

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



HPLC analýza podofylotoxinu

Diplomová práce

Markéta Nováková

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

Hradec Králové, 2021

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

V Hradci Králové, 1.6.2021

.....

Markéta Nováková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a věnovaný čas v průběhu vypracování práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za pomoc a vstřícné jednání a doc. PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za poskytnutí vzorků.

# OBSAH

OBSAH .....	4
1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1 Podofylotoxin.....	8
2.1.1 Vzorec a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	8
2.1.2 Farmakologické vlastnosti .....	8
2.1.3 Zdroje podofylotoxinu .....	9
2.1.4 Deriváty podofylotoxinu .....	9
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	11
2.2.1 Princip HPLC.....	11
2.2.2 Základní komponenty HPLC .....	12
2.2.3 Charakteristiky analýzy.....	12
2.2.3.1 Kvalitativní analýza .....	12
2.2.3.2 Kvantitativní analýza .....	13
2.2.4 Stacionární fáze.....	15
2.2.4.1 Silikagel .....	15
2.2.4.2 Chemické modifikace silikagelu.....	17
2.2.4.3 Kolony s pevným jádrem .....	18
2.2.4.4 Oxidy kovů.....	18
2.2.4.5 Polymery .....	18
2.2.5 Detektory.....	18
2.2.5.1 Spektrofotometrické detektory.....	19
2.2.5.2 Fluorescenční detektory .....	20
2.2.5.3 Hmotnostně spektrometrické detektory (MS detektory).....	21
2.2.5.4 Elektrochemické detektory .....	22
2.2.5.5 Vodivostní detektory.....	22
2.2.5.6 Refraktometrické detektory.....	22
2.2.5.7 Evaporative light scattering detector (ELSD) .....	22
2.2.5.8 Corona discharge detector (CAD).....	22
2.2.6 Separáční módy .....	23
2.2.6.1 Chromatografie na normálních fázích.....	23

2.2.6.2 Chromatografie na reverzních fázích .....	23
2.2.6.3 Hydrofilní interakční chromatografie .....	24
2.2.6.4 Iontově výměnná chromatografie .....	24
2.2.6.5 Size-exclusion chromatografie.....	24
2.2.6.6 Chirální chromatografie .....	25
2.3 Validace metody v HPLC .....	27
2.3.1 Parametry .....	27
2.3.1.1 Přesnost metody .....	29
2.3.1.2 Preciznost metody .....	29
2.3.1.3 Linearita a rozsah metody .....	30
2.3.1.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	31
2.3.1.5 Selektivita metody.....	31
2.3.1.6 Robustnost metody.....	31
2.4 Chromatografické podmínky pro separaci podofylotoxinu pomocí kapalinové chromatografie uvedené v literárních zdrojích.....	32
3. Cíl práce .....	34
4. Experimentální část.....	35
4.1 Chemikálie a pomůcky.....	35
4.1.1 Chemikálie .....	35
4.1.2 Chromatografická sestava .....	35
4.1.3 Přístroje .....	36
4.1.4 Pomůcky.....	36
4.2 Obecné postupy .....	36
4.2.1 Příprava standardu.....	36
4.2.2 Příprava mobilní fáze .....	36
4.2.3 Příprava vzorků .....	37
4.2.4 Příprava roztoků na validaci.....	37
4.3 Optimalizace HPLC podmínek .....	38
5. Výsledky a diskuse.....	40
5.1 Optimalizace podmínek HPLC .....	40
5.1.1 Výběr detekce.....	40
5.1.2 Výběr stacionární fáze.....	40
5.1.3 Výběr mobilní fáze.....	41
5.1.4 Vliv teploty .....	42

5.1.5 Vliv doby extrakce na ultrazvuku .....	43
5.1.6 Gradientová eluce.....	44
5.2 Validace metody pro extrakt z drogy .....	46
5.2.1 Preciznost .....	46
5.2.2 Přesnost .....	46
5.2.3 Linearita .....	48
5.2.4 Selektivita.....	49
5.2.5 Limit detekce a limit kvantifikace.....	49
5.3 Validace metody pro extrakt z kultury .....	50
5.3.1 Preciznost .....	50
5.3.2 Přesnost .....	51
5.3.3 Linearita .....	52
5.3.4 Limit detekce, limit kvantifikace a selektivita .....	53
5.4 Využití metody stanovení podofylotoxinu v extraktech .....	54
6. Závěr .....	55
ABSTRAKT.....	56
ABSTRACT .....	57
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	58
POUŽITÁ LITERATURA.....	60

# 1. ÚVOD

Podofylotoxin je sekundární rostlinný metabolit ze skupiny lignanů, vyskytující se převážně v rostlinách rodu *Podophyllum*, ale získat se dá také z rostlin rodu *Juniperus*. Působí jako mitotický vřeténkový jed inhibující buněčné dělení. Používá se jako antivirotikum proti genitálním bradavicím způsobených lidským papilomavirem (HPV). Terapeuticky více významné jsou jeho polosyntetické deriváty etoposid, teniposid a etopofos, které se používají k léčbě maligních nádorů.

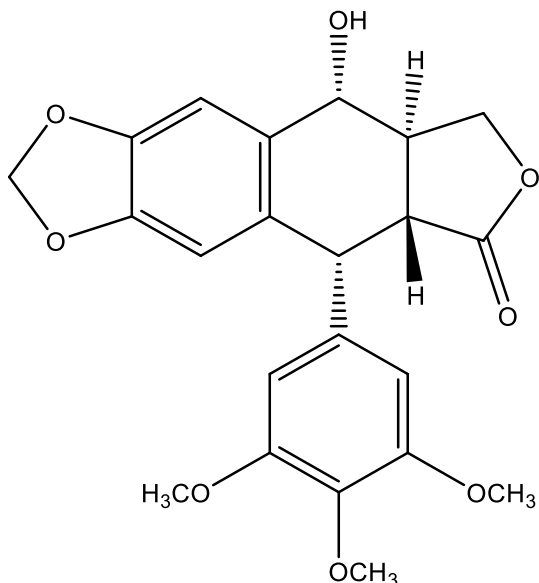
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) je jednou z nejčastěji používaných metod ve farmaceutické analýze. Má široké využití, např. pro stanovení obsahu, identifikaci látek a stanovení čistoty léčiv. K jejím výhodám patří citlivost stanovení, možnost analyzovat směsi látek, možnost automatizace, kvalitativní i kvantitativní hodnocení.

V současné době je nezbytné vyvinuté analytické metody validovat. To nám zajistí spolehlivost metody pro zamýšlené užití. K základním validačním parametrům posuzovaným v průběhu validace patří přesnost, preciznost, linearita, selektivita, limit detekce a limit kvantifikace.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Podofylotoxin

#### 2.1.1 Vzorec a fyzikálně-chemické vlastnosti



Obrázek 1: Vzorec podofylotoxinu. [1]

Systematický název: (5*R*,5*aR*,8*aR*,9*R*)-5-hydroxy-9-(3,4,5-trimethoxyfenyl)-5*a*,6,8*a*,9-tetrahydro-5*H*-[2]benzofuro[5,6-*f*][1,3]benzodioxol-8-on

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>

Molekulová hmotnost: 414,41 g/mol

Teplota tání: 184 °C

Vzhled: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek

Rozpustnost: prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v methanolu [1]

#### 2.1.2 Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti: Podofylotoxin je mitotický vřetenkový jed inhibující polymerizaci tubulinu, a tím pádem zastavující buněčné dělení na začátku metafáze. [2]

Indikace: Používá se jako antivirotikum v léčbě genitálních bradavic (condyloma acuminata) způsobených lidským papilomavirem (human papilloma virus, HPV). Účinný je i v léčbě psoriázy (psoriasis vulgaris) a molusek (molluscum contagiosum), benigního kožního



onemocnění vyskytujícího se převážně u dětí. Pryskyřice podofylin se dříve používala jako projímadlo a cholagogum, vzhledem k její toxicitě se ovšem od jejího používání už opustilo. [3, 4]

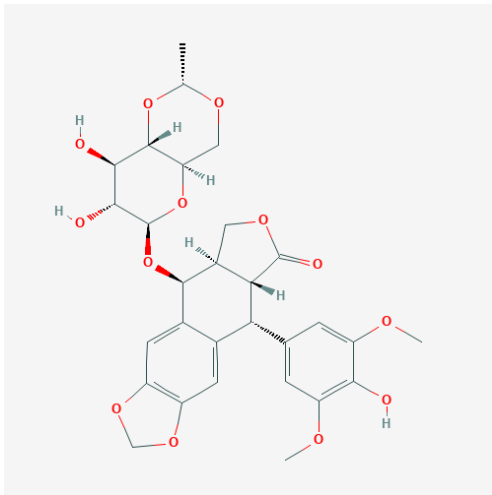
Nežádoucí účinky: Podofylotoxin vykazuje gastrointestinální toxicitu, dále je toxický na hematopoetický a lymfatický systém. Inhibuje nukleosidový transport a také elektronový transport v mitochondriích. Hlavními příznaky jeho toxicity je nauzea a zvracení, alopecie, iritace očí, kůže a dýchacího ústrojí. Mezi projevy chronické intoxikace se řadí poškození gastrointestinálního traktu, ledvin, jater a neuropatie. [2]

### 2.1.3 Zdroje podofylotoxinu

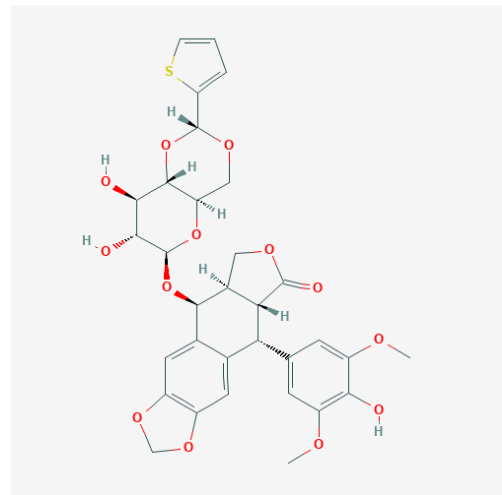
Podofylotoxin patří mezi sekundární metabolity ze skupiny lignanů. Je tradičně izolován z podofylinu, pryskyřice získávané z oddenků rostlin rodu *Podophyllum* (*Podophylli rhizoma*), a to především *Podophyllum emodi* (syn. *hexandrum*) a *Podophyllum peltatum* (*Berberidaceae*). Vyšší obsah podofylotoxinu se vyskytuje v himalájském *Podophyllum emodi*, který je ale ohroženým druhem. Alternativními zdroji podofylotoxinu jsou rostliny: *Juniperus* (zejména druhy *Juniperus virginiana* a *bermudiana*) a *Thuja* (všechno *Cupressaceae*), *Linum* (*Linaceae*), *Hyptis* (*Verbenaceae*), *Dysosma*, *Jeffersonia* (*Berberidaceae*), *Teucrium*, *Nepeta*, *Thymus* (*Lamiaceae*). [3, 2, 4, 5]

### 2.1.4 Deriváty podofylotoxinu

Semisyntetické glykosylované deriváty podofylotoxinu etoposid, teniposid a etopofos (etoposid fosfát) se využívají jako cytostatika v léčbě řady maligních onemocnění jako jsou nádory varlat, malobuněčný nádor plic, lymfomy, leukémie, či Kaposiho sarkom. Jsou méně hydrofobní, a tím pádem i méně toxické na gastrointestinální trakt. Nezasahují do výstavby mikrotubulů, nýbrž svou vazbou na DNA topoizomerázu II, enzym štěpící obě vlákna DNA během replikace, zastavují buněčné dělení v pozdní S fázi nebo časně G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu vyvoláním premitotického bloku. Jejich působení je založeno na tvorbě komplexu nukleová kyselina – léčivo – enzym, který tvoří zlomy v jedno- i dvouvláknové DNA, což následně vede k buněčné smrti. [4, 6]



Obrázek 2: Vzorec etoposidu.[7]



Obrázek 3: Vzorec teniposidu.[8]

