacharidy, ale uplatnenie nachádzajú ich deriváty.

Tieto chemické deriváty polysacharidov sú dnes jedny z najpoužívanejších chirálnych stacionárnych fáz. Na trhu sú komerčne dostupné napríklad kolóny Chiralpak® (deriváty amyulózy) alebo Chiralcel® (deriváty celulózy). Derivatizácia prebieha na voľných hydroxylových skupinách pomocou rôznych chirálnych selektorov, ktorými sú napríklad fenyلكarbamáty, organické estery, nitráty či étery. Okrem chirálneho selektoru je podstatná tiež voľba polysacharidu, pričom celulóza so svojim usporiadaním do skrutkovice má odlišnú separačnú schopnosť než lineárna celulóza.

Polysacharidy môžu byť na nosič chirálnej stacionárnej fázy naviazané dvoma spôsobmi. Prvým spôsobom je pokrytie nosiča, najčastejšie silikagélu, daným chirálnym selektorom – tzv. coating. Táto stacionárna fáza je však málo stabilná, polysacharid je náchylný k rozpusteniu a výber vhodnej mobilnej fázy je značne obmedzený. Väčšinou je teda využívaný druhý variant, kde je chirálny selektor kovalentne viazaný (imobilizovaný) na hydroxylové skupiny sacharidu. Tieto CSP sú stabilnejšie, avšak ich selektivita môže byť obecné nižšia kvôli zhoršenej stereošpecifickej konfigurácii.^{5, 14}

3.5.4.3 *Cyklodextríny*

Cyklodextríny sú cyklické oligosacharidy vznikajúce enzymatickou hydrolýzou škrobu za prítomnosti niektorých mikroorganizmov. Medzi tie najznámejšie patrí α -, β - a γ - cyklodextrín, ktoré sa líšia počtom glukózových jednotiek. α -CD obsahuje šesť jednotiek, β -CD sedem a γ -CD obsahuje osem glukózových jednotiek, ktoré sú medzi sebou viazané α -1,4-glykozidickou väzbou. Štruktúra cyklodextrínov pripomína tvar zrezaného kužeľa. Vonkajší okraj kavity obsahuje sekundárne hydroxylové skupiny, vo vnútornom okraji sa nachádzajú primárne hydroxylové skupiny, čo má za následok to, že vnútro kavity vykazuje lipofilné vlastnosti, zatiaľ čo vonkajšia časť kavity má hydrofilný charakter.

Enancioselektivita cyklodextrínov je daná asymetrickými uhlíkmi glukózy a hydroxylovými skupinami primárnych a sekundárnych alkoholov na vstupných prstencoch kavity. Afinita cyklodextrínovej kavity k analytu vzrastá s jeho narastajúcou hydrofóbitou. Chirálny analyt môže byť do kavity inkludovaný úplne, alebo čiastočne, pričom vznikajúci komplex je stabilizovaný van der Waalsovými silami, disperznými či vodíkovými väzbami. Derivatizáciou hydroxylových skupín dochádza k zmene molekulárnej štruktúry, čo sa následne odráža napr. v zmene veľkosti kavity, novej ponuke stereoselektívnych centier umožňujúcich ďalšie interakcie, alebo v ich solvatacii či stabilite. U β -CD sa navyše často zvýši ich rozpustnosť vo vodnom prostredí. Priaznivým dôsledkom chemickej modifikácie, najmä u β -CD je významné zvýšenie selektivity separácie enantiomérov. Nabité deriváty CD ďalej rozširujú možnosti použitia týchto CSP pre separáciu analytov, ktoré sami nenesú vlastný náboj.

Chirálna separácia na cyklodextrínoch prebieha vo všetkých separačných módoch. V reverznom móde sú využívané častejšie nederivatizované cyklodextríny, zatiaľ čo normálny mód pracuje predovšetkým s derivátmi CD. Najviac uplatňovaný je β -cyklodextrín, ktorý umožňuje separáciu najširšieho spektra molekúl. α -CD našiel použitie pri separácii malých molekúl, γ -CD sa používa pre separáciu molekúl s tromi a viac aromatickými kruhmi.^{5, 14}

3.5.4.4 *Glykoproteíny*

Glykoproteíny sú vysokomolekulárne komplexy proteínov skladajúce sa z reťazcov L-aminokyselín, ktoré obsahujú kovalentne viazané sacharidové jednotky. Ako CSP sa z tejto skupiny používajú napríklad hovädzí sérový albumín (BSA), kyslý α 1-glykoproteín (AGP), ovomukoid (OVM) a enzýmy ako pepsín, trypsín či chymotrypsíny.

Tieto stacionárne fázy majú veľmi nízku kapacitu maximálne 0,1 mg/ml a tlakový limit kolóny maximálne 4 MPa. Pracujú v rozmedzí pH 4 do 7. Medzi používané organické modifikátory patria napríklad alkoholy metanol, etanol či propanol, používa sa aj acetonitril. Avšak príliš veľký nárast koncentrácie organického rozpúšťadla výrazne znižuje retenciu analytu. Dôležitým faktorom separácie je náboj stacionárnej fáze. Pre dosiahnutie potrebnej selektivity by mali mať CSP a analyt opačné náboje. Kolóny založené na glykoproteínoch disponujú menšou kapacitou a vzorka nesmie byť v príliš vysokej koncentrácii, pretože so zvyšujúcou koncentráciou rapídne klesá účinnosť systému. Separácia prebieha spravidla za laboratórnej teploty, pretože pri teplote vyššej ako 40 °C by mohlo dôjsť k racemizácii analytov či dokonca k denaturácii stacionárnej fáze.⁵

3.5.4.5 *Crown étery*

Crown étery patria medzi syntetické CSP a chemicky sú to makrocyclické polyétery, ktorých základnou štruktúrnou jednotkou je ethylenoxidový mostík. Počet týchto mostíkov určuje veľkosť kavity, podobne ako u cyklodextrínov. Princípom chirálneho rozpoznavania je viacnásobná väzba medzi éterovými kyslíkmi, ktoré slúžia ako donory elektrónov a kationovou skupinou analytu. Pevné komplexy vznikajú predovšetkým s kationmi kovov a substituovanými amónnymi iónmi. Ako mobilné fázy sa používajú roztoky kyselín ako kyselina chloristá o pH 1-2, kyselina dusičná, trifluóroctová alebo sírová. Pri nižšom pH sa zvyšuje selektivita, ale dochádza zároveň ku skráteniu životnosti kolóny. Mobilnú fázu možno modifikovať metanolom, ale pri množstve metanolu nad 15 % dochádza k vymývaniu chirálneho selektora z kolóny. Na selektivitu má

vplyv aj teplota, pri ktorej prebieha daná chirálna analýza. U primárnych aminozlúčenín sa selektivita i retencia analytov znížením teploty zvyšuje.

Začlenením chirálnej molekuly do štruktúry crown éterov sa z nich stávajú chirálne crown étery. Príkladom je (3,3-difenyl-1,1'-binaftyl)-20-crown-6-éter používaný pre separáciu α -aminokyselín a primárnych amínov. V praxi sa často používa aj (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetrakarboxylová kyselina, pomocou ktorej možno separovať aminozlúčeniny ako aj sekundárne amíny.⁵

3.5.4.6 *Mechanizmus ligandovej výmeny*

Princípom ligandovej výmeny je vznik diastereomérických kovových komplexov. Tieto koordinačné komplexy pozostávajú minimálne z dvoch ligandov (chirálny selektor a separovaný enantiomér) a z centrálného iónu. Tým býva kation prechodného kovu (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), pričom najstabilnejšie komplexy vznikajú s Cu^{2+} iónmi. Jednotlivé koordinačné komplexy majú rôzne konštanty stability, separácia prebieha u tých komplexov, ktorých konštanty sú od seba dostatočne rozdielne. Enantioméry musia obsahovať minimálne dve funkčné skupiny, ktoré môžu centrálnemu kovu poskytnúť elektrónový pár.

Komerčne dostupné CSP obsahujú chirálne selektory L-hydroxyprolín, L-prolín, *N,N*-decyl-L-histidín alebo D-penicilamín. Ako mobilná fáza sa používa tlmivý roztok s malým prídavkom centrálného iónu. Pre zvýšenie účinnosti sa ako nosič používa silikagél, pričom na selektivitu má veľký vplyv to, akým spôsobom je naviazaný chirálny ligand na silikagél. Čím dlhším alkylovým reťazcom je ligand naviazaný, tým sa prehlbuje hydrofóbny charakter CSP a takisto aj enantioselektivita.^{5, 14}

3.6 Úprava biologických vzoriek

Biologické vzorky ako krv, plazma alebo sérum sú veľmi komplexné a nemôžu byť preto vo väčšine prípadov priamo dávkované do chromatografického systému. Samotnej analýze tak musí predchádzať úprava vzoriek, pri ktorej sú z nich odstránené endogénne látky, čím sa zvýši citlivosť analýzy. Izolácia liečiva z biologického materiálu je limitovaná mnohými faktormi, ako napríklad koncentrácia liečiva, počet a štruktúra stanovovaných látok, druh materiálu a stabilita látky v danom materiáli. Medzi základné techniky úpravy biologických vzoriek patria deproteinácia, extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (LLE) a extrakcia pevnou fázou (SPE). Výber vhodnej techniky izolácie závisí predovšetkým na fyzikálne-chemických vlastnostiach analytu a možnostiach daného laboratória. ¹

3.6.1 Priame dávkovanie biologickej vzorky na kolónu

Bez predchádzajúcej úpravy je možné vzorku dávkovať priamo na kolónu len v ojedinelých prípadoch. Koncentrácia stanovovanej látky musí byť avšak relatívne vysoká, pretože je nastrekovaný len malý objem biologického materiálu. Ďalšou podmienkou pre vzorku je fluorescencia alebo absorpcia v ultrafialovej oblasti. Problémom je rýchle znehodnocovanie kolóny neeluovateľnými komponentami, ktoré sa prejavuje zvýšením tlaku a zmenou separačných vlastností. Z tohto dôvodu je vhodné použiť predkolónu, ktorá tento problém eliminuje. Tento spôsob analýzy sa najčastejšie používa pre stanovenie liečiv, ktoré sa vo vysokej koncentrácii vylučujú v moči.

Metóda prepínania kolón (column switching) spočíva v možnosti kvantitatívneho stanovenia vzorky priamo na kolónach HPLC chromatografu. Je to ďalší spôsob, ako ochrániť analytickú kolónu a súčasne priamo nastreknúť biologickú vzorku do chromatografického systému.

3.6.2 Deproteinácia

Deproteinácia predstavuje najjednoduchšiu metódu úpravy biologického materiálu. Používajú sa vhodné deproteinačné činidlá, ktoré odstránia bielkoviny zo vzorky a tým zabránia vyzrážaniu proteínov na kolóne. Ďalším spôsobom je denaturácia pomocou enzýmov či ultrafiltrácia na membránach. Odstránenie proteínov zo vzorky musí byť kompletne vrátane tých s malou molekulovou hmotnosťou. Dôležitý je tiež výber deproteinačného činidla, ktoré nesmie pôsobiť na sledované liečivo, ovplyvňovať ďalšie pracovné postupy, interferovať pri detekcii ani inak ovplyvňovať analytickú výťažnosť. Pri voľbe vhodnej deproteinačnej techniky sa musí brať do úvahy chemické zloženie analyzovanej látky, jej stabilita, väzba na proteíny, filtračné membrány a výťažnosť látky po deproteinácii.

3.6.2.1 *Precipitačná deproteinácia*

Ako deproteinačné činidlá sa používajú organické rozpúšťadlá (metanol, etanol, acetón, acetonitril), kyseliny (trifluoroctová, trichloroctová, chloristá, mravčia), soli ťažkých kovov (síran zinočnatý, hydroxid lítny, chlorid hlinitý...) alebo ich kombinácie. Po centrifugácii je časť čirej tekutiny nad koagulátom, tzv. *supernatant*, buď priamo nastreknutý na kolónu alebo je odparený do sucha a následne rozpustený v malom množstve mobilnej fázy. Pred vlastným zrážaním je vhodné vzorku zriediť, čím sa získa jemnejší precipitát a zníži sa možnosť adsorpcie na vzniknutý koagulát.