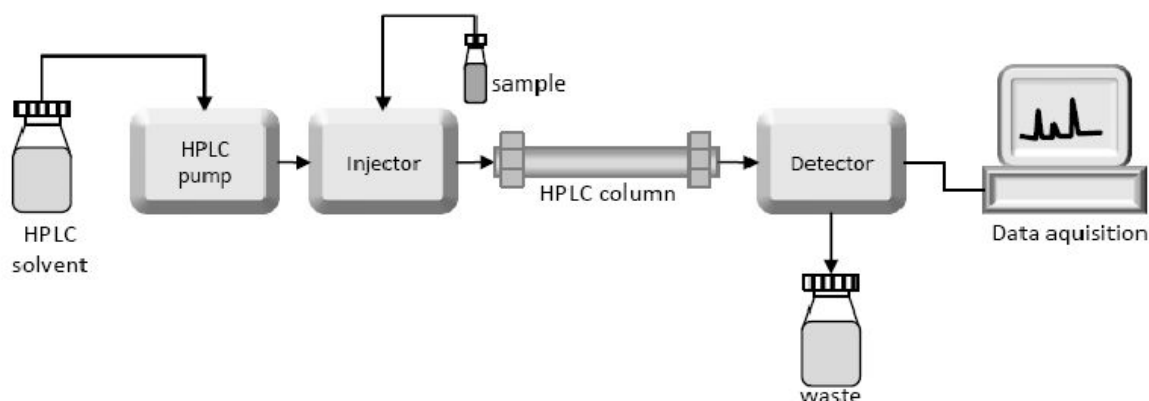
## ***2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie***

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) v současnosti patří k nejvíce využívaným analytickým metodám. Její největší předností je možnost současné kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Mezi další výhody patří citlivost stanovení, univerzálnost, rychlost analýzy, možnost automatizace a nízká spotřeba vzorku. Využívá se ve všech oblastech farmaceutické analýzy při stanovení čistoty, obsahu a při stanovení totožnosti. Dalšími oblastmi využití je například analýza přírodních látek v rostlinném materiálu, analýza léčiv v biologickém materiálu, kontrola a jištění kvality léčiv, či bioekvivalenční studie. [9, 10, 11]

### **2.2.1 Princip HPLC**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je fyzikálně-chemická metoda využívající k rozdělení směsi látek. Princip separace je založen na rozdílné afinitě analytu k pohyblivé (mobilní) a nepohyblivé (stacionární) fázi. Vzorek je nastříkáván do proudu mobilní fáze a unášen na kolonu naplněnou stacionární fází pomocí vysokotlakého čerpadla. Analyt pak se stacionární fází interaguje. Čím silnější je interakce, tím déle se analyt zdržuje na koloně a tím později je z kolony vymyt. K separaci složek směsi dochází tehdy, když se interakce jednotlivých složek se stacionární fází liší, a tím pádem jsou eluovány v různých časech. Po průchodu kolonou je analyt detekován a na chromatogramu se tento signál projeví v podobě tzv. píku. Plocha a výška tohoto píku je závislá na koncentraci analytu. [10, 11]

## 2.2.2 Základní komponenty HPLC



Obrázek 4: Základní schéma HPLC. [12]

K základním komponentům HPLC soustavy patří zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, odplyňovač (degasser), dávkovač, kolona a detektor. Mobilní fáze je čerpadlem pod vysokým tlakem přiváděna přes filtr do celého systému. V odplyňovači dochází k jejímu odplynění a následně v dávkovači je do jejího proudu vpraven vzorek. Zpravidla je vzorek v termostatovaném autosampleru, který dávkuje předem nastavený objem roztoku umístěného ve vialkách, popř. inzertech. Na chromatografické koloně upevněné v termostatovaném kolonovém prostoru dochází k vlastní separaci analytů. K detekci jednotlivých analytů dochází v detektoru, který je spojený s počítačovým softwarem ovládajícím celý systém a zároveň zaznamenávajícím celou analýzu. [13, 14, 15]

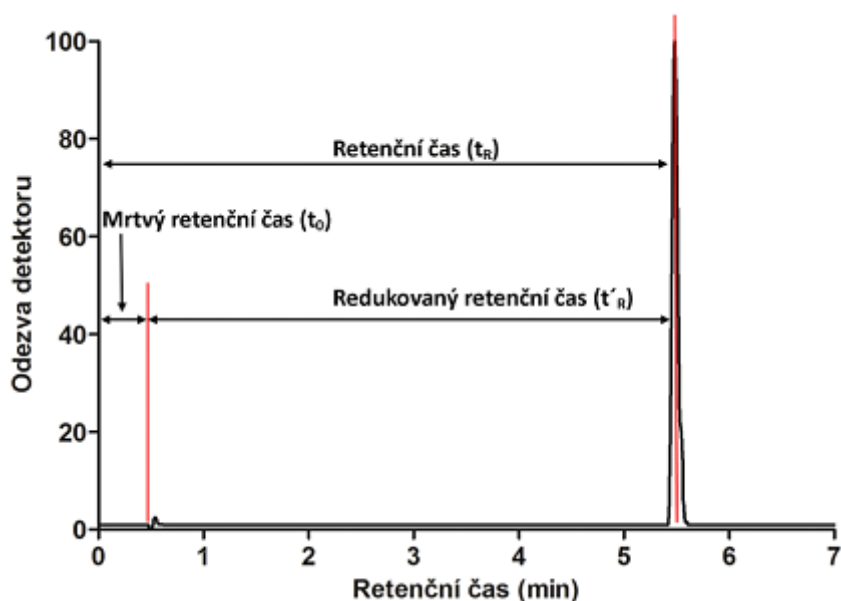
## 2.2.3 Charakteristiky analýzy

Výstupem analýzy je chromatografický záznam, tzv. chromatogram. Na něm se nachází píky reprezentující analyzované látky. K identifikaci jednotlivých analytů slouží kvalitativní analýza, k zjištění obsahu využíváme analýzu kvantitativní.

### 2.2.3.1 Kvalitativní analýza

Retenční čas ( $t_R$ ) je základní kvalitativní charakteristikou analytu. Udává vzdálenost od bodu nástřiku vzorku až po dosažení maximální výšky píku a vyjadřuje se v jednotkách času. Jeho výhodou je, že je snadno měřitelný a univerzální, nevýhodou je jeho závislost na průtoku mobilní fáze. Retenční čas analytu, který neinteraguje se stacionární fází, není na ní tudíž zadržován a je pouze unášen mobilní fází, se označuje jako mrtvý retenční čas ( $t_0$ ). Skutečnou

dobu interakce analytu vyjadřuje redukovaný retenční čas ( $t'_R$ ), který vypočítáme odečtením mrtvého retenčního času od retenčního času analytu. [9, 16, 14]



Obrázek 5: Retenční časy. [16]

### 2.2.3.2 Kvantitativní analýza

Při kvantitativní analýze dochází k porovnání odezvy referenčního standardu a analyzované látky. Oba musí být ve stejné matici a musí být připraveny stejným způsobem. Základním porovnávacím parametrem je plocha píku, resp. jeho výška.

#### Metoda vnějšího standardu

Nejjednodušší metoda k vyhodnocení koncentrace analytu je metoda vnějšího standardu. Výpočet vychází z předpokladu, že plocha píku je přímo úměrná koncentraci analytu jak u referenčního standardu, tak i u analyzované látky.

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

$A_{ST}$ ,  $A_{VZ}$  – plocha píku referenčního standardu, resp. stanovovaného vzorku  
 $c_{ST}$ ,  $c_{VZ}$  – koncentrace referenčního standardu, resp. stanovovaného vzorku

Koncentraci vzorku pak lze z výše uvedeného vztahu vyjádřit následovně: [9, 16]

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

## Metoda vnitřního standardu

Princip této metody spočívá v přidání standardní látky, tzv. vnitřního standardu (internal standard, IS) ve stejném množství ke vzorku i k referenčnímu standardu. Požadavky na vnitřní standard zahrnují:

- Strukturní podobnost se stanovovanou látkou
- Eluce v blízkosti hodnocených píků
- Dostatečná separace od stanovovaného analytu
- Dostatečná stabilita a čistota
- Podobná koncentrace jako stanovované látky
- Nesmí být složkou vzorku

Použití této metody je vhodné obzvláště v případech, kdy je před samotnou HPLC analýzou prováděna složitější úprava vzorku. Tento krok je nejnáchylnější k chybě, což by mohlo vést k nepřesnosti stanovení. Pokud ovšem ke vzorku i standardu přidáme stejné množství IS, bude poměr ploch stanovovaného analytu a vnitřního standardu vždy zachován. Výpočet koncentrace se provádí obdobně jako v případě metody vnějšího standardu s dosazením poměru ploch vzorku a vnitřního standardu:

$$c_{VZ} = \frac{\left(\frac{A_{VZ}}{A_{IS}}\right)}{\left(\frac{A_{ST}}{A_{IS}}\right)} c_{ST}$$

$A_{IS}$  – plocha vnitřního standardu [9, 14, 16, 17]

## Metoda normalizace

V tomto případě se obsah stanovované látky vyjádří jako procentuální podíl z ploch všech píků v chromatogramu. Zanedbávají se píky rozpouštědel a jiných přidaných činidel a píky pod limitem zanedbatelnosti. Koncentraci v % lze poté vypočítat tímto způsobem:

$$c_{VZ} [\%] = \frac{A_{VZ}}{A_{VZ} + A_{x1} + A_{x2} + \dots + A_{xi}} \cdot 100$$

$A_{xi}$  *atd.* – plochy ostatních píků na chromatogramu [16, 17]

## **Kalibrační metoda**

Kalibrační metoda vychází ze závislosti odezvy na koncentraci analytu, ze které se vypočítá kalibrační funkce. Nejprve se připraví série vzorků v daném koncentračním rozmezí a na základě výsledků analýzy se sestrojí graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci látky. Tomuto grafu se říká kalibrační křivka. Z její rovnice se pak vypočítá koncentrace analytu. Tímto způsobem lze hodnotit analýzu provedenou jak metodou vnějšího, tak i vnitřního standardu. [16, 17]

### **2.2.4 Stacionární fáze**

Chromatografická kolona, základní součást HPLC sestavy, bývá tvořena kovovou či plastovou trubicí o délce 50 až 300 mm a průměru 2 až 5 mm, v níž je ukotvena náplň. Náplň chromatografické kolony je stacionární fáze. Je to nepohyblivá část chromatografického systému, na níž dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Částice stacionární fáze jsou zpravidla veliké 3–10  $\mu\text{m}$ .

Stacionární fáze by měly splňovat obecné požadavky, ke kterým patří například chemická a tepelná stabilita. Dále nesmí reagovat s mobilní fází ani se v ní rozpouštět. Nesmí ani docházet k jejímu vymývání z kolony, k čemuž by mohlo dojít v důsledku použití nesprávné mobilní fáze či působením vysoké teploty. Vymývání by mohlo vést ke snížení citlivosti detekce či změně vlastností stacionární fáze.

Kolony můžeme dělit dle jejich polarity na polární, nepolární a amfoterní. Dále se dají dělit podle chemického složení na:

- Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu
- Anorganické oxidy (silikagel, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, oxid titaničitý)
- Polymerní
- Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku
- Hybridní [18, 14, 15]

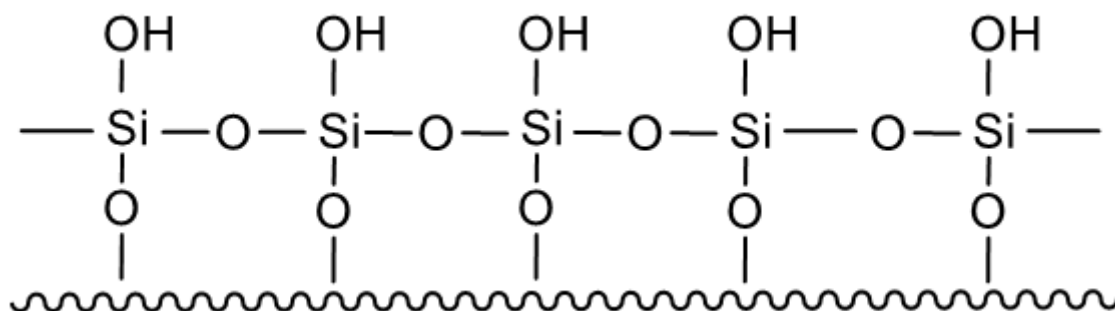
#### **2.2.4.1 Silikagel**

Silikagel je nejčastěji používaný polární anorganický sorbent. K jeho výhodným vlastnostem patří především jeho dobrá mechanická odolnost při vysokých tlacích používaných v HPLC. S organickými rozpouštědly se nesráží, ani nebobtná, lze ho tedy v jejich přítomnosti bez problémů použít. Nevýhodou běžného silikagelu je nízká stabilita při pH vyšších než 8.

V současnosti jsou však dostupné hybridní silikagelové kolony, které jsou stabilní i při vyšších pH mobilní fáze.

Pro použití při HPLC se využívá silikagel s vysokým specifickým povrchem (5–500 m<sup>2</sup>/g), velkým objemem pórů (0,7 ml/g) se středním průměrem 8–15 nm. S rostoucím průměrem pórů klesá specifický povrch adsorbentu a tím pádem klesá i retence analytů.

Jeho povrch je pokrytý silanolovými skupinami Si-OH, které se dají snadno modifikovat. Díky jejich přítomnosti je silikagel mírně kyselý. Z tohoto důvodu více zadržuje bazické látky a může tím způsobovat jejich chvostování. Tomu lze zabránit přidáním slabé organické báze (např. triethylaminu) do mobilní fáze, musíme ovšem dbát na to, aby pH mobilní fáze nepřesáhlo hodnotu 8, protože poté se silikagel začne rozpouštět. Díky své kyselosti může silikagel vystupovat také jako iontoměnič.



Obrázek 6: Silanolové skupiny na povrchu silikagelu. [18]

Je vhodný k využití při chromatografii na normálních fázích a HILIC, po navázání ligandů se využívá při chromatografických separacích na reverzních fázích.

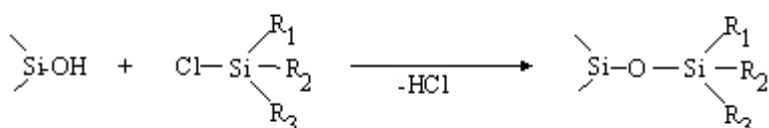
Výroba silikagelu může probíhat dvěma postupy. Prvním z nich je Sil-gel, kdy je silikagel připravován gelací roztoků křemičitanů. Sil-gel je víc pórovitý a póry mají nepravidelný tvar. Sol-gel, druhý způsob výroby, je připravován shlukováním částic solu oxidu křemičitého při pyrolýze organokřemičitých látek. Má menší pórovitost a póry jsou pravidelněji uspořádané. Sol-gel je zpravidla více mechanicky stabilní než sil-gel, a v alkalickém prostředí se rozpouští pomaleji. Proto je vhodnější k přípravě kolon stabilnějších při vyšších hodnotách pH. V tomto případě hovoříme o silikagelu typu A. Silikagel typu B se připravuje z organického solu a obsahuje malé množství kovů, což vede k vyšší čistotě silikagelu a dochází pak ke zlepšení tvaru píku, rozlišení a separační účinnosti. Silikagel typu C, tzv. hydrosilovaný silikagel, má z povrchu odstraněno 90–95 % silanolových skupin, které jsou nahrazeny skupinami Si-H.



Polarita jeho povrchu je nižší, teplotní stabilita je vyšší a je stabilnější v širokém rozsahu pH. [14, 15, 18, 19]

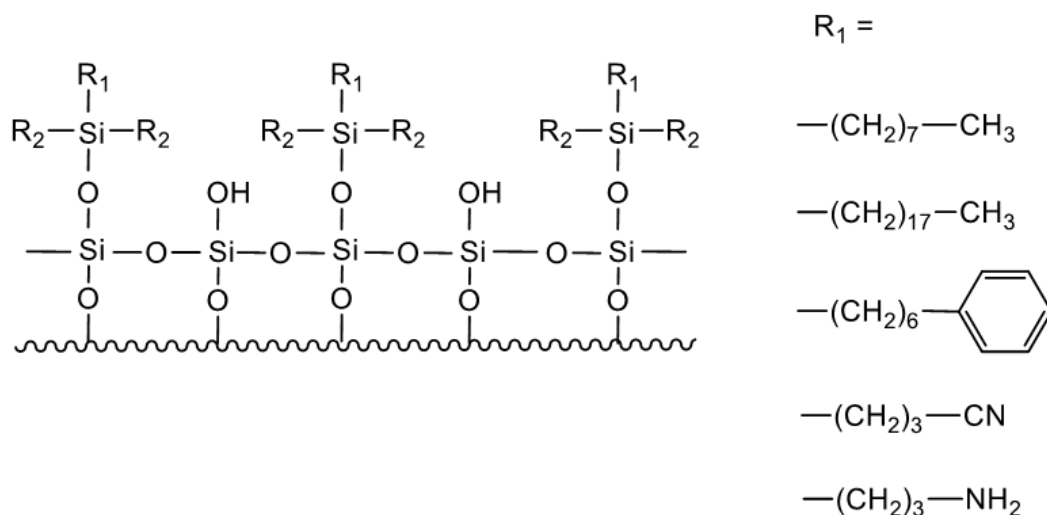
#### 2.2.4.2 Chemické modifikace silikagelu

V současnosti nejrozšířenějším typem sorbentu je reverzní fáze na bázi silikagelu. V tomto případě jsou silanolové skupiny silikagelu modifikovány vhodnou chemickou reakcí s organickými činidly. V dnešní době se k modifikaci používají alkylchlorsilany.



Obrázek 7: Modifikace silanolové skupiny. [15]

Příkladem velmi často užívaných nepolárních fází můžeme uvést fáze s navázanými alkylovými řetězci různé délky (C<sub>2</sub> – C<sub>30</sub>). Díky kovalentně vázanému uhlíkatému řetězci je vzniklá stacionární fáze hydrofobní. Nejrozšířenější stacionární fází je chemicky vázaný alkyl C<sub>18</sub> (oktadecylsilikagel, ODS), dále se hojně využívá C<sub>8</sub> a fenylové a alkylfenylové fáze. Tyto stacionární fáze jsou univerzálně použitelné jak pro polární, tak pro nepolární analyty. Střední polaritu vykazují nitrilové a aminové fáze (např. propylkyanová či propylaminová), které se dají použít pro separaci na normálních fázích, reverzních fázích i v módu HILIC. [14, 15, 18]



Obrázek 8: Příklady využívaných substituentů. [18]

#### **2.2.4.3 Kolony s pevným jádrem**

Technologii s pevným jádrem a porézním povrchem představují například kolony Kinetex™. Při výrobě dochází pomocí koloidních roztoků a uspořádání nanočástic k tvorbě homogenního porézního obalu na pevném jádře silikagelu. K separaci dochází v porézní vrstvě. Výhodou oproti klasickým silikagelovým kolonám je nižší protitlak, vyšší rozlišení, rychlost analýzy, citlivost a životnost. Díky nízkému protitlaku se dají kolony o velikosti částic 2,6 µm nebo 1,7 µm využít i při UHPLC. [20]

#### **2.2.4.4 Oxidy kovů**

Stacionární fáze na bázi oxidů kovů se začaly používat z důvodu nedostatečné chemické odolnosti silikagelu při vyšších hodnotách pH. V HPLC se využívá zejména oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý. Tyto oxidy vykazují vysokou stabilitu i v silně alkalickém prostředí a vysokých teplotách. Jejich účinnost je srovnatelná s účinností silikagelových kolon. Jejich povrch se dá také modifikovat, a to například tenkou vrstvou polybutadienu nebo polystyrenu. [18, 15]

#### **2.2.4.5 Polymery**

Oproti silikagelu jsou polymerní stacionární fáze stabilnější v širším rozmezí pH. Používá se zesíťovaný polystyren, substituované polyvinylalkoholy a methakryláty. Nevýhodou je nižší účinnost separace a riziko objemové změny polymeru při použití některých organických rozpouštědel. [18]

### **2.2.5 Detektory**

V detektoru dochází k vlastní detekci analyzovaných látek. Volba detektoru v HPLC analýze je velmi důležitá. K vlastnostem ideálního detektoru patří:

- Schopnost poskytnout informace o kvalitě analytu
- Schopnost poskytnout citlivou a reprodukovatelnou odezvu, na kterou nemá vliv teplota, průtok ani složení mobilní fáze
- Široký rozsah koncentrací, při kterém je odezva úměrná koncentraci analytu
- Nízký příspěvek k mimokolonovému objemu systému

Detektory mohou být univerzální či selektivní. Univerzální detektory lze použít k analýze takřka všech látek. Selektivní detektory jsou uzpůsobeny tak, aby detekovaly pouze požadované analyty s ohledem na jejich vlastnosti. [14, 15, 21]

### 2.2.5.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrická detekce je založena na schopnosti látek absorbovat záření v UV (200–400 nm) či viditelné (400–800 nm) oblasti spektra. Tyto detektory vykazují poměrně vysokou citlivost a robustnost odezvy pro všechny molekuly obsahující ve své molekule chromofor. Při vyhodnocování v kvantitativní analýze se využívá Lambert Beerův zákon, kdy je odezva detektoru přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

*A – absorbance,  $\varepsilon$  – molární absorpční koeficient, c = koncentrace analytu, l – tloušťka absorbující vrstvy*

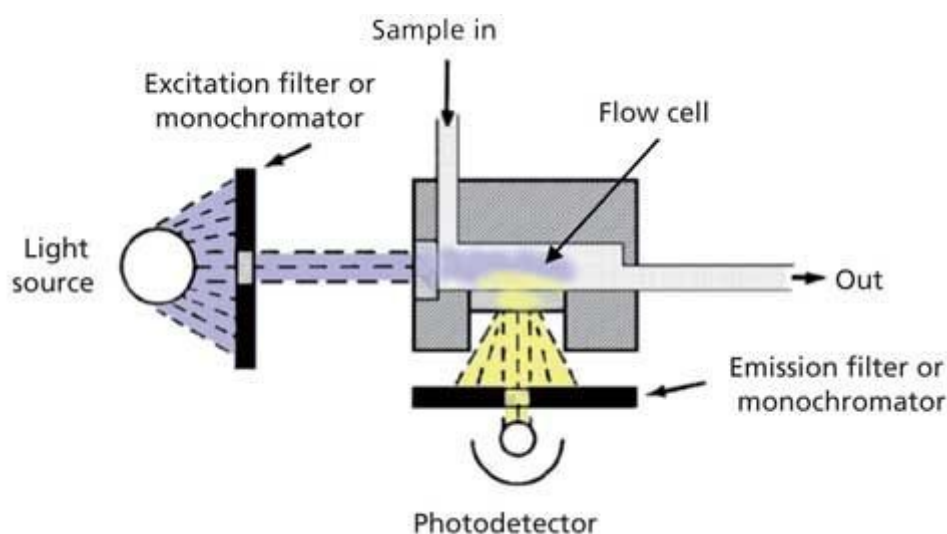
Pro UV oblast bývá zdrojem záření zpravidla deuteriová lampa, pro oblast viditelnou se využívá lampa wolframová. Monochromátor pak zajišťuje monochromatické záření vybrané vlnové délky. Spektrofotometrické detektory rozdělujeme dle jejich konstrukčního uspořádání na čtyři typy:

- **Detektory s fixní vlnovou délkou** – nejstarší a nejjednodušší typ spektrofotometrického detektoru, zdrojem záření je rtuťová výbojka a detekuje při vlnové délce 254 nm. V současné době se již při HPLC téměř nevyužívají.
- **Detektory s proměnnou vlnovou délkou** – nejčastěji využívaný typ, umožňuje nastavit vhodnou vlnovou délku tak, aby byla dosažena co nejlepší selektivita a citlivost
- **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou** – umožňují měnit vlnovou délku i v průběhu analýzy, jednotlivé píky tak mohou být detekovány při rozdílných vlnových délkách
- **Detektory s diodovým polem** (diode array detector, DAD) – je tvořen polem fotodiód, v průběhu analýzy snímá celé spektrum v nastaveném rozmezí. Umožňují vybrat nejvhodnější vlnovou délku pro detekci každého z analytů, popřípadě i získat jejich UV spektrum.