3.6.2.2 *Enzymová deproteinácia (proteolýza)*

Ďalšou metódou odstránenia proteínov z biologickej vzorky je deproteinácia, ktorá prebieha s využitím proteolytických enzýmov. K proteolýze sa používajú enzýmy ako trypsín, papaín či ketodáza. Táto metóda je veľmi výhodná pre základný toxikologický screening, kde je vzhľadom k širokej palete zlúčenín a časovej tiesni ťažké upresniť deproteinačné a extrakčné podmienky.

3.6.2.3 Ultrafiltrácia

Ultrafiltrácia využíva pre zachytenie proteínov zo vzorky semipermeabilné membrány. Tie sú pripravené tak, aby zadržali minimálne množstvo filtrátu a pri opakovanom použití nevykazovali kontamináciu. Musia byť odolné voči kyselinám, zásadám, alkoholom a možnosti použitia pri zvýšenej teplote. Taktiež by mali byť schopné zachytiť až 99 % sérových bielkovín. Výhodou ultrafiltrácie je, že na rozdiel od vyššie spomínaných typov deproteinácie tu nedochádza ku zmene koncentrácie vzorky jej zriedením. Táto metóda je vhodná pre stanovenie látok, ktoré nie sú viazané na proteíny i pre stanovenie voľného podielu z celkového množstva liečiva, pričom zvyšný podiel je viazaný na bielkoviny krvnej plazmy.^{1,15}

3.6.3 Extrakcia kvapalina – kvapalina (LLE)

V úprave biologických vzoriek zaujímajú extrakčné metódy veľmi významné miesto a to vďaka tomu, že sú nenáročné na potrebné vybavenie, sú rýchle a možno ich použiť k separácii väčšieho ako aj stopového množstva liečiv.

Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina je rovnovážna technika založená na delení látok medzi dve vzájomne nemiešateľné kvapaliny podľa ich rozdeľovacích konštánt, ktoré definuje Nernstov zákon,

$$K_D = \frac{c_0}{c_{aq}}$$

kde K_D predstavuje distribučnú konštantu, c_0 je celková koncentrácia liečiva v organickej fáze, c_{aq} je zasa celková koncentrácia vo vodnej fáze.

Nernstov rozdeľovací zákon platí pre ideálne roztoky, kde extrahovaná látka nereaguje so žiadnou zložkou v oboch fázach a je obsiahnutá v roztoku v nízkej koncentrácii. Pri výbere rozpúšťadiel je nutné prihliadať na rozpustnosť extrahovaných látok v oboch fázach a takisto na rozdiel ich rozdeľovacích konštánt. Ideálne je, keď je tento rozdiel čo najväčší. Pri hodnote K_D vyššej ako jedna prechádza látka spontánne z pôvodného roztoku do rozpúšťadla. Extrakcia je teda zjednodušená, pretože na prevedenie látky

bez zvyšku do rozpúšťadla stačí jednoduché pretrepanie obidvoch fáz. V prípade, že je jej hodnota menšia než jedna, musí byť vykonaná pre rozdelenie danej látky viacstupňová extrakcia.

Dôležitým faktorom extrakcie je správna voľba extrakčného rozpúšťadla, ktoré by malo spĺňať nasledujúce požiadavky. Požadovaná je jeho nemiešateľnosť s vodnou fázou, dostatočná selektivita, kapacita a extrakčná účinnosť, vhodné povrchové napätie, ďalej teplotná, chemická stabilita ako aj nízka cena a toxicita. Výťažnosť extrakcie možno ovplyvniť zmenou pH vzorky. Do organických rozpúšťadiel prechádza analyt v nedisociovej forme, preto zvýšením pH (napríklad pridaním určitého množstva báze) sa zvýši extrakčná účinnosť zásaditých látok a naopak u kyslých liečiv sa extrakcia zlepši znížením pH roztoku (napríklad pridaním kyseliny). Ďalším spôsobom ako zvýšiť extrahovateľnosť látky je vhodne zvolený pomer vodnej a organickej fázy. Pri väčšom množstve organického rozpúšťadla možno dosiahnuť vyšších výťažkov a nižšej náchylnosti k tvorbe emulzií, nežiadúca je však nižšia koncentrácia extrahovanej látky.^{1, 15}

3.6.4 Extrakcia pevnou fázou (SPE)

SPE využíva krátke extrakčné kolóny vo tvare injekčných striekačiek naplnené sorbentom, ktoré fungujú na podobnom princípe ako HPLC. Analyt sa adsorbuje na pevnú fázou (sorbent) z kvapalnej fázy, v ktorej je rozpustený. Intermolekulárne interakcie medzi pevnou fázou a analytom musia byť silnejšie ako interakcie s kvapalnou fázou. Najčastejšie interakčné mechanizmy v SPE sú van der Waalsove sily, vodíkové mostíky, väzby dipól-dipól a väzby kation-anión. Sorbentom často býva reverzná stacionárna fáza, ako je C₁₈-silikagél alebo materiál na báze polyméru. Na rozdiel od HPLC sú však jeho častice väčšie (okolo 40 μm) a nepracuje sa za vysokých tlakov. Sorbenty musia spĺňať požiadavky ako napríklad nerozpustnosť v elučnom systéme, inertnosť voči analyzovaným látkam a veľká sorpčná kapacita.¹⁶

Samotná extrakcia pevnou fázou prebieha v niekoľkých krokoch. Prvým krokom je kondicionácia, kde je kolóna najskôr premytá polárnym organickým rozpúšťadlom (metanol, acetonitril) k aktivácii funkčných skupín sorbentu

a následne vodným roztokom k vymytiu nadbytku tohto rozpúšťadla. Druhou fázou je nanosenie roztoku vzorky, ktorý postupuje sorbentom. Analyty sú pritom zachytené na stacionárnej fáze, zatiaľ čo ostatné zložky matrice prechádzajú bez zadržania. V treťom kroku sú zvyšné balastné látky vymývané vhodným rozpúšťadlom. Posledným krokom je elúcia, pri ktorej sa systém premyje malým množstvom roztoku, vďaka ktorému dôjde k rozrušeniu väzby analytu na sorbent.

Extrakcia biologických vzoriek na pevných extrakčných kolónach je jednoduchá, rýchla metóda, vykazuje dobrú výťažnosť a reprodukovateľnosť. Jej výhodou oproti LLE je znížená spotreba organických rozpúšťadiel, ktoré sú škodlivé pre ľudské zdravie i pre životné prostredie. Pri tejto metóde dochádza ku skoncentrovaniu vzorky, čím sa zvýši jej analytická citlivosť. Výhodná je aj možnosť automatizácie extrakcie a extrahovania viac vzoriek naraz. Preto je tento spôsob extrakcie považovaný za jeden z najvhodnejších pre izoláciu liečiv a ich metabolitov z biologických tekutín.^{17, 18}

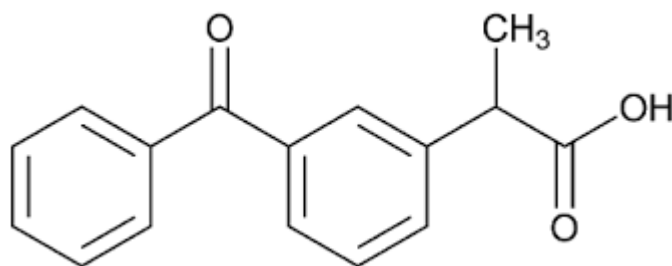
3.6.5 Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME)

Mikroextrakcia na tuhej fáze SPME („solid phase microextraction“) je nová extrakčná technika, ktorú vyvinul v roku 1989 Pawliszyn s kolektívom. Technika je kombináciou extrakcie a predkoncentrácie v jednom kroku. Počas extrakcie sú analyty zo vzoriek nasorbované priamo na vlákno z kremeňa potiahnutého vrstvou chemicky viazanej stacionárnej fáze. Nedochoádza pritom k úplnej extrakcii, ale k ustáleniu rozdeľovacej rovnováhy analytu medzi vodnou maticou vzorky a stacionárnou fázou vlákna. Počet molekúl, ktoré prejdú do stacionárnej fázy je priamo úmerný rozdeľovaciemu koeficientu, objemu stacionárnej fázy a koncentrácii analytu vo vodnej fáze. Po expozícii sa vlákno vloží do vyhriateho injektora plynového chromatografu (GC) alebo GC v spojení s hmotnostným spektrometrom (GC/MS), kde sú analyty tepelne desorbované a následne nesené prúdom mobilnej fázy na GC kolónu. Pri analýze pomocou HPLC sa analyt eluuje vhodným rozpúšťadlom či priamo mobilnou fázou, vzniknutý roztok je nastrekovaný do HPLC systému.

Výhody tejto techniky sú rýchlosť, citlivosť, eliminácia použitia rozpúšťadiel, možnosť použitia pre rýchlu orientačnú analýzu, možnosť automatizácie. SPME eliminuje nevýhody väčšinou používaných extrakčných techník, a býva často spojovaná s kvapalinovou ako aj plynovou chromatografiou.

Na SPME sa používajú komerčne dostupné zariadenia vo tvare striekačiek, ktoré pozostávajú z dlhšieho kremenného vlákna a stojanu. Vlákno je potiahnuté vrstvou polymérnej stacionárnej fázy rôzneho typu a rôznej hrúbky polymérnej vrstvy. Z polymérov sa používa polydimetylsiloxan (PDMS) pre nepolárne analyty, polyakrylát (PA) zasa pre polárne analyty. Pri správnom používaní je možné jedno zariadenie na SPME použiť na 50 až 100 extrakcií.¹⁹

3.7 Charakteristika analyzovanej látky



Obr. 2 Štruktúrny vzorec ketoprofenu

Liekopisný názov : Ketoprofenum

Chemický názov : kyselina (2RS)-2-(3-benzoylfenyl)propanová ¹²

Sumárny vzorec : C₆H₁₄O₃

ATC skupina : M: Muskuloskeletálny systém

M01 Antiflogistiká a antireumatiká

M01A Nesteroidové antiflogistiká a antireumatiká

M01AE Deriváty kyseliny propiónovej

M01AE03 Ketopofén ²⁰

Vlastnosti: Biely alebo takmer biely kryštalický prášok. Je prakticky nerozpustný vo vode, ľahko rozpustný v acetóne, v 96% etanole i v dichlórmetáne. Ketopofén je slabá kyselina, ktorej pKa dosahuje hodnôt 4,45. ¹²

Mechanizmus účinku: Účinok NSAID je založený na inhibícii cyklooxygenáz katalyzujúcich premenu kyseliny arachidonovej na eikosanoidy, prostaglandíny a tromboxany. Ketopofén sa viaže na cyklooxygenázu-1 i na cyklooxygenázu-2 a tým dochádza k potlačeniu tvorby prostaglandínov a potlačeniu protizápalovej odpovedi organizmu. Inhibíciou COX-1 v krvných doštičkách znižuje tiež syntézu tromboxanu A₂, vďaka čomu má aj reverzibilný antiagregačný účinok. ²¹

Indikácie: Vďaka jeho schopnosti prenikať do synoviálnej tekutiny v kĺboch sa využíva pre symptomatickú terapiu akútnej a chronickej reumatoidnej artritídy, osteoartrózy či ankylozujúcej spondylitídy. Ako analgetikum sa nasadzuje na zmiernenie bolesti pri primárnej dysmenorei, pri pooperačných stavoch ako aj na zmiernenie bolesti po pôrode. ²¹