Mezi hlavní výhody spektrofotometrických detektorů patří snadná obsluha, široký dynamický lineární rozsah, dostatečně vysoká citlivost pro analyty obsahující ve své molekule chromofor, robustnost a nízká citlivost odezvy na změny mobilní fáze nebo teploty. [14, 15, 21]

### 2.2.5.2 Fluorescenční detektory

Fluorescenční nebo také fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence analytu a následném změření sekundárního záření. Vykazují vyšší citlivost i selektivitu než spektrofotometrické detektory. Látka nejprve absorbuje primární (excitační) záření, čímž její molekuly přejdou ze základního vibračního stavu do excitovaného elektronového stavu. Absorbovanou energii molekula vyzáří zpět jako fluorescenci. Po ztrátě energie přechází molekula zpět do základního vibračního stavu a vyzářuje sekundární (emisní) záření. Toto emisní záření má vyšší vlnovou délku než záření excitační. Doba trvání fluorescence bývá  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekundy. Zdrojem excitačního záření obvykle bývá xenonová výbojka. Pro excitační záření je zpravidla používána vlnová délka maxima absorpance analyzované látky v UV oblasti. Podobně jako u UV/VIS detektorů se pro výběr nastavení vlnové délky využívá monochromátor, který propouští záření jen určité vlnové délky. U moderních fluorescenčních detektorů lze vlnové délky měnit i v průběhu analýzy, aby bylo dosaženo maximální citlivosti pro všechny analyzované látky. Po průchodu vzorkem je fluorescence rozptýlena druhým monochromátorem a detekována fotonásobičem. Emisní záření je měřeno pod úhlem  $90^\circ$ , čímž se eliminuje efekt matrice.



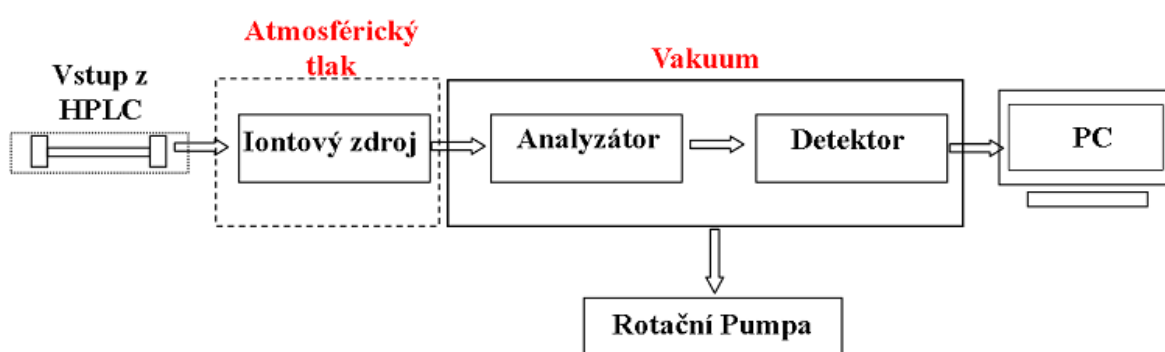
Obrázek 9: Schéma fluorescenčního detektoru. [22]

Mezi výhody fluorescenčního detektoru patří vysoká citlivost a selektivita, robustnost i snadná obsluha. Hlavní nevýhodou je omezené množství analytů, které vykazují fluorescenci a mohou být takto detekovány. Fluorescenci lze očekávat u aromatických a heteroaromatických sloučenin, podmínkou je systém konjugovaných vazeb. Tento problém však může být u řady

molekul vyřešen derivatizací molekuly, ke které může dojít buď před vstupem na kolonu, nebo po výstupu z ní. [14, 21]

### 2.2.5.3 Hmotnostně spektrometrické detektory (MS detektory)

Tato detekce je založena na převedení molekul na ionty a jejich následném rozdělení podle poměru náboje a hmotnosti ( $m/z$ ). Výstupem je hmotnostní spektrum, jenž vyjadřuje závislost relativní intenzity jednotlivých iontů na jejich  $m/z$ . Je to vysoce citlivá metoda, která navíc poskytuje i spektrální údaje o identitě analyzované látky. Spojení LC-MS je nejčastěji využívanou metodou v bioanalýze léčiv.



Obrázek 10: Základní schéma hmotnostního spektrometru. [23]

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí:

- Iontový zdroj – slouží k ionizaci analyzované látky
- Analyzátor – rozděluje látky dle jejich  $m/z$  za vysokého vakua
- Detektor – detekuje ionty a zesiluje signál za vysokého vakua

### Ionizační techniky

Ionizační technika je obvykle vybírána podle molekulové hmotnosti analytu a jeho polarity. V současnosti je využívána především ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), méně často fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

### Analyzátoary

K separaci iontů vytvořených v iontovém zdroji dochází v analyzátoru, a to podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Základními analyzátoary jsou kvadrupól (Q), iontová past (IT) a analyzátor doby letu (TOF).

## **Detekce iontů**

Jako detektory iontů jsou nejčastěji využívány elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec.

Výhodou MS detektorů je jejich vysoká citlivost a selektivita a možnost získat informace i o struktuře látky, nevýhodou je vysoká cena a náročnost na obsluhu. [14, 23, 24]

### ***2.2.5.4 Elektrochemické detektory***

Elektrochemické detektory se dají využít v analýze látek obsahujících ve své molekule skupinu schopnou oxidace nebo redukce. V průtokové cele detektoru jsou umístěny elektrody měřící elektrické veličiny (elektrodotový potenciál, proud, kapacita), jejichž změny jsou vyvolány průchodem analytu. Naměřený elektrický signál je úměrný látkovému množství analyzované látky. Podle sledovaných veličin rozlišujeme detektory ampérometrické (měří proud) a coulometrické (měří náboj potřebný k celkové oxidaci/redukci analytu). K využívaným elektrodám patří uhlíková, stříbrná, zlatá, nebo platinová. Výhodou elektrochemických detektorů jsou poměrně vysoká citlivost i selektivita, nevýhodou je špatná robustnost, protože jsou velmi citlivé na přítomnost i malého množství nečistot v mobilní fázi. [21, 14, 15]

### ***2.2.5.5 Vodivostní detektory***

Měří vodivost analyzované látky v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí. Předpokladem pro vodivostní detekci je nevodivost mobilní fáze. Uplatnění nachází v iontové chromatografii. [14, 15]

### ***2.2.5.6 Refraktometrické detektory***

Tyto univerzální detektory pracují na principu měření rozdílu indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analyzovanou látkou. Nevýhodou je nízká citlivost, závislost odezvy na teplotě a složení mobilní fáze a nemožnost využití při gradientové eluci. [21, 14]

### ***2.2.5.7 Evaporative light scattering detector (ELSD)***

Je založen na měření rozptylu světla. Mobilní fáze je odpařena proudem dusíku a měří se rozptyl světla na částicích netěkavých analytů. Odezva je úměrná množství analytu. Výhodou ELSD je univerzálnost, odolnost vůči kolísání teploty a možnost využití při gradientové eluci. Využívá se například pro detekci fosfolipidů. [21, 15]

### ***2.2.5.8 Corona discharge detector (CAD)***

Corona discharge detektor nebo také aerosolový detektor nabitých částic detekuje kladně nabitě částice. Mobilní fáze je v odpařovací komůrce odpařena a analyt v plynné fázi je smísen

s dusíkem, který se na hrotu elektrody kladně nabíjí a náboj následně přenesse na analyt. Kladně nabitě částice pak putují do kolektoru, kde odevzdávají svůj náboj za vzniku proudu. Výhodou je vysoká citlivost a široký lineárně dynamický rozsah. [21, 15, 10]

## **2.2.6 Separační módy**

V HPLC se využívá několik separačních módů, navzájem se odlišujících charakterem mobilní a stacionární fáze. K základním separačním módům v HPLC se řadí chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC), chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), iontově výměnná chromatografie (IEC), size-exclusion chromatografie (SEC) a chirální chromatografie. [18]

### **2.2.6.1 Chromatografie na normálních fázích**

V tomto případě se pro separaci používá polární stacionární fáze a méně polární mobilní fáze. Stacionární fázi je nejčastěji čistý silikagel či modifikovaný silikagel s navázanými polárními funkčními skupinami (např. kyano, amino, diol), popř. oxid hlinitý. Mobilní fáze je tvořena nevodnou směsí organických nepolárních rozpouštědel, jako je hexan, dichlormetan, nebo chloroform. Mechanismem retence na normálních fázích jsou polární interakce. Čím polárnější je analyt, tím více bude zadržován na koloně. Se zvyšující se polaritou mobilní fáze bude docházet k rychlejšímu vymývání analytů z kolony. Chromatografie na normálních fázích se uplatňuje v analýze polárních látek, vysoce hydrofobních látek, tuků, sacharidů a izomerů. V současnosti se ovšem využívá velmi omezeně. [14, 18]

### **2.2.6.2 Chromatografie na reverzních fázích**

U systémů s reverzními fázemi se využívá polární mobilní fáze a málo polární až nepolární stacionární fáze. Stacionární fáze je ve většině případů tvořena modifikovaným silikagelem s navázanými nepolárními funkčními skupinami (např. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, fenylyl) a polární mobilní fázi představuje obvykle směs vodné složky se složkou organickou. Používaná organická rozpouštědla jsou například acetonitril, methanol, ethanol nebo tetrahydrofuran. Vodná složka je obvykle tvořena roztokem pufru (např. fosforečnanového) modifikující pH mobilní fáze, anebo vodným roztokem kyseliny či zásady. Důležitou podmínkou přípravy mobilní fáze je mísitelnost jednotlivých složek. Mechanismem retence jsou hydrofobní interakce (zejména van der Waalovy síly) a pořadí retence analytů je opačné, než u systému s normálními fázemi – méně polární analyty budou na stacionární fázi zadržovány více. Změnou pH mobilní fáze lze dosáhnout potlačení ionizace funkční skupiny analytu, tím pádem se sníží jeho polarita a zvýší

se jeho retence. V současné době je chromatografie na reverzních fázích nejpoužívanější technikou. [14, 18]

#### **2.2.6.3 Hydrofilní interakční chromatografie**

Hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) představuje jakousi alternativu k systému na normálních fázích. Jako stacionární fáze se může použít čistý silikagel, silikagel modifikovaný aminopropylovou skupinou či zwitteriontem (např. sulfobetain). Mobilní fázi tvoří acetonitril a 5–40% vodný roztok pufru. Za těchto podmínek se při povrchu stacionární fáze vytvoří tenká vrstva vody, se kterou analyty interagují. Mechanismus retence je komplexní, kromě rozdělování analytu mezi vrstvu vody a mobilní fázi se uplatňují i iontové a hydrofobní interakce. Retence stoupá se zvyšující se polaritou stacionární fáze či analytu. HILIC se využívá při analýze polárních látek, sacharidů, aminokyselin či peptidů. [15, 14, 25]

#### **2.2.6.4 Iontově výměnná chromatografie**

Iontově výměnná chromatografie nebo také chromatografie na iontoměničích je založena na silných elektrostatických silách mezi ionizovanými funkčními skupinami iontoměniče (ionex, který představuje stacionární fázi) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku (mobilní fázi). Stacionární fáze s kyselou funkční skupinou (např. sulfo, karboxyl) se nazývá katex, má záporný náboj a zadržují se na ní kladně nabité kationty analytu. Anex označuje stacionární fázi obsahující bazickou funkční skupinu (např. amino), vykazuje kladný náboj a zadržují se na ní záporně nabitě anionty analytu. V mobilní fázi jsou přítomny tzv. protiionty, jež soutěží s ionty analytu o opačně nabitě funkční skupiny ionexů. Ionty s větším nábojem jsou zadržovány silněji. Retence a selektivita analytu závisí na pH a iontové síle mobilní fáze. Iontově výměnná chromatografie se uplatňuje především při analýze malých anorganických iontů, slabých organických kyselin a zásad, nukleotidů a nukleových kyselin, aminokyselin, peptidů a proteinů. [14, 18, 26]