Farmakologické vlastnosti: Biologická dostupnosť po perorálnom podaní ketoprofenu je 90% a s dávkou sa lineárne zvyšuje. Ľahko sa absorbuje z gastrointestinálneho traktu a maximálna plazmatická koncentrácia sa dosiahne za 1 hodinu a 22 minút. Ak sa ketopropfen podáva s jedlom, jeho absorpcia je pomalšia a plazmatická koncentrácia mierne klesá, ale jeho biologická dostupnosť sa nemení. Penetruje do všetkých tkanív vrátane synoviálnej tekutiny, kde je jeho účinky pretrvávajú i po poklese plazmatickej hladiny. Ketopropfen sa masívne metabolizuje v pečeni prostredníctvom hepatálnych mikrozomálnych enzýmov. Viazá sa na kyselinu glukurónovú a z tela sa eliminuje vo forme glukuronidu. Kvôli rýchlemu metabolizmu je biologický polčas len dve hodiny. Až 80 % ketoprofenu sa vylučuje močom a približne 10 % sa vylučuje stolicou. U pacientov s renálnou insuficienciou sa ketopropfen vylučuje pomalšie a jeho biologický polčas je predĺžený o hodinu. U pacientov s hepatálnou insuficienciou sa môže akumulovať v tkanivách. Jeho metabolizmus a eliminácia sú u starších pacientov pomalšie, čo však má klinický význam iba u pacientov so zníženou renálnou funkciou. ²²

Nežiaduce účinky a toxicita: Nežiaduce účinky sú zvyčajne mierne a postihujú hlavne gastrointestinálny systém. Medzi najčastejšie patria poruchy trávenia ako hnačka, vracanie, zápcha či flatulencia. V ojedinelých prípadoch sa môžu vyskytnúť aj bolesti hlavy, závraty, ospalosť, tiež kožné problémy ako opuch, svrbenie a vyrážka. Dôležitým nežiaducim účinkom, u iných NSAID nezvyčajným, je možný vznik fotosenzitívnych reakcií pri vystavení kože slnečnému žiareniu. Pri predávkovaní ketoprofenom sa objavia príznaky ako vracanie, bolesť brucha či ospalosť. ²¹

Dostupné formy: V Českej republike sú registrované liečivé prípravky s obsahom topického ketoprofenu : Fastum gel, Keplat (liečivá náplast'), Ketonal 5% krém a Prontoflex 10% (kožný sprej). V niektorých krajinách sa

používa i enantiomérne čistý (S)-(+)-ketoprofén pod názvom dexketoprofén, ktorý je účinnejší než racemický ketoprofén.

3.7.1 Ketoprofén a dexketoprofén

Ako aj u iných derivátov kyseliny propiónovej je ketoprofén racemickou zmesou dvoch optických enantiomérov. Za jeho farmakologický účinok je zodpovedný S-(+)-enantiomér, pričom u R-(-)-enantioméru účinok takmer chýba. Klinické štúdie ukázali, že ani ten nie je celkom bez analgetického účinku, pretože 10 až 13 % je v organizme premenené na účinnejší S-(+)-izomér. V iných štúdiách bola taktiež overovaná účinnosť dexketoprofenu v terapii muskuloskeletálnej, pooperačnej, nádorovej bolesti, bolesti hlavy ako aj dysmenorey. U R-(-)-enantioméru bol pozorovaný omnoho nižší analgetický účinok, ktorý sa prejavil len v prípade jeho metabolickej konverzie na S-(+)-enantiomér. Dexketoprofén je asi 30x silnejší inhibítor COX-1 a asi 100x silnejší inhibítor COX-2 ako racemický ketoprofén.

Hlavnou indikáciou dexketoprofenu je tíšenie akútnych krátkodobých bolestí miernej až strednej intenzity. Pre použitie u akútnych bolestí ma výhodnú farmakokinetiku. Prejavuje sa rýchlym nástupom účinku porovnateľným s intramuskulárnou aplikáciou a jedným z najkratších časov k dosiahnutiu maximálnej plazmatickej koncentrácie (0,25-0,75 hod). Chemická forma trometamínovej soli ešte zvyšuje rozpustnosť a urýchľuje nástup účinku. Tiež dosahuje vyššiu plazmatickú hladinu ako racemát, v dôsledku čoho analgetikum ľahšie preniká do miesta svojho pôsobenia.²³

3.7.2 Práce zaoberajúce sa HPLC analýzou ketoprofenu

V nasledujúcej časti sú chronologicky uvedené práce, ktoré sa zaoberajú HPLC analýzou ketoprofenu. Pozornosť je venovaná predovšetkým použitým stacionárnym a mobilným fázam a spôsobu detekcie látok.

2001

F. Péhourcq, C. Jarry a B. Bannwarth predstavili vo svojej práci novú HPLC metódu pre chirálnu separáciu ketoprofenu a flurbiprofenu s využitím kolón na báze glykopeptidových stacionárnych fáz. Pre analýzu bola použitá kolóna Chirobiotic V, ktorá využíva ako CSP vankomycin naviazaný na silikagéli. Prietoková rýchlosť bola nastavená na 1 ml/min, látky boli detegované pri 275 nm. Pre optimalizáciu separácie bolo vyskúšané viacero mobilných fáz v rôznych pomeroch, koncentráciách či s rôznymi pH hodnotami vodnej zložky. Optimálneho rozlíšenia a selektivity bolo dosiahnuté pri použití fázy zloženej z 100 mM amóniumnitrátového pufru (pH 5,0) a tetrahydrofuranu (80 : 20, v/v). Doba analýzy za týchto podmienok bola necelých 12 min.²⁴

2005

V roku 2005 publikovali Zhansheng Guo, Hai Wang, Yunsheng Zhang prácu, v ktorej predstavili HPLC metódu pre chirálnu separáciu ketoprofenu. Pre analýzu bola použitá achirálna kolóna Hypersil BDS C8 a mobilná fáza pozostávajúca z acetonitrilu a triethylaminacetátového pufru o pH 5,2 (35:65, v/v) s prídavkom 2,0 mM norvankomycínu ako chirálneho selektora. Analýza prebiehala pri teplote 25°C pri prietoku 1 ml/min. K detekcii bola zvolená vlnová dĺžka 290 nm, kde ketoprofen vykazuje silnú absorbanciu. Doba separácie pri týchto podmienkach bola necelých 15 min, pričom rozlíšenie enantiomérov dosahovalo hodnôt až 1,9. Ďalšia časť práce porovnáva schopnosť enancioseparácie u norvankomycínu a vankomycínu. Bolo zistené, že na dosiahnutie optimálnej enancioseparácie je potrebná menšia koncentrácia norvankomycínu ako pri použití vankomycínu.²⁵

B. Kafková, Z. Bosáková, E. Tesařová, P. Coufal používali ako chirálny selektor teikoplanin v kapilárnej kvapalinovej chromatografii a skúmali okrem beta-adrenergických antagonistov a herbicídov odvodených od kyseliny chlorofenoxypropiónovej tiež profénové nesteroidové antiflogistiká. Zásobné roztoky boli pripravené v koncentrácii 0,2 mg/ml v metanole. Analýzy boli vykonané za použitia kapilárnej kolóny vyplnenej silikagélom 25 x 300 µm, 5 µm Nucleosil 100 C₁₈ HD, prietok bol pre nich nastavený na 5 µl/min. Ďalej

bola použitá kolóna s teikoplaninom viazaným na silikagéli 22,5 cm x 320 μ m Chirobiotic T, pre ktorú sa pracovalo za prietoku 4 μ l/min. Pre profénové nesteroidové antiflogistiká bola zvolená vlnová dĺžka 230-270 nm. Analýza ketoprofenu bola uskutočnená za nasledujúcich podmienok: CSP založená na teikoplaninu, mobilná fáza zložená z metanolu a 1% vodného roztoku TEAA (pH 6,6) v pomere 20:80 (v/v), pričom rozlíšenie enantiomérov dosahovalo hodnoty 1,66.²⁶

2009

Allegrini, Nuzzo, Zucchelli, Scaringi a kol. sa snažili nájsť rýchlu a precíznu metódu pre stanovenie ketoprofenu z ľudskej plazmy, použiteľnú pre štúdie systematickej biodostupnosti. Pre extrakciu z plazmy bola zvolená SPE s použitím 2 ml metanolu ako elučného činidla. K následnej HPLC analýze bola použitá monolitická C₁₈ kolóna a mobilná fáza so zložením: acetonitril/0,01M fosfátový pufer (pH 3,5) v pomere 40:60. Prietoková rýchlosť bola zvolená 5 ml/min, nastrekovaný objem 90 μ l, detekcia pomocou DAD detektoru pri 254 nm. Doba analýzy za týchto podmienok bola kratšia ako 5 minút. Nasledovala validácia metódy, ako vnútorný štandard bol zvolený flurbiprofén. Linearita metódy bola stanovená v rozmedzí 1-500 ng/ml, retenčné časy dosiahli u ketoprofenu 0,9 min, u flurbiprofenu 1,9 min.²⁷

2010

Jincui Ye, Wenying Yu, Guosheng Chen, Zhengrong Shen a Su Zeng sa vo svojej práci zaoberali chirálnou separáciou nesteroidových antiflogistik štruktúrne odvodených od 2-arylpropiónovej kyseliny za použitia mobilnej fázy s prídavkom hydroxypropyl- β -cyklodextrínu (HP- β -CD). Analýzy boli zamerané pomocou prístroja Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), pre ketoprofén bola zvolená vlnová dĺžka 258 nm. Bol pripravený zásobný roztok v koncentrácii 500 μ g/ml v metanole a uchovávaný pri teplote 4°C, pred meraním bol nechán pri izbovej teplote. Separácia ketoprofenu bola uskutočnená na kolóne Shimpak CLC-ODS (150 \times 4,6 mm, 5 μ m), s využitím mobilnej fázy zloženej z metanolu a fosfátového pufru v pomere 10 : 90 s prídavkom 25 mM HP- β -cyklodextrínu. pH mobilnej fázy bolo upravené na 4,6, prietok bol nastavený na 1 ml/min a objem nástreku

činil 20 µl. Dosiahnutý retenčný čas enantiomérov bol v intervale 21,9–24,3 minút a píky boli separované s rozlíšením 1,4.²⁸

2013

J. Zhou¹, X. Zheng, Q. Liu, Z. Zhang sa snažili nájsť vo svojom výskume podmienky pre chirálnu separáciu ketoprofenu v kvapalinovej chromatografii na normálnej fáze. Separácie boli vykonané izokratickou elúciou pri izbovej teplote, rýchlosť prietoku bola od 0,2-1,2 ml/min. Analyzovaná látka bola rozpustená v etanole v koncentrácii 200 µg/ml a nastrekovaný objem bol 10 µl, detekcia bola vykonaná pri 268 nm. Pri separáciách bol pozorovaný vplyv zloženia mobilnej fázy, prietoku a teploty na rozlíšenie. Ako optimálne boli stanovené tieto podmienky : mobilná fáza n-hexán - 2-propanol (90/10, v/v; 0,1% TFA), CSP- Chiralpak IC, prietok 0,8 ml/min, teplota 25°C.²⁹

2014

R. Sardella, A. Carotti, P. Blasi a B. Natalini pri svojom výskume skúmali monolitickú kolónu s chemicky viazaným 2,6-diisopropylfenylkarbamátom chinínu slúžiacim ako iónovo-výmenný selektor. Pre ketoprofén použili tieto podmienky: mobilná fáza zložená z vody (s prídavkom 60 mM amóniumacetátu) a acetonitrilu v pomere 60:40 o pH 5,5; prietok 1 ml/min, teplota 25°C, detekcia pri 254 nm, pričom rozlíšenie enantiomérov činilo 1,6.³⁰

Sally A. Helmy a Heba M. El-Bedaiwy predstavili so svojej práci HPLC metódu pre analýzu niekoľkých NSAID z ľudskej plazmy. Jedným z analyzovaných liečiv bol aj ketoprofén. Snažili sa o vyvinutie jednoduchšej univerzálnej metódy, ktorá mala byť následne využitá pre farmakinetické štúdie či monitorovanie liečiv. Preto bola ako metóda extrakcie liečiv zvolená deproteinácia s využitím acetonitrilu ako extrakčného činidla. HPLC analýza prebiehala izokratickou elúciou za prietoku 1 ml/min za izbovej teploty. Ako SF bola použitá kolóna Hypersil BDS C₁₈, mobilná fáza bola zložená z 20 mM amóniumfosfátového pufru (pH 3) a acetonitrilu (35:65, v/v), UV detekcia pri 265 nm. Metóda bola následne podľa FDA požiadaviek validovaná, ako vnútorný štandard bol vybraný betametason dipropionát.³¹

2015

A. Hussain, M.F. Al-Ajmi, S.Amir, I. Ali sa vo svojej práci zaoberali extrakciou profénov z krvnej plazmy a ich následnou HPLC analýzou. Jedným zo skúmaných profénov bol aj ketoprofén. Ako metóda extrakcie týchto liečiv bola zvolená SPMME (solid-phase membrane microtip extraction). K analýze profénov bola použitá C₁₈ kolóna, mobilná fáza pozostávala z vody a acetonitrilu v pomere 55:45 o pH 3,0 s prídavkom kyseliny trifluóroctovej. Prietoková rýchlosť bola nastavená na 0,5 ml/min, látky boli detegované pri 225 nm. Doba analýzy u všetkých profénov bola maximálne 7 min. Pri ketoprofáne bola dosiahnutá selektivita 1,99 a hodnota rozlíšenia činila 1,5. Ďalej bol skúmaný vplyv chromatografických podmienok na rozlíšenie. ³²

K. Kalíková, R. Geryk, J. Vozka a E. Tesařová publikovali prácu porovnávajúcu separačnú účinnosť amylozových kolón Chiralpak AD-RH a Chiralpak IA v reverznom móde HPLC. Hlavný rozdiel medzi týmito kolónami spočíva v spôsobe nanosenia chirálneho selektoru na silikagél. Zatiaľ čo Chiralpak AD-RH je potiahnutá amylozou, ktorá je na silikagél len fyzikálne ukotvená, na imobilizovanú kolónu Chiralpak IA je amyloza naviazaná kovalentne. Pre porovnanie týchto kolón bolo vybraných 37 analytov, medzi nimi sa nachádzal aj ketoprofén. Väčší enancioseparačný potenciál u ketoprofenu ako aj u iných profénov vykazovala kolóna Chiralpak AD-RH. Ako mobilná fáza bola použitá zmes kyseliny mravčej (pH 2,1) a acetonitrilu v pomere 60 : 40, takisto v pomere 70:30. Rozlíšenia sa od seba príliš nelíšili, ale za väčšieho obsahu vodnej zložky došlo ku zvýšeniu retencie enantiomérov. ³³

2016

I. Matarashvili, D. Ghughunishvili, L. Chankvetadze, N. Takaishvili, T. Khatiashvili, M. Tsintsadze, T. Farkas a B. Chankvetadze sa vo svojom výskume zaoberali separáciou enantiomérov slabých kyselín na kolónach založených na polysacharidoch. Pracovali na prístroji Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Nemecko). Separácie prebiehali pri teplote 20 °C za prietoku 1 ml/min, UV detekcia bola vykonaná pri 240 nm. Mobilná fáza

vždy obsahovala 0,1% roztok kyseliny mravčej, a ďalej MeOH či ACN s rôznym percentuálnym obsahom vody a ďalšia mobilná fáza obsahovala i prídavok hexánu. Ako CSP boli použité Lux-Amylose-1, Lux Amylose-2, Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2, Lux Cellulose-3 a Lux Cellulose-4 (Phenomex Inc. USA), kolóna bola pripravená kovalentným naviazaním celulózy tris(3,5-dichlorfenylkarbamátu) na silikagél (Enantiosep GmbH, Nemecko), všetky mali rozmery 250 × 4.6 mm; 5 µm. Do štúdie bol zaradený i ketoprofén.³⁴

2017

D. Camacho-Muñoz a B. Kasprzyk-Hordern vypracovali metódu pre chirálnu analýzu viacerých liečivých látok obsiahnutých vo vzorkách odpadovej vody (NSAID vrátane ketoprofénu, anthelmintiká, antibiotiká...) pomocou LC-MS/MS za využitia reverzného módu. Ich cieľom bolo vyvinúť metódu, pomocou ktorej by mohlo byť súčasne analyzované čo najväčšie množstvo látok. Najskôr boli liečivá extrahované z odpadovej vody pomocou SPE za využitia kolón Visiprep SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich) a Oasis HLBMAX, ako elučné činidlo bol použitý samotný metanol či metanol s 2% kyselinou mravčou. Následne boli vzorky odparené do sucha a rozpustené v 0,5 ml mobilnej fázy. Pre následnú HPLC analýzu bola vybratá kolóna na báze teikoplaninu ako CSP, za prietoku 0,8 ml/min. Ako vhodné mobilné fázy boli skúšané zmesi amónium acetátu s primárnymi alkoholmi či acetonitrilom v rôznych pomeroch, pH či koncentráciách organickej zložky. Najlepšie hodnoty rozlíšenia a selektivity boli dosiahnuté pri použití fázy so zložením 10 mM amóniumacetát (pH 4,2): metanol (70:30, v/v). Za vyššie uvedených podmienok a tejto fázy bolo separované 9 zo 16 analyzovaných liečiv. Retenčné časy u ketoprofénu dosiahli u S-(+)-izoméru 27,2 min a u R-(-)-izoméru 29,2 min. Následne bola porovnaná enancioseparačná schopnosť kolón s naviazaným teikoplaninom ako CSP a s naviazaným CSP- α 1-kyselým glykoproteínom.³⁵

4. Experimentálna časť

Prvou úlohou v experimentálnej časti bolo nájsť vhodné podmienky pre HPLC stanovenie ketoprofenu. Dôležitým faktorom bol výber vhodnej chromatografickej kolóny, pre ktorú boli skúmané podmienky pre optimálnu separáciu analyzovaného liečiva. Ďalším cieľom bolo nájdenie podmienok pre izoláciu jeho enantiomérov na chirálnych stacionárnych fázach v reverznom či normálnom móde. Treťou a zároveň poslednou úlohou bolo nájsť vhodný spôsob extrakcie ketoprofenu z plazmy a uskutočniť jeho následnú analýzu pomocou HPLC.

4.1 Použité prístroje, chemikálie, pomôcky

4.1.1 Prístroje

- Kvapalinový chromatograf Prominence, Shimadzu, Japonsko
 - Degaser DGU-20A3
 - Čerpadlo LC-20AD
 - Autosampler SIL-20AC
 - Kolónový priestor CBM-20A
 - DAD detektor SPD-M20A
 - Riadiaca jednotka CTO-20AC
 - Software: LC Solution Version 1.22 SP1
- Analytické váhy, Kern ALS 220-4N, Nemecko
- Acidimeter 333 Druopta, Praha, Česká republika
- Ultrazvukový kúpeľ K10, Kraitex, Slovenská republika
- Centrifúga CL31R Multispeed, Trigon-plus®, Říčany u Prahy, Česká republika
- Trepačka Kavalier, Sklářny Kavalier a.s., sídlo Sázava, závod Votice, Česká republika

4.1.2 Chromatografické kolóny

- LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck
- Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm, (10 µm), Daicel Chemical industries

4.1.3 Chemikálie

- Metanol CHROMASOLV®, ≥ 99,9%, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Acetonitril CHROMASOLV®, ≥ 99,9%, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- 2-Propanol, SCHARLAU, Nemecko
- n-heptán, 99%, SCHARLAU, Nemecko
- n-hexán, ≥ 97,0%, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Voda čistená reverznou osmózou
- Kyselina mravčia, 84-87%, LACHEMA n.p. Brno, Česká republika
- Kyselina chloristá, LACHEMA n.p. Brno, Česká republika
- Kyselina fosforečná, LACHEMA n.p. Brno, Česká republika
- KH₂PO₄, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika
- KPF₆, ≥ 99,9%, ALDRICH CHEMISTRY, Nemecko
- NaClO₄, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Hydroxid sodný, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika
- Dietyléter, Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika
- Dichlórmetán, MERCK, Nemecko

4.1.4 Štandardy

- Ketoprofén, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Benetazón, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Metylparabén, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Propylparabén, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Butylparabén, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Fenacetin, SIGMA-ALDRICH, Nemecko

- Chloramfenikol, Galenická laboratoř Ostrava, Česká republika
- Diklofenak, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Molsidomin, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Acetanilid, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Omeprazol, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Indometacin, min. 99% TLC, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Piroxikam, SIGMA-ALDRICH, Nemecko
- Kyselina niflumová, SIGMA-ALDRICH, Nemecko

4.1.5 Pomôcky

Z laboratórneho skla boli použité k experimentálnej časti odmerné banky, odmerné valce o rôznych objemoch, pipety o objeme 1-10 ml, mikropipety o objeme 100-1000 μ l, sklenené nádoby na mobilné fázy o objeme 500 ml. Okrem iného boli tiež použité kadičky, lieviky a pre meranie v kvapalinovom chromatografe vialky. Taktiež boli potrebné pomôcky ako lyžička, kopistka, pipetovací balónik a miešadlo.

4.2 Chromatografické podmienky pre HPLC analýzu ketoprofenu

Príprava zásobného roztoku ketoprofenu o koncentrácii 0,1 mg/ml

Na analytických váhach bolo navážené 5 mg ketoprofenu a následne doplnené metanolom po rysku 50ml odmernej banky.

Príprava pufru pre mobilnú fázu

Vodný roztok KH_2PO_4 o koncentrácii 0,01M bol pripravený navážením 1,361g čistej substancie, jej rozpustením v čistenej vode pre HPLC a doplnením do objemu 1000 ml v odmernej banke. Následne bol roztok filtrovaný cez nylónový filter 0,45 μm . Pripravený roztok bol okyslený zriedenou kyselinou H_3PO_4 na hodnotu pH 3,4, aby bola potlačená ionizácia ketoprofenu vo vodnom roztoku. Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním pufru a organickej zložky v uvedenom pomere.

4.2.1 Výber mobilnej fázy

- MeOH : čistená voda pre HPLC, pomer 50:50 (v/v)
- MeOH : čistená voda okyslená prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,5; pomer 50:50 (v/v)
- MeOH : čistená voda okyslená prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,5; pomer 70:30 (v/v)
- MeOH : čistená voda okyslená prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,5; pomer 60:40 (v/v)
- MeOH : čistená voda okyslená prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,5; pomer 55:45 (v/v)
- MeOH : roztok KH_2PO_4 0,01M okyslený prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,4; pomer 50:50 (v/v)
- MeOH : roztok KH_2PO_4 0,01M okyslený prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,4 ; pomer 60:40 (v/v)
- ACN : roztok KH_2PO_4 0,01M okyslený prídavkom zriedenej H_3PO_4 na pH 3,4; pomer 60:40 (v/v)

Jednotlivé analýzy boli uskutočnené na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) pri teplote 25°C, pri prietoku 1 ml/min. Nastrekovaný objem vzorky bol 10 µl.

4.2.2 Výber vnútorného štandardu

Pri výbere vnútorného štandardu bolo testované niekoľko zlúčenín. Bolo vždy navážené približne 2,5 mg substancie, ktorá bola následne rozpustená v 50 ml metanolu. Výsledné koncentrácie pripravených vzoriek sa pohybovali v rozmedzí 34-70 µg/ml. Použitou mobilnou fázou bol roztok MeOH a KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40, nastrekovaný objem bol 10 µl a teplota kolóny bola nastavená na 25°C. Použitá bola kolóna LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm), rýchlosť prietoku 1 ml/min. Skúšané boli nasledovné zlúčeniny :

- Metylparabén
- Propylparabén
- Butylparabén
- Piroxikam
- Kyselina niflumová
- Fenacetin
- Acetanilid
- Molsidomin
- Chloramfenikol
- Diklofenak
- Omeprazol
- Benetazon
- Indometacin

4.2.3 Overenie linearity

5 mg ketoprofenu bolo rozpustené v 50 ml metanolu, čím vznikol zásobný roztok ketoprofenu o koncentrácii 100 µg/ml.

10 mg benetazonu bolo rozpustené v 50 ml metanolu, čím vznikol zásobný roztok benetazonu o koncentrácii 200 µg/ml.