#### **2.2.6.5 Size-exclusion chromatografie**

Size-exclusion chromatografie (SEC) nebo také gelová permeační chromatografie (GPC) je založena na principu rozdělování látek podle jejich molekulové hmotnosti. Stacionární fázi tvoří přírodní nebo syntetický gel (např. dextranový Sephadex, kopolymery styren-divinylbenzenového typu, methakrylátový kopolymer s ethylenglykolem) umístěný ve svislé koloně. Uvnitř gelu se nachází póry. Mobilní fáze protéká konstantní rychlostí kolonou a molekuly analytů různou měrou pronikají do pórů. Molekuly větší než póry do nich nepronikají a nejsou nijak zadržovány, proto procházejí kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze a



kolonu opouští jako první. Dochází tak k stérickému vyloučení (exclusion) velkých molekul. Menší molekuly pronikají do pórů (tomuto jevu se říká permeace). Tím pádem jsou na koloně zadržovány a jejich retenční časy jsou vyšší. Píky v chromatogramu jsou tak seřazeny od největších molekul po ty nejmenší. Rozdělování molekul vyjadřuje rozdělovací koeficient  $K_D$ . Velké molekuly mají  $K_D$  blízké 0, malé mají naopak  $K_D$  blízké 1.

$$K_D = \frac{(V_e - V_0)}{V_S}$$

$K_D$  – rozdělovací koeficient,  $V_e$  – eluční objem,  $V_0$  – objem mobilní fáze,  $V_S$  – objem kapaliny uvnitř pórů

Své uplatnění má gelová permeační chromatografie hlavně v biochemii. Využívá se především pro separaci polymerů, jako jsou proteiny. Příkladem je odsolování bílkovin či polysacharidů nebo oddělování enzymu a koenzymu. [26, 27]

#### **2.2.6.6 Chirální chromatografie**

Stereoizomery jsou molekuly se stejným sumárním vzorcem, lišící se svou konfigurací (prostorovým uspořádáním), a tím pádem chováním v chirálním prostředí, jako je třeba lidské tělo. Výrazně se mohou lišit svými účinky, jeden z izomerů může být třeba neúčinný, mít více nežádoucích účinků, nebo být dokonce toxický. Z tohoto důvodu vznikla potřeba všechny izomerní formy separovat a následně samostatně kvalitativně i kvantitativně hodnotit. Tyto látky nelze separovat za klasických podmínek, nýbrž za podmínek chirální chromatografie. Pro separaci dvou optických izomerů se v současnosti využívají dva způsoby:

- Nepřímá separace – enantiomery jsou derivatizovány opticky aktivním činidlem, což vede ke vzniku diastereoizomerů, které se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a proto už je lze separovat klasickým způsobem (zpravidla RP-HPLC).
- Přímá separace – podstatou je vznik chirálního prostředí v chromatografickém systému, a to buď přidavkem opticky aktivního činidla (tzv. chirálního selektoru) do mobilní fáze, anebo použitím chirální stacionární fáze (CSP).

I přes svou vyšší cenu se nejvíce využívá chirálních stacionárních fází. V tomto případě je vlastně chirální selektor kovalentně navázán na achirálním nosiči (nejč. silikagel). Enantiomer pak s CSP interaguje a na krátkou chvíli vznikají diastereoizomerní komplexy. K používaným chirálním stacionárním fázím patří:

- Makrocyclická antibiotika – např. teikoplanin, vankomycin

- Cyklodextriny – cyklické oligosacharidy obsahující 6, 7, nebo 8 glukózových jednotek, vznikají hydrolýzou škrobu
- Polysacharidy – deriváty amylozy či celulózy
- Glykoproteiny/proteiny – např. albumin,  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein
- Pirklovy fáze (donor-akceptorové CSP) – principem je vznik koordinačních komplexů
- Crown-ethery – makrocyclické polyethery obsahující ethylenoxidový můstek. [18, 15, 28]

## ***2.3 Validace metody v HPLC***

Vyvíjená analytická metoda musí být v rámci QC validována. Smyslem validace je prokázat, že daná metoda je vhodná pro zamýšlené použití, a tudíž povede k získávání relevantních dat. Validace se provádí při vývoji nové metody, v případě změny již validované metody, při přenosu metody do jiné laboratoře, nebo při prokazování rovnocennosti dvou metod. Pro správné provedení validace je důležitý výběr validačních parametrů, které musí daná metoda splňovat. Parametry vychází z požadavků různých autorit, zákazníka, či zadavatele. [9, 17, 29]

### **2.3.1 Parametry**

Nejrozšířenější směrnici ve farmaceutické analýze je směrnice Mezinárodní konference pro harmonizaci ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Dalšími jsou „Guideline on Bioanalytical Method Validation“ od Evropské lékové agentury (European Medicines Agency, EMA) a „Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation“ od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA). Ty jsou přísnější, rozsáhlejší, více časově náročné a mají více požadavků. Používají se především pro validaci bioanalytických metod. Doporučované limity jednotlivých parametrů jsou uvedeny v Tab. 1. [17, 29, 30]

**Tabulka 1: Validací parametry požadované jednotlivými autoritami. [30]**

<i>Parametr</i>	<i>ICH</i>	<i>FDA</i>	<i>FDA: limity</i>	<i>EMA</i>	<i>EMA: limity</i>
<i>Selektivita</i>	√	6	Bez interference	6	Bez interference
<i>Přenosy analytu</i>	×	×	×	√	< 20 % LLOQ
<i>LOQ</i>	LOQ	LLOQ, ULOQ	± 20 %	LLOQ, ULOQ	± 20 %, ≤ 20 %
<i>LOD</i>	LOD	×	×	×	×
<i>Linearita</i>	5	6-8	± 15 %, LLOQ 20 %	6*	± 15 %, LLOQ 20 %
<i>Rozmezí</i>	√	×	×	√	LLOQ/ULOQ
<i>Přesnost [%]</i>	3 x 3	3 x 5	± 15 %, LLOQ 20 %	4 x 5	± 15 %, LLOQ 20 %
<i>Preciznost [% RSD]</i>	3 x 3	3 x 5	≤ 15 %, LLOQ ≤ 20 %	4 x 5	≤ 15 %, LLOQ ≤ 20 %
<i>Výtěžnost [%]</i>	×	3	-	×	×
<i>Matricové efekty [%]</i>	×	×	×	6	< 15 %
<i>Robustnost</i>	√	×	×	×	×
<i>Stabilita</i>	×	√	***	√	***
<i>SST</i>	√	×	×	×	×

√ = požadovaný parametr, × = nepožadovaný parametr

LLOQ = spodní mez stanovitelnosti, ULOQ = horní mez stanovitelnosti

\* analýza je provedena v několika opakováních, \*\* přesnost je dále rozdělena na opakovatelnost, mezilehlou přesnost a reprodukovatelnost, \*\*\* je požadována velmi rozsáhlá stabilitní studie

3 x 3 – měření 3 vzorků na třech koncentračních hladinách

3 x 5 – měření 5 vzorků na třech koncentračních hladinách (obdobně 4 x 5 na čtyřech koncentračních hladinách)

**Tabulka 2: Validáční parametry podle ICH. [31]**

Parametr	Identifikace (kvalitativní analýza)	Analýza nečistot kvantitativní limitní test	Obsah (kvantitativní analýza)
Přesnost	-	+ -	+
Preciznost			
Opakovatelnost	-	+ -	+
Mezilehlá přesnost	-	+ *	+ *
Selektivita **	+	+ +	+
Mez detekce	-	- ***	+
Mez stanovitelnosti	-	+ -	-
Linearita	-	+ -	+
Rozsah	-	+ -	+

\* provádí-li se reprodukovatelnost, není požadováno \*\* může být prokázána jinou vhodnou metodou \*\*\* pouze v některých případech

### **2.3.1.1 Přesnost metody**

Přesnost (accuracy, můžeme se setkat i se starým českým překladem správnost) analytické metody je definována jako těsnost shody mezi naměřenou koncentrací analytu (result of measurement) a jeho reálnou koncentrací ve vzorku (accepted reference value). Rozdíl mezi těmito hodnotami se nazývá chyba výsledku (error of result). Prakticky se přesnost zjišťuje pomocí 9 vzorků (s přidavkem stanovované látky) na třech koncentračních úrovních, přičemž každá úroveň je analyzována třikrát. Přesnost je obvykle testována v rozmezí 80–120 % deklarovaného obsahu účinné látky. [17]

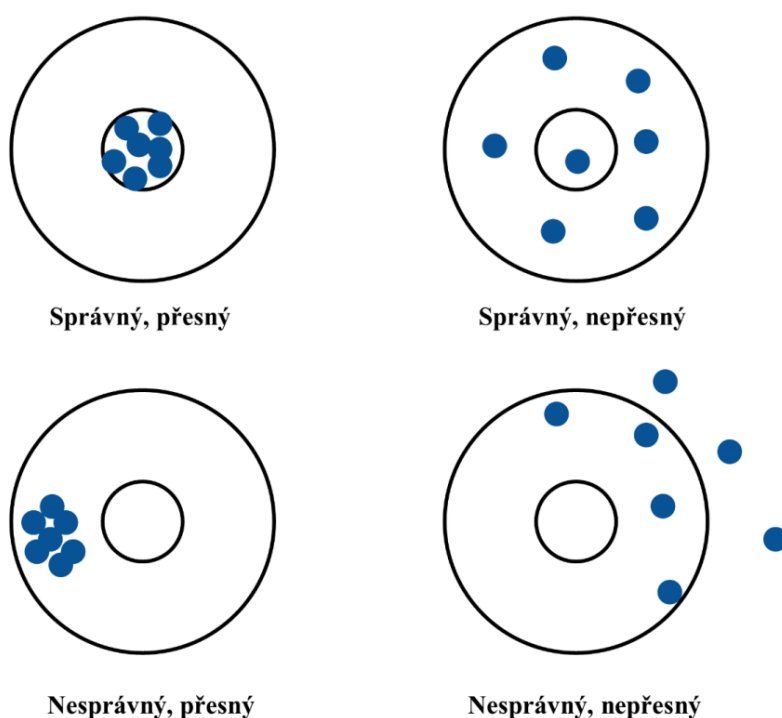
### **2.3.1.2 Preciznost metody**

Preciznost (precision, starší označení přesnost) analytické metody vyjadřuje těsnost shody mezi jednotlivými výsledky analytické metody získané opakovaně s jedním homogenním vzorkem. Podobně jako přesnost se hodnotí na třech koncentračních úrovních, kdy každá z nich obsahuje alespoň tři vzorky. Míra preciznosti se pak vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka. Preciznost může být vyjádřena třemi způsoby – a sice jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

**Opakovatelnost metody** (repeatability) je získávána za podmínek opakovatelnosti, což obvykle znamená jedním pracovníkem na jednom přístroji za použití stejného postupu v krátkém časovém úseku.

**Mezilehlá přesnost** (intermediate precision) je přesnost měření získávaná za podmínek mezilehlé přesnosti měření, které zahrnují stejný postup, stejné místo, stejný nebo podobný objekt měření, ale v širším časovém úseku.

**Reprodukovatelnost metody** (reproducibility) se získává za podmínek reprodukovatelnosti, při kterých je měřen stejný analyt totožnou metodou, avšak v jiné laboratoři. [9, 17, 31]



Obrázek 11: Správnost a přesnost (nyní přesnost a preciznost). [29]

### 2.3.1.3 Linearita a rozsah metody

Linearita (linearity) je schopnost metody poskytnout dostatečnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných je charakterizována jako korelační koeficient ( $R$ ). Čím více se blíží jedné, tím těsnější je závislost. Většinou platí podmínka  $R > 0,9900$ . Prakticky se linearita určuje pomocí 5 kalibračních roztoků na různých koncentračních úrovních pokrývajících celý rozsah metody (obvykle 80–120 %, popř. 50–150 % pro nečistoty) a následným sestavením

kalibrační křivky. Rozsah metody je interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací analytu, ve kterém má analytická metoda prokázanou přijatelnou přesnost, preciznost a linearitu. [17, 31]

#### **2.3.1.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti**

Mez detekce (limit detekce, LOD) odpovídá koncentraci, při které je signál významně odlišný od šumu. Je to nejnižší koncentrace, kterou jsme schopni detekovat.

Mez stanovitelnosti (limit kvantifikace, LOQ) odpovídá nejnižší koncentraci, kterou už můžeme kvantitativně vyhodnotit s patřičnou přesností a správností. LOQ musí být součástí lineárního rozsahu metody, většinou bývá prvním bodem kalibrační křivky. Spodní mez stanovitelnosti (LLOQ) představuje koncentraci, při které je signál významně odlišný od šumu. Horní mez stanovitelnosti (ULOQ) je nejvyšší koncentrace analytu, kterou lze dostatečně přesně a správně vyhodnotit. Bývá posledním bodem kalibrační křivky.