Zo zásobného metanolického roztoku ketoprofenu (100 µg/ml) bolo pipetované 1ml; 1,5ml; 2,5ml; 3,5ml a 5 ml roztoku a prevedené do piatich odmerných baniek o objemu 10 ml. Do každej odmernej banky bolo potom pridané 2,5 ml zásobného roztoku benetazonu (200 µg/ml) a objem bol doplnený metanolom na výsledný objem 10 ml. Vznikla tak rada piatich roztokov s koncentraciami 10; 15; 25; 35 a 50 µg/ml ketoprofenu a s konštantnou koncentraciou benetazónu 50 µg/ml.

Tieto roztoky bolo následne analyzované na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použitia mobilnej fázy metanol: vodný roztok KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min.

4.2.4 Vypracovanie podmienok pre separáciu enantiomérov

Príprava zásobných roztokov

Pre analýzu v reverznom móde bol použitý zásobný roztok ketoprofenu o koncentrácii 0,1 mg/ml. Ten bol pripravený rozpustením 5 mg čistej substancie v 50 ml metanolu.

Zo zásobného roztoku ketoprofenu o koncentrácii 0,1 mg/ml bol odobraný 1 ml roztoku a následne zriedený metanolom na objem 10 ml. Tak vznikol zásobný roztok ketoprofenu o koncentrácii 0,01 mg/ml, ktorý slúžil pre separáciu v normálnom móde.

Príprava pufrov pre mobilné fázy

Vodný roztok NaClO₄ o koncentrácii 1 mol/l bol pripravený navážením 140g NaClO₄, jeho rozpustením v čistenej vode pre HPLC a doplnením na objem 1000 ml. Následne bol roztok filtrovaný cez nylónový filter. Aby sa predišlo ionizácii ketoprofenu v roztoku, bol tento pripravený roztok okyslený koncentrovanou kyselinou HClO₄ na hodnotu pH 3,03.

Vodný roztok KPF₆ o koncentrácii 0,1M bol pripravený navážením 9,2 g substancie, jej rozpustením v čistenej vode pre HPLC a doplnením na objem 500 ml. Potom bol roztok filtrovaný a okyslený zriedenou kyselinou H₃PO₄ na hodnotu pH 4,06.

4.2.4.1 Výber mobilnej fázy

Reverzný mód

- MeOH : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 50:50 (v/v)
- MeOH : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 65:35 (v/v)
- MeOH : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 60:40 (v/v)
- MeOH : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 70:30 (v/v)
- MeOH : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 75:25 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 50:50 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 35:65 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 45:55 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 1M (pH 3,03); pomer 40:60 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 0,5M (pH 3,03); pomer 45:55 (v/v)
- ACN : roztok NaClO₄ 1M (pH 5,01); pomer 40:60 (v/v)
- MeOH : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 50:50 (v/v)
- MeOH : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 65:35 (v/v)
- MeOH : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 60:40 (v/v)
- MeOH : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 70:30 (v/v)
- ACN : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 50:50 (v/v)
- ACN : roztok KPF₆ 0,1M (pH 4,06); pomer 40:60 (v/v)

Analýzy prebiehali pri prietoku 0,5 ml/min.

Normálny mód

- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 98:2:0,6ml (v/v); prietok 0,5 ml/min
- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 98:2:0,6ml (v/v); prietok 1 ml/min
- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 98:2:0,6ml (v/v); prietok 0,7 ml/min
- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 97:3:0,6ml (v/v); prietok 0,7 ml/min
- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 99:1:0,6ml (v/v); prietok 0,7 ml/min
- *n*-heptán : IPA: HCOOH; pomer 99:1:0,6ml (v/v); prietok 1 ml/min

Jednotlivé analýzy boli uskutočnené na kolóne Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm (10 μm) pri teplote 25°C, pri uvedených prietokoch. Nastrekovaný objem vzorky bol 10 μl.

4.2.5 Analýza v biologickom materiáli

Príprava zásobných roztokov

Zásobný roztok ketoprofenu o koncentrácii 1 mg/ml bol pripravený rozpustením 10 mg tejto substancie v 10 ml metanolu. Podobne bol pripravený i zásobný roztok benetazonu o koncentrácii 1 mg/ml.

Deproteinácia

Do dvoch plastových skúmaviek bolo pipetované po 0,5 ml rozmrazenej plazmy. Prvá skúmavka slúžila ako porovnávací roztok s čistou plazmou, 0,5 ml H_3PO_4 a 2,0 ml metanolu/acetonitrilu, ktorý plnil funkciu precipitačného činidla. Druhá skúmavka obsahovala 0,5 ml plazmy, 25 μ l zásobného roztoku ketoprofenu o koncentrácii 1 mg/ml, 50 μ l zásobného roztoku benetazonu o koncentrácii 1 mg/ml, 0,5 ml H_3PO_4 a 2,0 ml metanolu/acetonitrilu. Potom boli obe skúmavky premiestnené do trepačky, kde bol ich obsah po dobu 10 minút intenzívne pretrepávaný. Po desiatich minútach trepania boli skúmavky prenesené do centrifugačného zariadenia, kde boli 10 minút centrifugované pri otáčkach 10 000 za minútu. Do čistých skúmaviek bola potom pipetou odobraná číra vrstva metanolu/acetonitrilu, ktorá bola prúdom dusíku odparená do sucha. Získaný extrakt bol následne rozpustený v 1 ml mobilnej fázy. Tieto vzorky boli analyzované pomocou HPLC na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m) za použitia mobilnej fázy metanol : vodný roztok KH_2PO_4 (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min. Pre stanovenie výťažnosti skúšaných látok z plazmy bolo vykonané meranie porovnávacieho roztoku ketoprofenu v metanole o koncentrácii 25 μ g/ml a benetazonu v metanole o koncentrácii 50 μ g/ml.

Extrakcia kvapalina – kvapalina (LLE)

Do skúmavky bolo odmerané 0,5 ml rozmrazenej plazmy, ku ktorej bolo pomocou mikropipety pridané 25 µl zásobného roztoku ketoprofenu 1 mg/ml a 50 µl zásobného roztoku benetazonu 1 mg/ml. Potom bol roztok okyslený pridaním 0,5 ml zriedenej kyseliny H₃PO₄ z dôvodu potlačenia ionizácie analyzovaných látok. Podobne bol v druhej skúmavke pripravený kontrolný blankový roztok so zložením 0,5 ml rozmrazenej plazmy a 0,5 ml H₃PO₄. Do oboch skúmaviek boli následne pridané 2,0 ml organického rozpúšťadla, ktoré tvoril dietyléter alebo dichlórmetán. Vzorky boli po dobu 10 minút intenzívne pretrepávané na trepačke, potom boli na 10 minút vložené do centrifúgy, kde boli odstredované pri 10 000 otáčkach za minútu. Organické vrstvy obsahujúce extrakt boli prenesené do čistých skúmaviek a vysušené plynným dusíkom. Extrakty boli potom rozpustené v 1 ml mobilnej fázy. Takto vzniknuté vzorky boli následne analyzované na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použitia mobilnej fázy metanol : vodný roztok KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min. Pre stanovenie výtťažnosti skúšaných látok z plazmy bolo vykonané meranie porovnávacieho roztoku ketoprofenu v metanole o koncentrácii 25 µg/ml a benetazonu v metanole o koncentrácii 50 µg/ml.

Overenie linearity v plazme

Pre zostrojenie kalibračnej závislosti v plazme bola pripravená séria piatich vzoriek s konštantnou koncentraciou benetazonu 50 µg/ml a koncentraciou ketoprofenu 10,0; 15,0; 25,0; 35,0 a 50 µg/ml. Do piatich skúmaviek bolo najprv pipetované 0,5 ml plazmy a okyslené prídavkom 0,5 ml zriedenej kyseliny H₃PO₄. Potom bolo do skúmaviek pridané 50 µl zásobného roztoku benetazonu 1 mg/ml a k nemu 10; 15; 25; 35, respektíve 50 µl zásobného roztoku ketoprofenu o koncentrácii 1 mg/ml. Ku všetkým vzorkám boli pridané 2 ml dietyléteru ako extrakčného činidla. Potom bolo vzorky extrahované pomocou LLE a analyzované na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použitia mobilnej fázy metanol: vodný roztok KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min.

Roztok pre stanovenie detekčného a kvantifikačného limitu

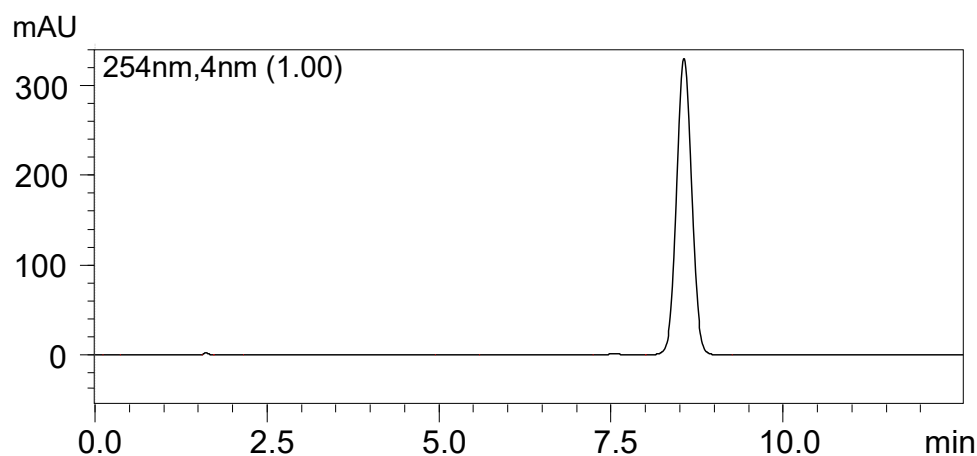
Roztok ketoprofenu o koncentrácii 0,2 µg/ml bol pripravený nariadením 10 µl zásobného roztoku štandardu 100 µg/ml (zásobný roztok pre extrakciu z plazmy) do 5 ml metanolu. Tento roztok bol ďalej riedený metanolom na koncentrácie 0,4 µg/ml a 0,16 µg/ml. Vzorky boli následne analyzované na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použitia mobilnej fázy metanol: vodný roztok KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min. Výsledky slúžili pre výpočet detekčného a kvantifikačného limitu.

5. Výsledky a diskusia

5.1 Chromatografické podmienky pre HPLC analýzu ketoprofenu

5.1.1 Stacionárna a mobilná fáza

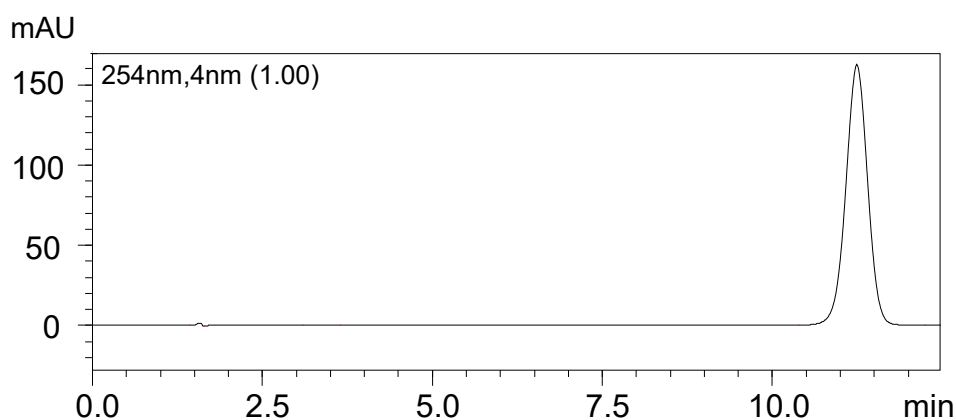
Pri hľadaní chromatografických podmienok pre analýzu ketoprofenu bolo najprv nutné nájsť vhodnú stacionárnu a mobilnú fázu. Ako najvhodnejšia stacionárna fáza bola zvolená kolóna LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 s veľkosťou častíc 5 µm. Bolo potrebné nájsť takú mobilnú fázu, pri ktorej by dochádzalo k úplnému rozdeleniu analyzovanej látky a vnútorného štandardu a s použitím ktorej by boli dosiahnuté prijateľné retenčné časy oboch látok. Pri výbere mobilnej fáze bolo skúšaných množstvo zmesí obsahujúcich vodnú zložku s rôznym pH a organické rozpúšťadlo v rôznych pomeroch. Ako najvhodnejšia mobilná fáza bola zvolená zmes metanolu a vodného roztoku KH_2PO_4 (okysleneého zriedenou kyselinou H_3PO_4 na hodnotu pH 3,4) v pomere 60:40 (v/v). Teplota bola nastavená na 25 °C, analýza prebiehala za prietoku 1 ml/min, nastrekovaný objem vzorky činil 10 µl. Pri týchto podmienkach dosiahol ketopropfen prijateľný retenčný čas a to približne 7,9 minút.



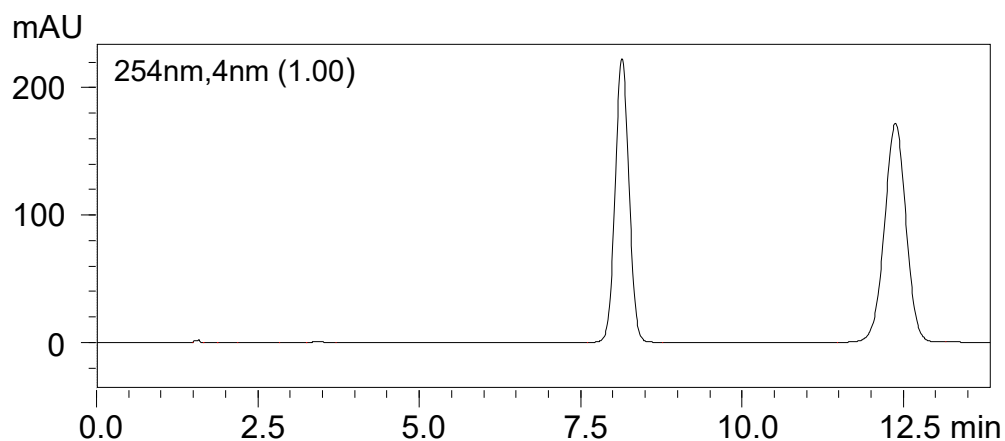
Obr. 3 Chromatogram analýzy ketoprofenu 0,1 mg/ml; kolóna LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm); mobilná fáza : MeOH : 0,01M KH_2PO_4 (pH 3,4), 60:40 (v/v)

5.1.2 Vnútorý štandard

Ako potenciálne vnútorné štandardy bolo vyskúšané niekoľko látok. Bolo nutné vybrať takú látku, ktorá sa bude eluovať v blízkosti ketoprofenu, avšak s dostatočným rozdelením na základnej línii, aby nedochádzalo k vzájomnému prekrytiu pík. Píky by mali byť tiež dostatočne ostré a symetrické a zároveň by mala analýza prebiehať v čo najkratšom čase. Ako najvhodnejší vnútorný štandard bol zo všetkých skúšaných látok vybraný benetazon, ktorý sa za daných chromatografických podmienok eluoval v čase 12,08 minút.



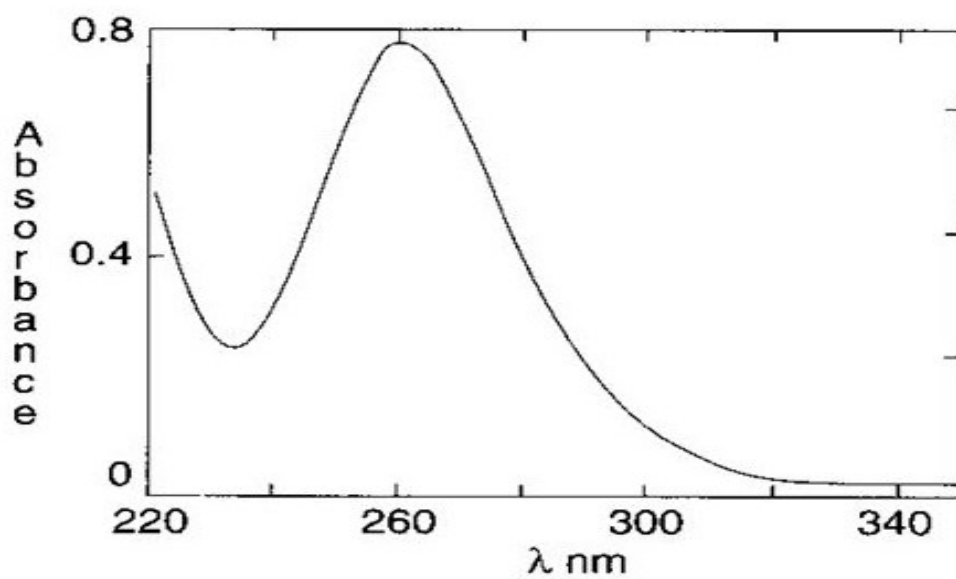
Obr. 4 Chromatogram separácie benetazonu za použitia chromatografických podmienok uvedených na strane 53



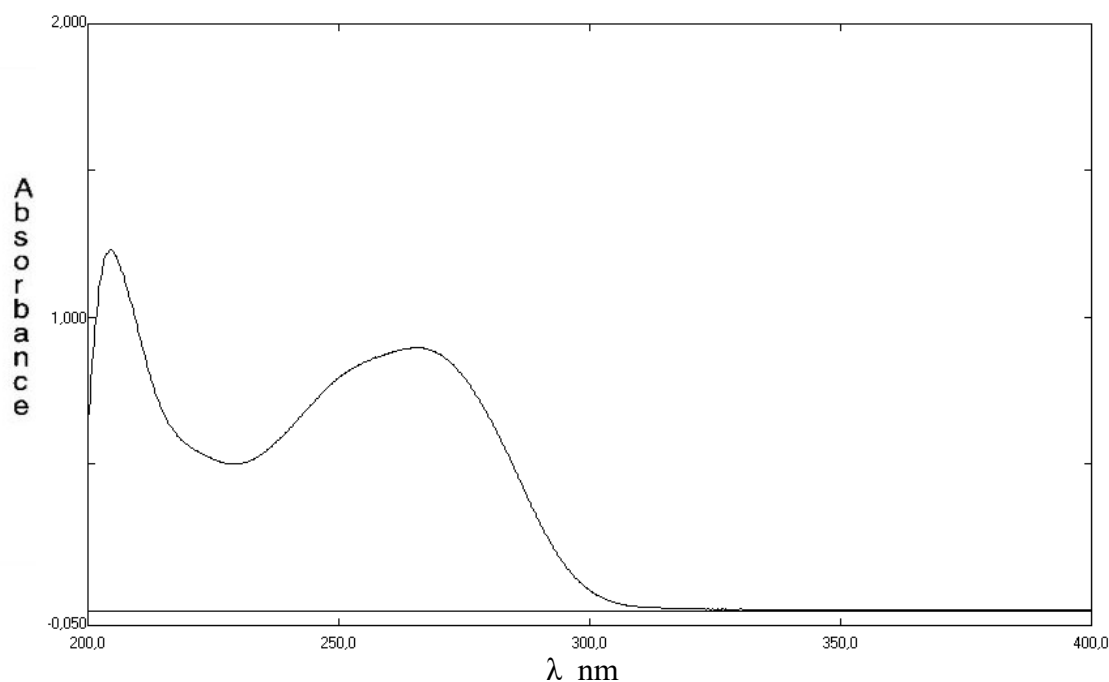
Obr. 5 Chromatogram separácie ketoprofenu a benetazonu za použitia chromatografických podmienok uvedených na strane 53

5.1.3 Výber vlnovej dĺžky

Pre HPLC analýzu ketoprofenu bola zvolená vlnová dĺžka 254 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke bolo dosiahnuté dobrej citlivosti pre analyzovanú látku.



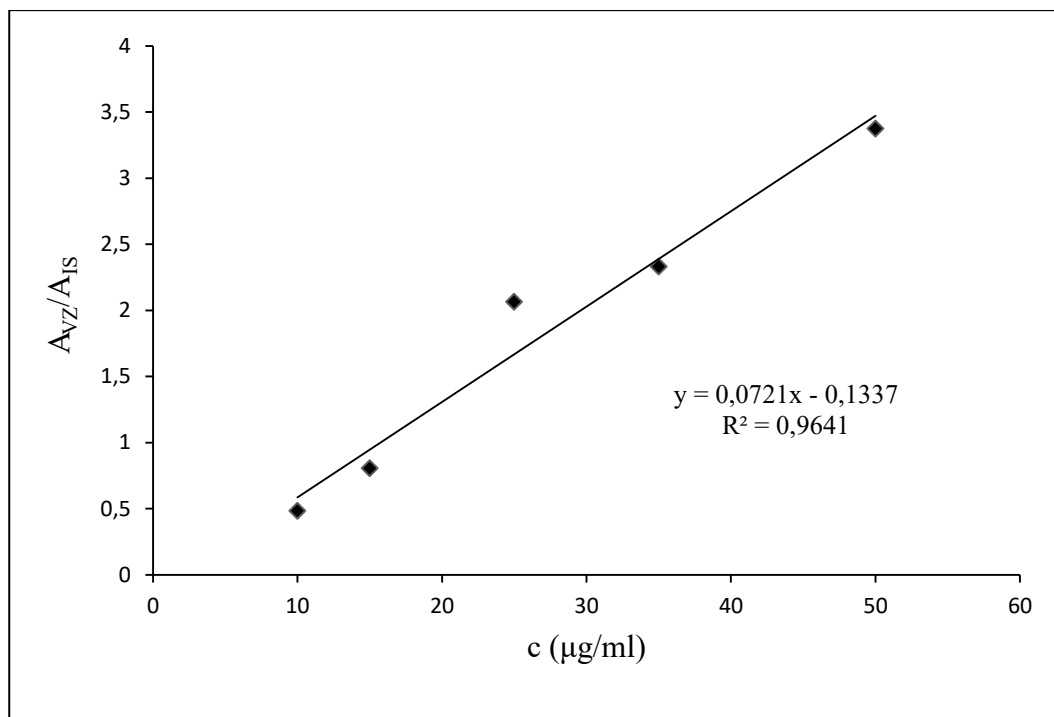
Obr. 6 Absorpčné spektrum ketoprofenu



Obr. 7 Absorpčné spektrum benetazonu

5.1.4 Overenie linearity

Po nájdení vhodných chromatografických podmienok pre HPLC analýzu ketoprofenu bolo nutné overiť, či vypracovaná metóda poskytuje v danom koncentračnom rozmedzí lineárnu odozvu. Obvykle sa stanovuje minimálne päť rôznych koncentrácií v rozmedzí 50-150 % deklarovaného obsahu. Preto bola pripravená séria vzoriek so štandardom ketoprofenu o koncentracii 10- 50 µg/ml a so štandardom benetazonu o koncentracii 50 µg/ml. Vzorky boli podrobené HPLC analýze a z výsledkov bola následne zostavená kalibračná závislosť pomeru plôch píkoven ketoprofenu a benetazonu na koncentracii ketoprofenu v roztoku. Bola tiež vypočítaná rovnica kalibračnej priamky a koeficient determinácie R^2 , ktorý nadobudol hodnoty 0,9641.