K oběma hodnotám je třeba uvést způsob výpočtu, protože na něm silně závisí. Nejčastějšími způsoby výpočtu LOD a LOQ jsou: poměr signálu a šumu, RSD odezvy a ze směrnice kalibrační přímky, z RSD odezvy blanku nebo z RSD posunutí (úsek na ose y). [17, 31]

#### **2.3.1.5 Selektivita metody**

Jako selektivita metody (method selectivity) se označuje její schopnost poskytnout informace o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti jiných, interferujících látek (matrice, nečistoty, degradační produkty). Selektivitu lze prokázat pomocí analýzy blanku nebo čisté matrice. [17, 31]

#### **2.3.1.6 Robustnost metody**

Robustnost (robustness) je míra schopnosti metody poskytovat shodné výsledky při nepatrně změněných podmínkách – například jiná laboratoř, analytik, přístroj, teplota, koncentrace, či doba extrakce. Žádoucí je co nejrobustnější metoda s co nejmenšími výkyvy při změně podmínek. [17, 24, 31]

## 2.4 Chromatografické podmínky pro separaci podofylotoxinu pomocí kapalinové chromatografie uvedené v literárních zdrojích

Tabulka 3: Chromatografické podmínky pro analýzu podofylotoxinu pomocí kapalinové chromatografie uvedené v literatuře.

<b>Metoda č. 1</b>	
SF	LiChroCARTPurospher Star® RP18-e (50 mm × 4 mm i.d.) (3µm)
MF	A = MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH 14:85:1, B = ACN
Druh analýzy	Gradientová eluce: 0–4 min 20 % B, 8 min 22 % B, 12–16 min 30 % B, 18 min 45 % B
Nástřik	10 µl
Detekce	UV, 290 nm
Doba detekce	22 min
Průtok	0,8 ml/min
Zdroj	32
<b>Metoda č. 2</b>	
SF	Grom-Sil 120 ODS-5ST, 5 µm C18 (250 mm × 4.6 mm i.d.)
MF	A = acetonitril, B = 0,01% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; A:B 40:60 (t = 0; 18; 24); A:B 67:33 (t = 17)
Druh analýzy	Gradientová eluce
Nástřik	20 µl
Detekce	UV, 290 nm
Teplota	25 °C
Průtok	0,8 ml/min (t = 0, 24 min), 1,0 ml/min (t = 17, 18 min)
Zdroj	33
<b>Metoda č. 3</b>	
SF	Diamonsil C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, i.d., 5 µm)
MF	0,1% kyselina fosforečná:methanol (40:60, v/v, pH = 3,2)
Druh analýzy	Isokratická eluce
Nástřik	10 µl
Teplota	20 °C
Detekce	UV, 254 nm



Doba detekce	24 min
Průtok	1,0 ml/min
Zdroj	34
<b>Metoda č. 4</b>	
SF	ODS-A C <sub>18</sub> column, 150 × 4.6 mm, 5 μm
MF	Acetonitril:voda 50:50
Druh analýzy	Isokratická eluce
Nástřík	50 μl
Detekce	Fluorimetrická, λ <sub>ex</sub> = 290 nm, λ <sub>em</sub> = 395 nm (t = 0–4 min); λ <sub>ex</sub> = 336 nm, λ <sub>em</sub> = 453 nm (4–14 min)
Teplota	30 °C
Průtok	1,0 ml/min
Zdroj	35
<b>Metoda č. 5</b>	
SF	ODS-Hypersil, 250 × 5 mm, 5 μm
MF	Methanol:voda 40:60 Methanol: 0,5M octan amonný 40:60 Acetonitril:voda 25:75 Acetonitril:octan amonný 25:75
Druh analýzy	Isokratická eluce
Detekce	UV, 280 nm
Doba detekce	24 min
Průtok	1,5 ml/min
Zdroj	36
<b>Metoda č. 6</b>	
SF	Purospher RP-18, 250 mm × 4.0 mm i.d., 5 μm
MF	A = 0,2% CH <sub>3</sub> COOH, B = MeOH
Druh analýzy	Gradientová eluce: A:B 90:10 → 30:70 (t = 0–40 min), A:B 30:70 → 0:100 (t = 40–50 min), A:B 0:100 (t = 50–60 min)
Teplota	35 °C
Detekce	UV, 280 nm
Průtok	0,8 ml/min
Zdroj	37

### 3. Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout a validovat vhodnou metodu pro analýzu podofylotoxinu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí ve vzorku extraktu z drogy z jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L., var. Blue Arrow) a ve vzorku extraktu z explantátové kultury jalovce virginského. Bylo třeba vybrat vhodnou stacionární fázi, mobilní fázi, dobu extrakce na ultrazvuku, teplotu analýzy, detekci. Následně byly metody pro oba extrakty validovány, sledovanými parametry byla přesnost, preciznost, linearita, selektivita, limit detekce a limit kvantifikace. Metoda pro stanovení podofylotoxinu v extraktu z drogy byla využita pro měření vzorků pro diplomovou práci Jiřího Olšara a zároveň pro měření obsahu dalších dvou druhů – *Juniperus chinensis* Hetzii a *Juniperus sabina* Tamariscifolia.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Chemikálie a pomůcky

#### 4.1.1 Chemikálie

- Podofylotoxin, Sigma Aldrich, Německo
- Methanol for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo
- Acetonitril for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo
- Kyselina octová 99 %, Penta, Česká republika
- Kyselina fosforečná 85 %, Sigma Aldrich, Německo
- Octan amonný, Penta, Česká republika
- Voda čištěná
- Jehličí z jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L., var. Blue Arrow), Botanická zahrada FaF UK
- Explantátová kultura jalovce virginského, katedra farmakognozie, FaF UK

#### 4.1.2 Chromatografická sestava

- Pumpa: LC-30AD Shimadzu
- Degasser: DGU-20A5R Shimadzu
- Kolonový prostor: CTO-20AC Shimadzu
- Autosampler: SIL-30AC Shimadzu
- Řídící jednotka: CBM-20A Shimadzu
- UV/VIS detektor: SPD-20A Shimadzu
- Fluorescenční detektor: RF-10AXL Shimadzu
- PC program: LabSolutions
- Chromatografická kolona
  - LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 250-4, 5  $\mu\text{m}$ , Merck, Německo
  - Hypersil Phenyl, 4,6  $\times$  150 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific, USA
  - Ascentis Express F5, 3,0  $\times$  150 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich, Německo

### 4.1.3 Přístroje

- Analytické váhy: Sartorius AG A200S, Německo
- pH metr: Schott CG 843, Schott Instruments GmBH, Německo
- Ultrazvuková čistička: K10, Kraintek, Slovensko

### 4.1.4 Pomůcky

- Kádinky, zkumavky, laboratorní lžičky, navažovací lodičky, odměrné baňky, odměrné válce, automatické mikropipety a špičky, stříčky, eppendorfské zkumavky, stojan na zkumavky, vialky, inserty, membránový filtr 0,45 a 0,22  $\mu\text{m}$

## 4.2 Obecné postupy

### 4.2.1 Příprava standardu

Bylo naváženo 0,506 mg podofylotoxinu a navážka byla rozpuštěna v odměrné baňce v 10,0 ml methanolu. Tento roztok byl následně naředěn na používané standardní roztoky o koncentraci 10,120  $\mu\text{g/ml}$ , 1,012  $\mu\text{g/ml}$ , 0,506  $\mu\text{g/ml}$  a 0,250  $\mu\text{g/ml}$ . Všechny standardní roztoky byly uchovávány v lednici.

### 4.2.2 Příprava mobilní fáze

Jako organická složka mobilní fáze byl vždy použit acetonitril. Jako vodná složka bylo v průběhu testování zkoušeno několik různých sloučenin – čištěná voda, 0,1% kyselina fosforečná, 0,5M octan amonný a 0,1% kyselina octová. Měnily se také poměry organické a vodné složky v mobilní fázi. Všechny mobilní fáze byly před analýzou přefiltrovány mikrofiltrem 0,45  $\mu\text{m}$  za účelem odstranění pevných nečistot.

- Příprava 0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ : 141  $\mu\text{l}$  85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bylo smícháno se 120 ml čištěné vody za vzniku 0,1% roztoku  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- Příprava 0,5M octanu amonného: 3,854 g octanu amonného ( $M_m = 77,08 \text{ g/mol}$ ) bylo rozpuštěno ve 100,0 ml vody za vzniku 0,5M roztoku.
- Příprava 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ : 202  $\mu\text{l}$  99% kyseliny octové bylo doplněno do 200,0 ml čištěnou vodou za vzniku 0,1% roztoku.

### 4.2.3 Příprava vzorků

EXTRAKT Z DROGY: Pro analýzu bylo použito jehličí z jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L.), poskytnuté katedrou farmakognozie. 10,0 mg usušené a upráškované drogy bylo extrahováno v odměrné baňce v 8,0 ml methanolu na ultrazvukové lázni. Byly testovány různé doby na UZ – 15, 30, 45 a 60 minut. Po vychladnutí byl doplněn methanol do objemu 10,0 ml. Následně bylo 100  $\mu$ l extraktu filtrovaného přes mikrofiltr 0,22  $\mu$ m smíseno s 900  $\mu$ l methanolu a analyzováno.

EXTRAKT Z KULTURY: K analýze byla používána explantátová kultura *Juniperus virginiana* L. kultivována v Schenk a Hildebrandt médiu s přídavkem  $\alpha$ -naftalenoctové kyseliny, kinetinu a kyseliny askorbové, taktéž poskytnuta katedrou farmakognozie. Extrakt z kultury byl dodán již ve vialkách připraven k analýze. Katedrou farmakognozie byl vzorek připraven následovně: 0,3000–0,5000 g upráškované kultury se smísilo v 10 ml odměrné baňce s 10,0 ml methanolu a extrahovalo se 1 hodinu na ultrazvuku při laboratorní teplotě. Po převedení do centrifugační zkušavky se vzorek po dobu 5 minut odstředoval při 4500 otáčkách, poté se převedl do vialek.

### 4.2.4 Příprava roztoků na validaci

Byly připraveny vzorky metodou standardního přídavku na pěti koncentračních hladinách – 50 %, 80 %, 100 %, 120 % a 150 %. Základní připravený vzorek extraktu z drogy (viz 4.2.3) na hladině 100 % odpovídá přídavku 0,625  $\mu$ g podofylotoxinu, což přepočteno na objem odpovídá 63  $\mu$ l roztoku o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Tento objem byl přidán k 1,0 ml základního extraktu z drogy na hladině 100 %. Stejným způsobem byl vypočítán přídavek na ostatních hladinách. Objemy přídavků na ostatních koncentračních hladinách a výsledné koncentrace viz Tab. 7 v kapitole Linearita (5.2.3).

### 4.3 Optimalizace HPLC podmínek

V průběhu analýzy byly testovány různé parametry tak, aby byla vyvinuta co nejvhodnější metoda pro analýzu extraktu z drogy i extraktu z kultury a následně mohla být validována. Mezi rozhodovací kritéria patřilo dostatečné rozlišení mezi píkem podofylotoxinu a balastů, symetrie píku a přiměřená doba analýzy.

Nejprve byla vybírán způsob detekce. Při předchozích testováních byla zvolena UV detekce a jelikož podofylotoxin vykazuje i fluorescenci, byl testován fluorescenční detektor, který je citlivější a selektivnější než UV detektor. Excitační a emisní vlnová délka byla vybrána na základě proměření fluorescenčního spektra podofylotoxinu fluorimetrem na Katedře farmaceutické chemie.

Dále byla testována vhodná stacionární fáze, a to podle literatury a předchozí práce školitelky. Testovány byly tři: LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 250-4, 5  $\mu\text{m}$ , Hypersil Phenyl, 4,6  $\times$  150 mm, 3  $\mu\text{m}$  a Ascentis Express F5, 3,0  $\times$  150 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ .

Mobilní fáze byly vybírány dle literatury. Testovány byly různé vodné složky a v různých poměrech k organické složce, kterou byl acetonitril (viz Tab. 4).