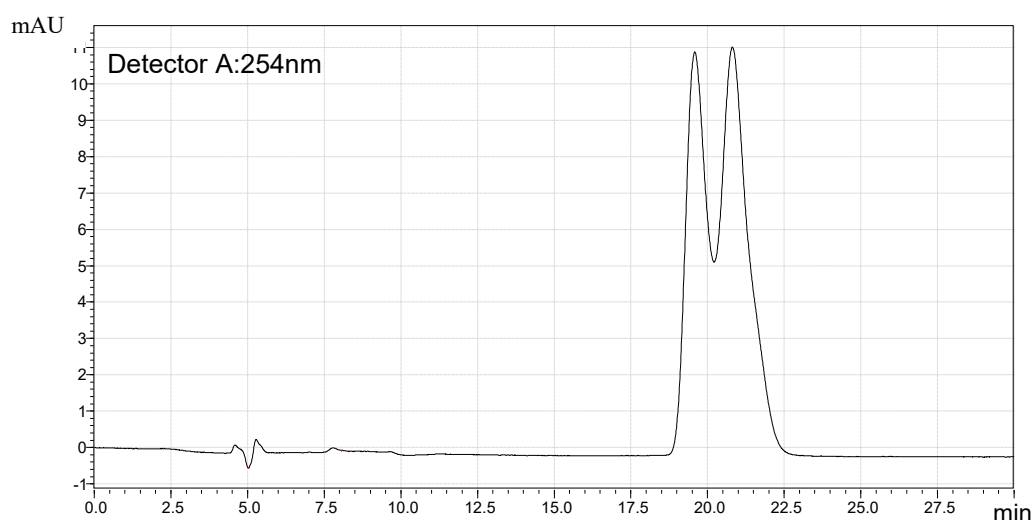
Obr. 8 Kalibračná krivka štandardného roztoku ketoprofenu a benetazonu, príprava vid' strana 54

5.2 Chirálna analýza ketoprofenu pomocou HPLC

5.2.1 Stacionárna a mobilná fáza

Na základe skúseností z predošlých diplomových prác zaoberajúcich sa chirálnou separáciou profénov bola pre analýzu ketoprofenu zvolená kolóna Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm, (10 μm), Daicel Chemical industries. Jedná sa o kolónu založenú na báze imobilizovaného chirálneho selektora na silikagélovom nosiči. Ako chirálny selektor je v prípade vybranej kolóny použitý tris (3,5- dimetylfenylkarbamát) celulózy naviazaný na 10 μm silikagéli. Pre chirálnu analýzu ketoprofenu bolo vyskúšané taktiež rozsiahle množstvo mobilných fáz v najrôznejších pomeroch za použitia normálneho ako aj reverzného módu. Keďže v prípade reverzného módu nedošlo ani k náznaku rozdelenia enantiomérov, bol ako účinnejší zvolený normálny mód. Ako

najvhodnejšia bola zvolená mobilná fáza zložená zo zmesi heptánu a 2-propanolu v pomere 97:3 s prídavkom 0,6 ml kyseliny mravčej pri prietokovej rýchlosti 0,7 ml/min. Za týchto podmienok sa eluoval ketoprofén ako zmes dvoch enantiomérov v čase približne 19,2 minút. Pri vyššom prietoku síce dochádzalo ku skráteniu retenčných časov, ale zároveň k zníženiu rozlíšenia medzi enantiómami (vid' tabuľka 1). Za vybraných podmienok nedošlo však k úplnému rozdeleniu enantiomérov až na základnej línii, ale pre nedostatok času nebolo možné ďalej pokračovať vo vývoji vhodnej metódy.



Obr. 9 Chromatografický záznam separácie enantiomérov ketoprofenu za použitia podmienok uvedených na strane 55.

Tabuľka 1 Porovnanie rozlíšenia a retenčných časov enantiomérov ketoprofenu v závislosti na prietoku mobilnej fázy

prietok mobilnej fázy (ml/min)	rozlíšenie (R)	retenčné časy enantiomérov (min)	
0,5	0,97	24,19	25,44
0,7	1,08	19,17	20,42
1,0	0,58	14,47	15,72

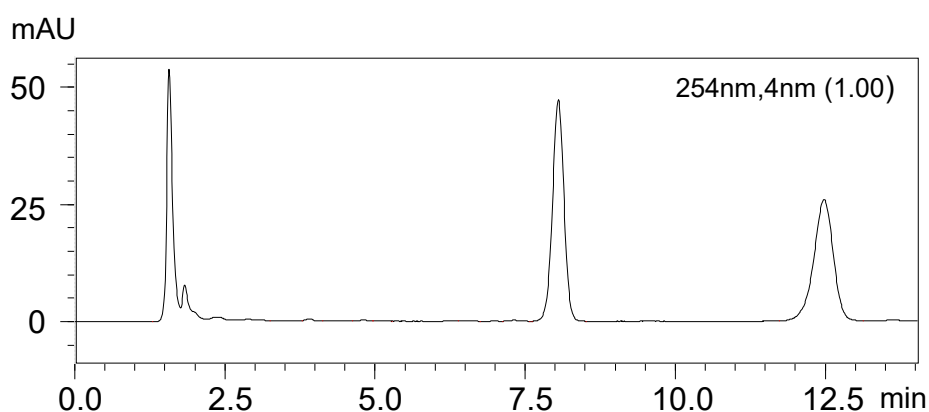
5.3 Analýza v biologickom materiáli

Aby bolo možné dávkovať vzorku ketoprofenu v plazme do chromatografického systému, bolo najprv nutné túto vzorku vhodným spôsobom upraviť. Boli skúšané dva spôsoby úpravy vzorky a to deproteínácia a extrakcia kvapalina- kvapalina (LLE). Pri deproteínácii bol ako precipitačné činidlo skúšaný metanol a acetonitril, pričom lepších výsledkov bolo dosiahnuté za použitia acetonitrilu. Výťažnosť tejto metódy bola v priemere 85,84 %. LLE- extrakcia bola vykonaná s použitím dietyléteru a dichlórmetánu ako extrakčného rozpúšťadla, pričom za vhodnejší spôsob bola zvolená LLE- extrakcia s použitím dietyléteru. Výťažnosť tu bola vyššia ako pri deproteínácii a činila v priemere 102,42 %.

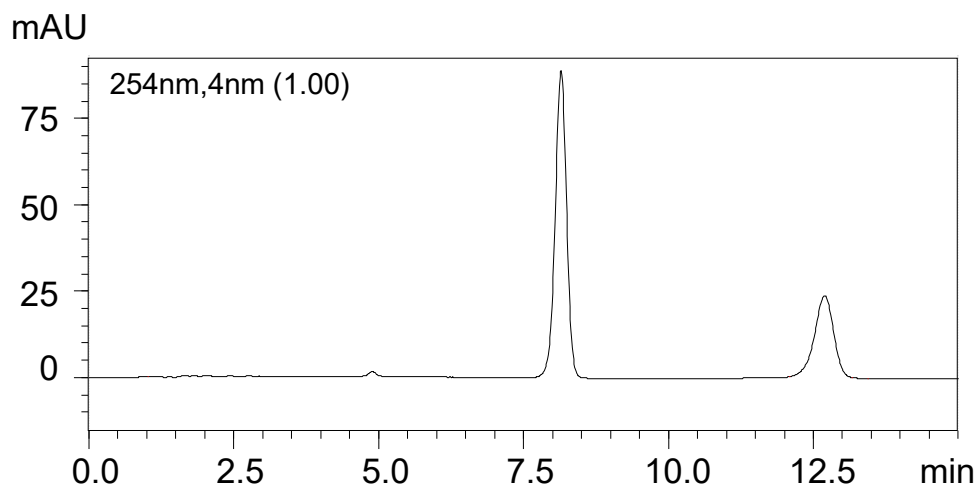
Analýza takto upravených vzoriek prebiehala na kolóne LiChro CART® 125-4 Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm) za použitia mobilnej fázy metanol: vodný roztok KH₂PO₄ (pH = 3,4) v pomere 60:40 (v/v) a s prietokom 1 ml/min.

Tabuľka 2 Porovnanie hodnôt výťažnosti pri extrakcii metódou deproteínácie a metódou LLE- extrakcie

Deproteínácia - acetonitril			LLE extrakcia - dietyléter			
1.	2.	priemer	1.	2.	3.	priemer
98,21 %	73,46 %	85,84 %	102,80%	114,65%	89,82%	102,42%



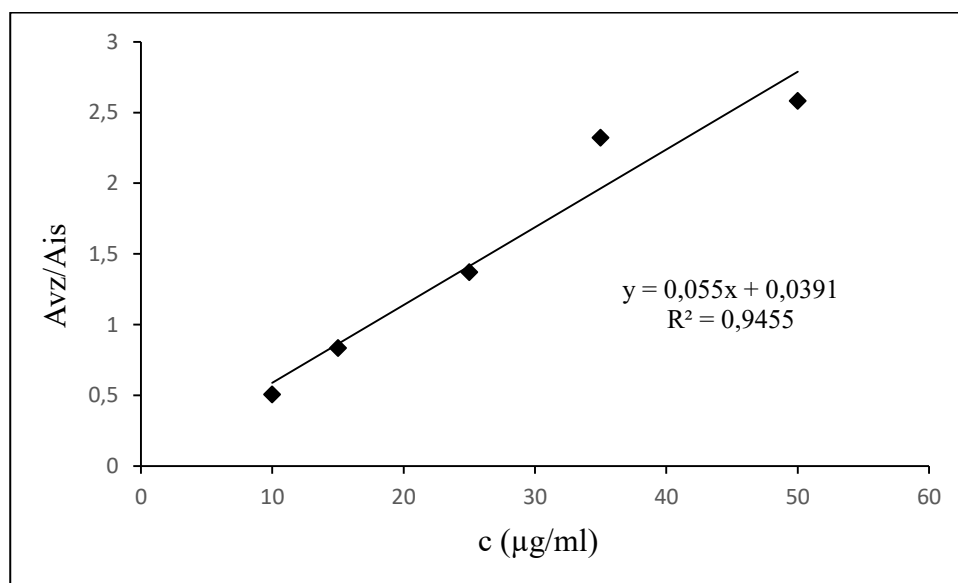
Obr. 10 Chromatogram ketoprofenu a benetazonu po extrakcii z plazmy metódou deproteínácie, chromatografické podmienky uvedené na str. 56



Obr.11 Chromatogram ketoprofenu a benetazonu po extrakcii z plazmy metódou LLE extrakcie, chromatografické podmienky uvedené na str. 57

5.3.1 Overenie linearity v plazme

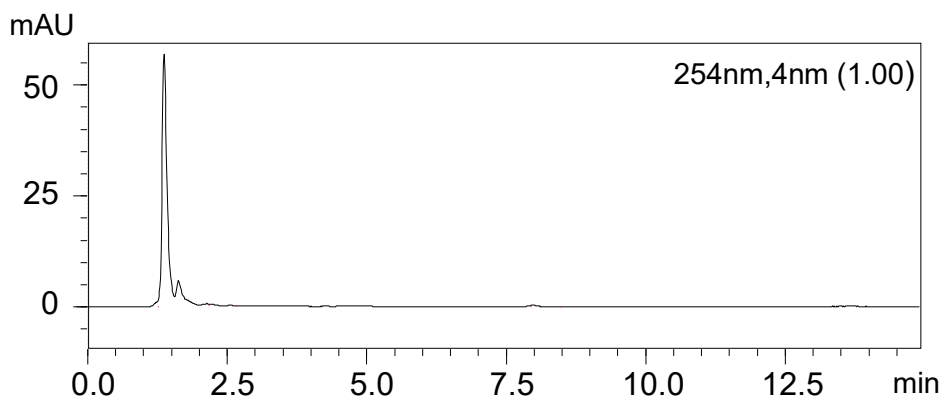
Linearita charakterizuje schopnosť dávať výsledky priamo úmerné koncentrácii stanovovanej látky. Táto schopnosť bola overená kalibračnou krivkou, ktorá znázorňuje závislosť koncentrácie ketoprofenu na pomere plochy píku ketoprofenu a plochy píku benetazonu. Následne bola vypočítaná rovnica kalibračnej krivky a koeficient determinácie R^2 .



Obr. 12 Kalibračná krivka po vykonaní LLE extrakcie ketoprofenu a benetazonu z plazmy , príprava vid' strana 57

5.3.2 Selektivita

Selektivita metódy je vlastnosť zmerať danú látku správne a špecificky v prítomnosti iných látok, ktoré možno očakávať vo vzorke. Pre overenie selektivity vyvinutej metódy bola vykonaná analýza slepej vzorky obsahujúcej len extrakt z čistej plazmy. Z uvedeného chromatogramu je zrejmé, že pri retenčnom čase ketoprofenu ani benetazonu nevykazuje slepá vzorka plazmy nečistoty, ktoré by rušili priebeh analýzy.