**Tabulka 4: Složení mobilních fází.**

Vodná fáze	% vodné fáze v MF	% ACN v MF
<b>H<sub>2</sub>O</b>	50	50
<b>0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	40	60
<b>0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	60	40
<b>0,5M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub></b>	40	60
<b>0,5M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub></b>	60	40
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH</b>	40	60
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH</b>	60	40
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH</b>	45	55

Následně byly testovány tři teploty analýzy – 30 °C, 40 °C a 50 °C. Vyšší teploty už zkoušeny nebyly s ohledem na stabilitu stacionární fáze.

Extrakce vzorku na ultrazvuku byla prováděna 15, 30, 45 a 60 minut. Byl hodnocen vliv doby na výtěžnost extrakce.

Zvolené podmínky detekce a stacionární fáze pro extrakt z drogy byly aplikovány pro vzorek extraktu z kultury. Vzhledem k přítomnosti balastů z kultury bylo třeba provést gradientovou eluci. Parametry byly vybírány podle literatury a podle předchozí práce školitelky.

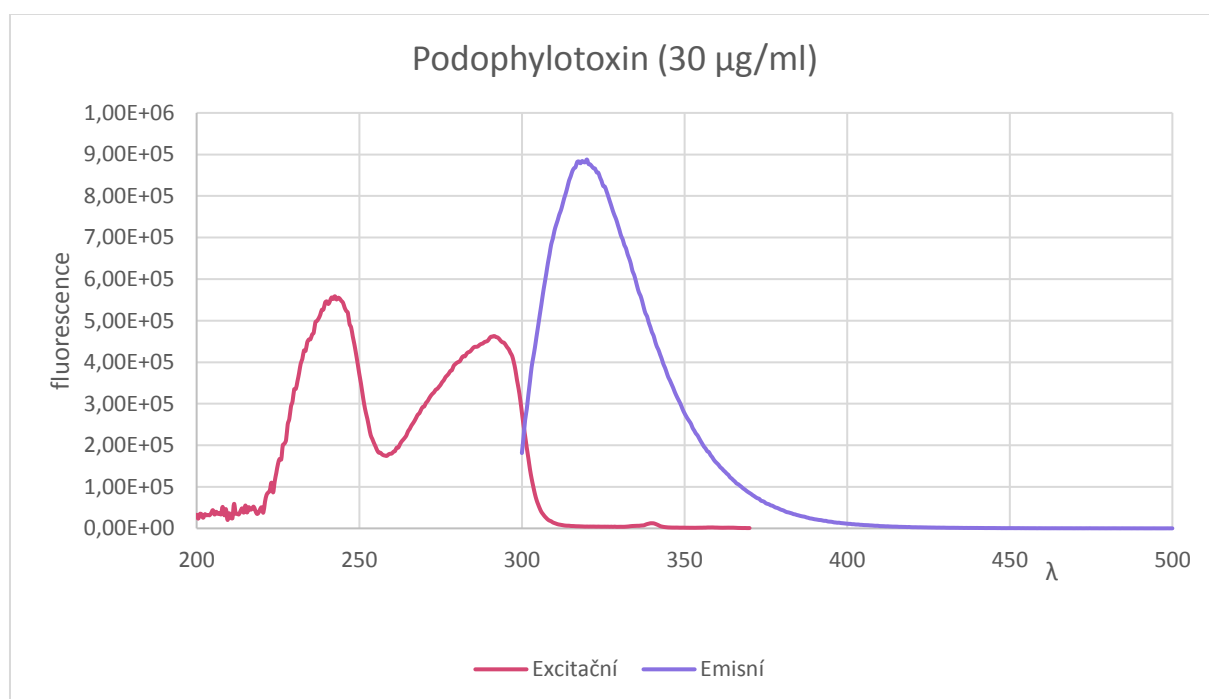
## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1 Optimalizace podmínek HPLC

Optimalizace podmínek byla prováděna za použití standardu podofylotoxinu o koncentraci 0,506 µg/ml a vzorku extraktu z drogy.

#### 5.1.1 Výběr detekce

K detekci byl zvolen fluorimetrický detektor. Excitační a emisní vlnové délky byly vybrány dle proměřeného spektra podofylotoxinu (viz Obr. 12). Vlnová délka excitační ( $\lambda_{ex}$ ) byla nastavena na 240 nm, vlnová délka emisní ( $\lambda_{em}$ ) na 320 nm.



Obrázek 12: Excitační a emisní fluorescenční spektrum podofylotoxinu.

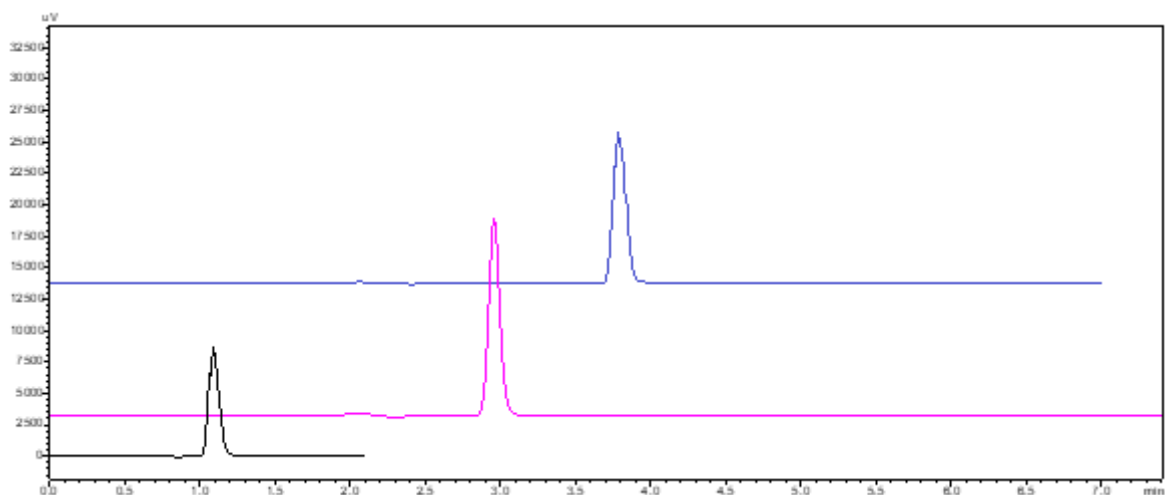
#### 5.1.2 Výběr stacionární fáze

Byly testovány tři typy kolon: LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 250-4 5 µm, Hypersil Phenyl, 4,6 × 150 mm, 3 µm a Ascentis Express F5, 3,0 × 150 mm, 2,7 µm. Analýza byla prováděna za následujících podmínek: mobilní fáze 0,1% kys. octová:acetonitril 40:60, teplota 30 °C, průtok 0,8 ml/min, FD  $\lambda_{ex}$  240 nm,  $\lambda_{em}$  320 nm. Srovnání chromatogramů kolon viz Obr. 13.

Na koloně Ascentis se pík podofylotoxinu eluoval v krátkém retenčním čase, pravděpodobně by docházelo ke koeluci s píky balastů extraktu resp. kultury, proto nebyla zvolena. Kolony



Hypersil i LiChrospher obě vyhovovaly našim požadavkům, zvolena byla nakonec kolona LiChrospher, kde se pík podofylotoxinu eluoval o minutu později, aby byla co nejmenší pravděpodobnost koeluce s píky balastů jak u extraktu z drogy, tak u extraktu z kultury. Dalším hlediskem byla praktická stránka. Byly k dispozici dvě stejné kolony LiChrospher, takže byla jedna záložní vzhledem k plánovanému měření velkého množství vzorků pro katedru Farmakognosie, proto byla zvolena tato kolona.



Obrázek 13: Chromatogramy standardu podofylotoxinu při použití různých kolon – LiChrospher (modrá), Hypersil (růžová) a Ascentis (černá).

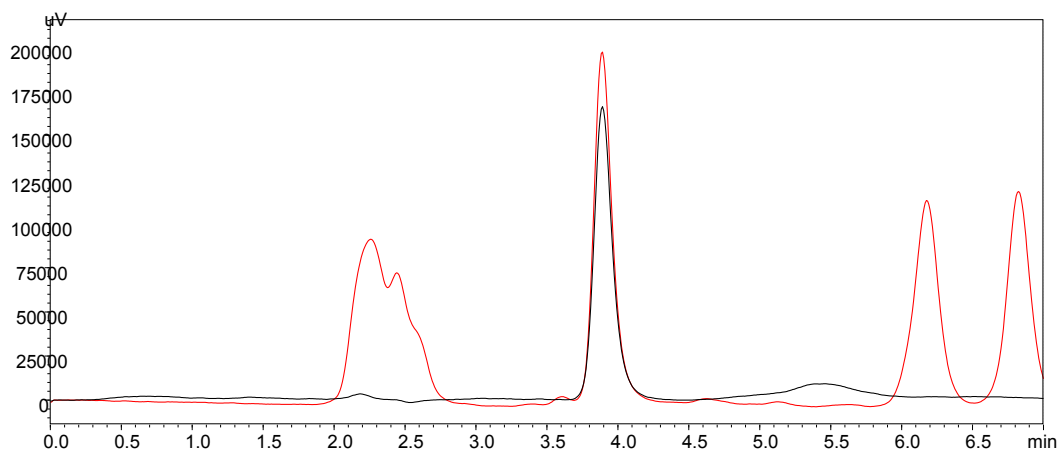
### 5.1.3 Výběr mobilní fáze

Jako první byla zkoušena mobilní fáze **ACN:H<sub>2</sub>O** v poměru 50:50. Pík podofylotoxinu neměl symetrický tvar, chvostoval a ve vzorku extraktu byl blízko balastů. Podmínky separace: kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4 mm, teplota 30 °C, průtok 0,8 ml/min, FD  $\lambda_{ex}$  240 nm,  $\lambda_{em}$  320 nm.

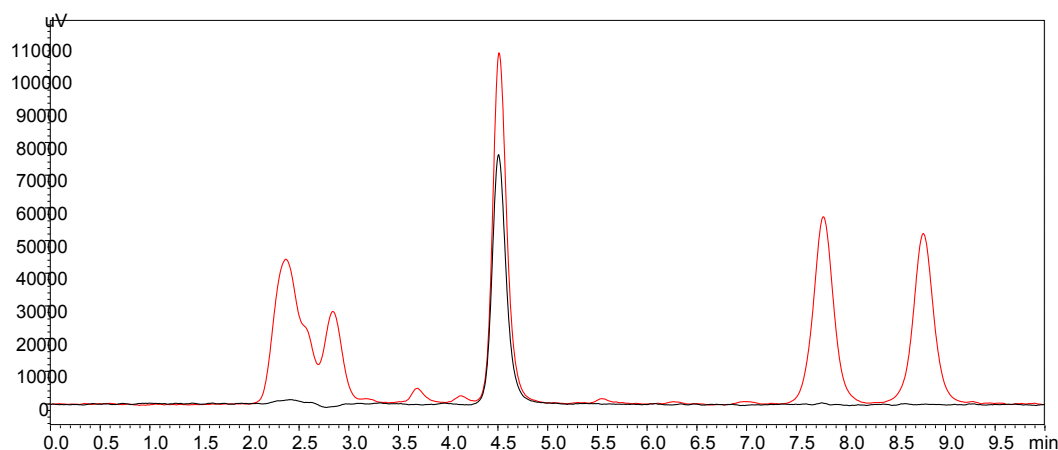
Obdobné problémy byly i při použití dalších testovaných mobilních fází, jako byly **0,5M octan amonný:ACN** 40:60 a i v obráceném poměru 60:40, dále **0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:ACN**, opět ve dvou poměrech 40:60 a 60:40.

Dále byla zkoušena MF **0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN** v poměru 40:60. V tomto případě už pík odpovídající podofylotoxinu ( $t_R$  u standardu 3,889 a u vzorku 3,882) měl symetrický tvar, čas analýzy byl 7 minut. V obráceném poměru 60:40 se prodloužil čas analýzy, proto nebyl tento poměr zvolen. Dále byl testován poměr 45:55, při kterém se zlepšilo rozlišení od balastů elujících se před píkem podofylotoxinu (1,6), a retenční čas se mírně posunul na 4,506 a čas analýzy se prodloužil na 10 minut. Při poměru 50:50 se rozlišení ještě zlepšilo (2,1). Čas

analýzy se prodloužil až na 15 minut, protože se eluovaly ještě dva výrazné píky na konci chromatogramu. Jako nejvhodnější mobilní fáze se tedy osvědčila 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN v poměru 40:60 a 45:55. Poslední zmíněný poměr byl poté použit pro validaci z důvodu většího rozlišení. Chromatogramy standardu (c = 0,506 µg/ml) a extraktu z drogy při použití těchto dvou MF viz Obr. 14 a 15.