Obr. 13 Chromatografický záznam po vykonaní extrakcie z čistej plazmy, podmienky merania uvedené na str. 57

5.3.3 Detekčný a kvantitatívny limit

Ako parameter citlivosti vyvinutej metódy bol vypočítaný detekčný a kvantitatívny limit pre ketoprofén. Detekčný limit je najnižšia detekovateľná koncentrácia látky, ktorá sa nestanovuje kvantitatívne. Vyjadruje sa ako koncentrácia analyzovanej látky, pri ktorej sa pomer signálu k šumu rovná hodnote 3. Kvantitatívny limit je najnižšia koncentrácia látky, ktorú možno stanoviť s prijateľnou presnosťou a správnosťou. Vyjadruje sa ako koncentrácia, pri ktorej sa pomer signálu k šumu rovná hodnote 10. ³⁶

Tabuľka 3 Hodnoty limitu detekcie (LOD) a limitu kvantifikácie (LOQ)

koncentrácia ketoprofenu (µg/ml)	pomer signálu k šumu	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
0,160	2,176654	0,2083	0,7212

5.3.4 Presnosť, správnosť

Správnosť vyjadruje zhodu medzi získaným výsledkom a správnou hodnotou. Obvykle sa zistí analýzou najmenej šiestich vzoriek a vyjadrí sa ako rozdiel správnej a získanej hodnoty alebo ako výťažnosť. Presnosť je miera zhody medzi jednotlivými výsledkami opakovane získanými s jednou homogénnou vzorkou. Presnosť sa vyjadrí ako relatívna smerodajná odchýlka obvykle šiestich stanovení tejto vzorky.³⁶

Tabuľka 4 Hodnoty výťažnosti a relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) na troch koncentračných úrovniach po extrakcii z plazmy

c₀ (µg/ml)	pomer A_{vz}/A_{is}	c (µg/ml)	výťažnosť (%)	RSD (%)
ketoprofén 10 benetazon 50	0,656201	11,22	112,20	3,72
	0,676642	11,59	115,92	
	0,702944	12,07	120,70	
	0,641353	10,95	109,50	
	0,661150	11,31	113,10	
priemer	0,667658	11,428	114,28	
ketoprofén 25 benetazon 50	1,239749	21,83	87,32	1,87
	1,255705	22,12	88,48	
	1,274954	22,47	89,88	
	1,213908	21,36	85,44	
	1,2524	22,06	88,24	
priemer	1,247343	21,968	87,87	
ketoprofén 40 benetazon 50	2,215454	39,57	98,93	1,25
	2,182998	38,98	97,45	
	2,152207	38,42	96,05	
	2,209406	39,46	98,65	
	2,168700	38,72	96,80	
priemer	2,185753	39,03	97,58	

Získané výsledky vyhovujú smernici Európskej liekovej agentúry pre validáciu bioanalytických metód. Podľa nej by mala správnosť (vyjadrená ako výťažnosť) nadobúdať hodnôt $\pm 15\%$ skutočnej koncentrácie a presnosť (vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka) by nemala prekročiť 15% .¹⁰

5.3.5 Opakovateľnosť nástreku

Opakovateľnosť nástreku je tu vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka pre päť meraní vzorky získanej po extrakcii z plazmy na troch koncentračných úrovniach.

Tabuľka 5 Opakovateľnosť nástreku na troch koncentračných úrovniach po extrakcii z plazmy

	1.	2.	3.	4.	5.	priemer	SD	RSD (%)
ketoprofén 10 µg/ml	238506	238304	240085	269696	240318	245381,8	13622,14	5,55
benetazon 50 µg/ml	363465	352186	341542	420511	363485	368237,8	30611,2	8,31
ketoprofén 25 µg/ml	168462	168380	169523	167228	158763	166471,2	4384,9	2,63
benetazon 50 µg/ml	135884	134092	132964	137760	126767	133493,4	4177,376	3,13
ketoprofén 40 µg/ml	375690	375801	374923	369976	373615	374001	2413,111	0,65
benetazon 50 µg/ml	169577	172149	174204	167455	172276	171132,2	2632,421	1,54

6. Záver

V tejto diplomovej práci boli vypracované optimálne podmienky pre analýzu ketoprofenu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Ako stacionárna fáza bola zvolená kolóna LiChro CART® 125-4 s náplňou Lichrospher® 100 RP-18 s veľkosťou častíc 5 μm a pre mobilnú fázu bola použitá zmes metanolu a vodného roztoku 0,01M KH_2PO_4 (pH 3,4) v pomere 60:40 (v/v). Prietoková rýchlosť bola nastavená na 1 ml/min a teplota kolóny na 25 °C. Na kolónu bolo nastrekované 10 μl vzorky a skúmané látky boli detegované UV detektorom pri 254 nm. Ako vhodný vnútorný štandard bol vybraný benetazon. Za použitia týchto podmienok boli dosiahnuté retenčné časy ketoprofenu a benetazonu zhruba 7,9 a 12,08 minút.

Ďalšia časť práce sa zaoberala chirálnou analýzou ketoprofenu, kde bolo cieľom nájsť podmienky pre separáciu jeho enantiomérov. Na základe poznatkov zo štúdií a predošlých diplomových prác zaoberajúcich sa touto tematikou bola ako najvhodnejšia zvolená kolóna Chiralcel OD-R, 250 x 4,6 mm, (10 μm). Mobilná fáza pozostávala z heptánu a 2-propanolu s prídavkom 0,6 ml kyseliny mravčej v pomere 97:3 (v/v). Pri prietokovej rýchlosti 0,7 ml/min sa eluoval ketopropfen ako zmes dvoch enantiomérov v čase približne 19,2 minút.

Pre úpravu biologického materiálu bola vybraná metóda extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina. Ako extrakčné činidlo bol zvolený dietyléter, pričom výťažnosť činila v priemere 102,42 %. Nasledovala validácia vyvinutej metódy, kde bola overovaná linearita, presnosť, správnosť ako aj selektivita separácie.

7. Zoznam skratiek

- SF = stacionárna fáza
- MF = mobilná fáza
- CSP = chirálna stacionárna fáza
- CD = cyklodextríny
- MeOH = metanol
- ACN = acetonitril
- IPA = 2-propanol
- HPLC = vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- SPE = extrakcia tuhou fázou
- LLE = extrakcia v systéme kvapalina- kvapalina
- SPME = mikroextrakcia na tuhej fáze
- TLC = tenkovrstvová chromatografia
- UHPLC = ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

8. Zoznam použitej literatúry

1. KLÍMA, J.; GRAFFNETTEROVÁ, J. *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*. In: Pokroky ve farmacii 7. Praha : Avicenum, 1987.
2. CHURÁČEK, J.; JANDERA P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: SNTL, 1984. Knižnice technických aktualit.
3. KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv I*. Praha : Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1613-1.
4. ŠARŠÚNOVÁ, M.; HANČ, O. et al. *Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia vo farmácii a biochémií*. Martin : Osveta, 1985.
5. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
6. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
7. SETTLE, F. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Upper Saddle River : Prentice Hall PTR, 1997. ISBN 978-13-177338-0.
8. KARLÍČEK, R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
9. FDA: Guidance for Industry, *Bioanalytical Method Validation*. [online] Rockville : U.S. Department of Health and Human Services, 2001. [citácia 12.8.2018].
10. EMEA. *Guideline on validation of bioanalytical methods*. [online]. London: European Medicines Agency, 2015 [citácia 12.8.2018].
11. HARVEY, D. *Modern Analytic Chemistry*. New York : McGraw-Hill Higher Education, 2000. ISBN 978-0-072-37547-7.

12. *Český lékopis 2017*. Praha: Grada, 2017, ISBN 978-80-271-0500-7.
13. ŠEVČÍK, J. ; TESAŘOVÁ, E. ; STRÁNSKÝ, Z. *Separácie chirálnych látok kapilárnou elektroforézou*. [online]. Chemické listy 95, 2001. [Citácia 13.8.2018]
14. DOHNAL, J. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 978-80-7305-056-6.
15. BABJUK, J.; PERLÍK, F.; ŠÍDLO Z. *Bioanalytika léků*. Praha : Avicenum, 1990.
16. PRABU, S. L.; SURIYAPRAKASH, T. N. K. *Extraction of drug from the biological matrix: A Review: Applied biological engineering - Principles and Practice* [online]. InTech, 2012. [Citácia 8.8.2018]
17. HANSEN, S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. *Bioanalysis of Pharmaceuticals*. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 2015. ISBN 11-1871682-5.
18. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
19. STRAKOVÁ, M.; MATISOVÁ, E. *Súčasný trendy v analýze organických látok vo vzorkách vôd s využitím HRGC a jej kombinácie s predkoncentračnými technikami*. [online] Chemické listy 91, 1997. [Citácia 1.8.2018]
20. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, Copyright © 2001. [citácia 24.7.2018]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>
21. Ketoprofen. *PubChem Compound Database* [online]. Bethesda MD: U.S. National Library of Medicine [citácia 24.7. 2018]. Dostupné z : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825>

22. Souhrn údajů o přípravku : Ketonal forte 100 mg tablety. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, c2010, 2016 [citácia 25.7.2018]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0076653&tab=texts>
23. DOLEŽAL, T.; VNOUČKOVÁ, K. Dexketoprofen. *Remedia*, **2003**, *13*, 302- 307.
24. PÉHOURCQ, F. et al. Chiral resolution of flurbiprofen and ketoprofen enantiomers by HPLC on a glycopeptide-type column chiral stationary phase. *Biomed chromatogr.* **2001**, *15*, 3, 217- 222.
25. ZHANSHENG, G. et al. Chiral separation of ketoprofen on an achiral C8 column by HPLC using norvancomycin as chiral mobile phase additives. *J Pharm Biomed Anal.* **2006**, *41*,1, 310-314.
26. KAFKOVÁ, B. et al. Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal, anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography. *J Chromatogr A.* **2005**, *1088*, 1-2, 82-93.
27. ALLEGRINI, A. et al. Fast HPLC method for the determination of ketoprofen in human plasma using a monolithic column and its application to a comparative bioavailability study in man. *Arzneimittelforschung.* **2009**, *59*(3), 135-140.
28. JINCUI, Y. et al. Enantiomeric separation of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs by HPLC with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as chiral mobile phase additive. *Biomed chromatogr.* **2010**, *24*, 8, 799 – 807.
29. ZHOU, J. et al. Chiral Separation and Quantitative Determination of Ketoprofen on New Cellulose Bonded Chiral Stationary Phase by HPLC. *ABER.* **2013**, *1*, 4, 178 - 184.
30. SARDELLA, R. et al. Ketoprofen enantioseparation with a Cinchona alkaloid based stationary phase: enantiorecognition mechanism and release studies. *J Sep Sci.* **2014**, *37* (19), 2696- 2703.

31. HELMY, S. A. et al. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of several nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* **2014**, *36* (1), 100-107.
32. HUSSAIN, A. et al. Development and validation of SPMME HPLC method for analysis of profens from human plasma. *Biomed chromatogr.* **2015**, *30*, 8, 1263 – 1269
33. KALÍKOVÁ, K. et al. Evaluation of differences between Chiralpak IA and Chiralpak AD-RH amylose-based chiral stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci.* **2015**, *38*, 5, 711-719.
34. MATARASHVILI, I. et al. Separation of enantiomers of chiral weak acids with polysaccharide-based chiral columns and aqueous-organic mobile phases in high-performance liquid chromatography: Typical reversed-phase behavior? *J Chromatogr A.* **2016**, *1483*, 86-92.
35. CAMACHO-MUÑOZ, D. et al. Simultaneous enantiomeric analysis of pharmacologically active compounds in environmental samples by chiral LC-MS/MS with a macrocyclic antibiotic stationary phase. *J Mass Spectrom.* **2017**, *52* (2), 94-108.
36. KLIMEŠ, J. et al. *Kontrola léčiv II.* Praha : Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1460-1.