Obrázek 14: Chromatogramy standardu podofylotoxinu (černá) a extraktu z drogy (červená) při použití MF 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN v poměru 40:60.

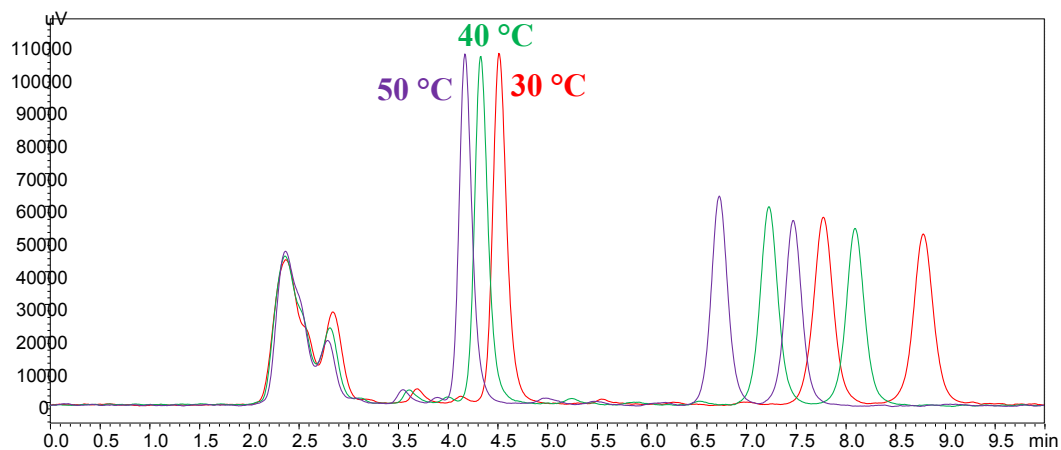


Obrázek 15: Chromatogramy standardu podofylotoxinu (černá) a extraktu z drogy (červená) při použití MF 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN v poměru 45:55.

### 5.1.4 Vliv teploty

Byly testovány tři teploty: 30 °C, 40 °C a 50 °C. Podmínky separace: kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4, průtok 0,8 ml/min, FD  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm, MF 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN 45:55. Zvýšení teploty se ukázalo jako výhodné, protože se zkrátila doba analýzy. Pro teploty 30 °C a

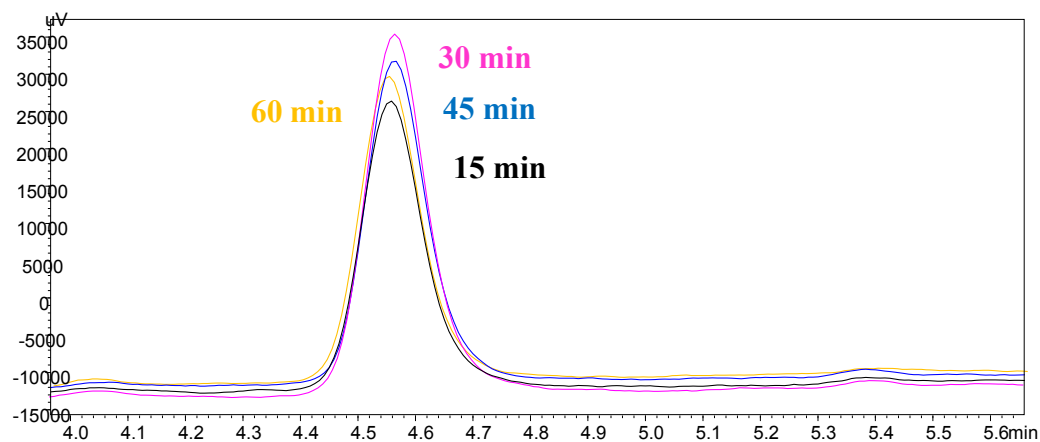
40 °C zůstávalo rozlišení píku podofylotoxinu a balastů přibližně stejné, u teploty 50 °C už se snížilo na 1,2, proto byla vyloučena. Dále byla používána teplota 40 °C z důvodu kratší doby analýzy než při 30 °C.



Obrázek 16: Chromatogramy extraktu z drogy při teplotách 30 °C (červená), 40 °C (zelená) a 50 °C (fialová).

### 5.1.5 Vliv doby extrakce na ultrazvuku

Následně byla testována doba extrakce vzorku drogy na ultrazvukové lázni. Byly zkoušeny čtyři časy – 15, 30, 45 a 60 minut. Pro každý čas byly testovány vždy 2 vzorky. Navážka každého vzorku byla přesně 10,00 mg. Nejvyšší výtěžnost byla po 30 minutách, poté už se nezvyšovala, tato doba byla tedy vybrána pro další práci. Během zvyšování doby v UZ lázni se zvyšuje i teplota, která také extrakci může ovlivnit, ale to nebylo zkoumáno. Teplota se pohybovala v rozmezí 25–38 °C.



Obrázek 17: Chromatogramy analýzy extraktu z drogy po 15 min (černá), 30 min (růžová), 45 min (modrá) a 60 min (žlutá) na ultrazvuku.

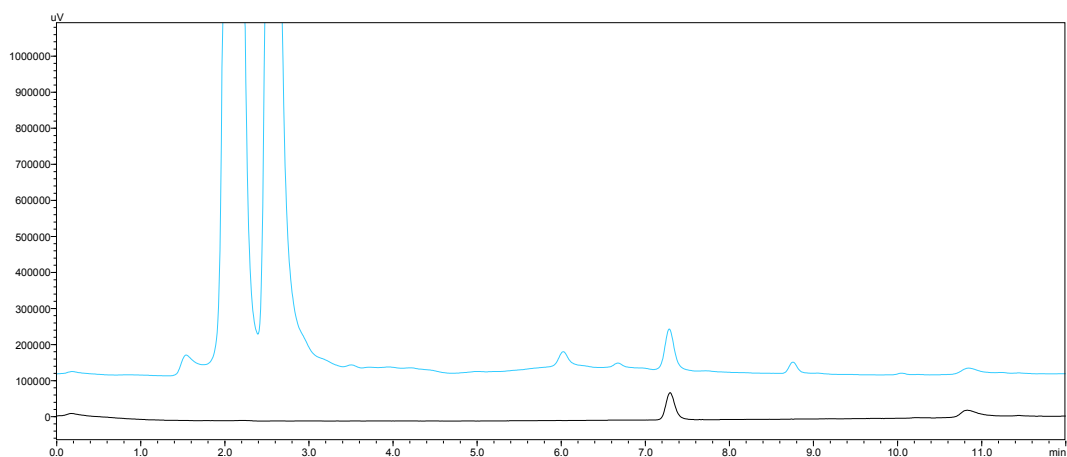
### 5.1.6 Gradientová eluce

Při analýze extraktů z kultury nebyly při isokratické eluci získány uspokojivé výsledky, docházelo ke koeluci píku podofylotoxinu s píky balastů. Proto bylo testováno použití gradientové eluce, při které se v průběhu analýzy měnil poměr vodné a organické složky mobilní fáze. Podmínky separace: kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4, teplota 30 °C, průtok 0,8 ml/min, FD  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm.

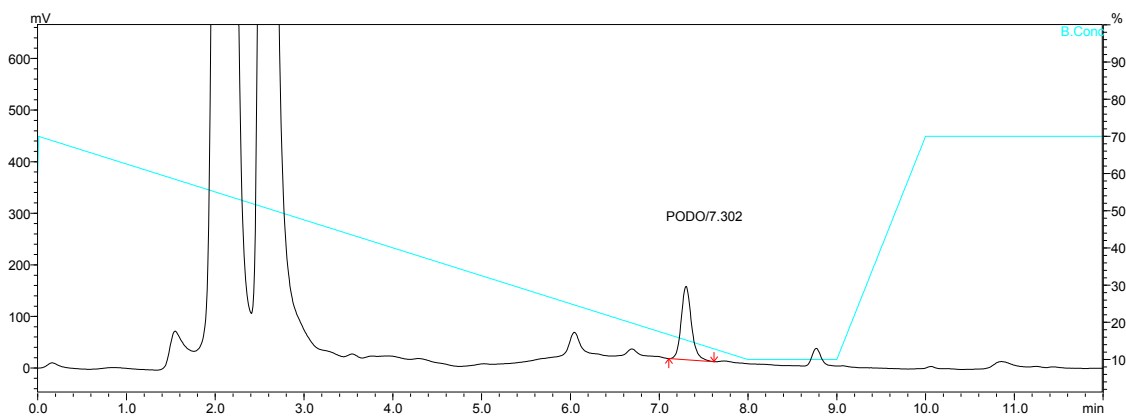
**Tabulka 5: Používané gradienty pro analýzu extraktu z kultury. Sudé sloupce popisují změnu koncentrace 0,1% CH<sub>3</sub>COOH v MF.**

Gradient A		Gradient B		Gradient C		Gradient D	
<b>0–8 min</b>	70 → 10 %	<b>0–8,5 min</b>	80 → 10 %	<b>0–9 min</b>	70 → 10 %	<b>0–8 min</b>	70 → 10 %
<b>8–9 min</b>	10 → 5 %	<b>8,5–9 min</b>	10 → 5 %	<b>9–10 min</b>	10 → 5 %	<b>8–9 min</b>	10 %
<b>9–10 min</b>	5 %	<b>9–10 min</b>	5 %	<b>10–11,5 min</b>	5 → 70 %	<b>9–10 min</b>	10 → 70 %
<b>10–11 min</b>	5 → 70 %	<b>10–11 min</b>	5 → 80 %	<b>11,5–13 min</b>	70 %	<b>10–12 min</b>	70 %
<b>11–13 min</b>	70 %	<b>11–13 min</b>	80 %				

Při testování gradientů bylo cílem co nejlepší oddělení od balastů kultury, symetrie píků a co nejkratší doba analýzy. Po neuspokojivé symetrii píků u gradientu B a horšímu oddělení od balastů u gradientů A a C byl vybrán gradient D, který měl nejlepší symetrii píků, uspokojivé rozlišení balastů a podofylotoxinu a nejkratší dobu analýzy. Jeho chromatogram je na Obr. 18 a průběh gradientové eluce na Obr. 19.



Obrázek 18: Chromatogramy standardu podofylotoxinu (černá) a analyzovaného extraktu z kultury (tyrkysová) při použití gradientu D.



Obrázek 19: Průběh gradientové eluce při analýze extraktu z kultury (se 100% přidavkem).

## 5.2 Validace metody pro extrakt z drogy

Metoda validována pro extrakt z drogy měla následující parametry:

- Preanalytická úprava: navážka 10,0 mg drogy byla extrahována v odměrné baňce v 8,0 ml methanolu 30 minut na UZ lázni, baňka byla doplněna na objem 10,0 ml a 100  $\mu$ l tohoto extraktu filtrovaného přes filtr 0,22  $\mu$ m do vialky bylo doplněno 900  $\mu$ l methanolu
- Kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4
- Mobilní fáze 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN 45:55
- Průtok 0,8 ml
- Teplota 40 °C
- Fluorimetrická detekce,  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm
- Doba extrakce vzorku na UZ 30 minut
- Doba analýzy 9 minut
- Nástřik 3  $\mu$ l

Sledovanými parametry byla preciznost, přesnost, linearita, selektivita, limit detekce a limit kvantifikace.

### 5.2.1 Preciznost

Preciznost byla měřena na 3 koncentračních hladinách, přičemž na každé byly analyzovány 3 vzorky. Požadavek na RSD je < 15 %. Naměřené hodnoty a RSD jsou uvedeny v tabulce 6 a odpovídají předepsanému limitu.

### 5.2.2 Přesnost

Přesnost byla měřena na třech koncentračních hladinách (80, 100 a 120 %), na každé z nich byly měřeny 3 vzorky. Příklad standardu na hladině 80 % byl 50  $\mu$ l, u 100 % 63  $\mu$ l a u 120 % to bylo 75  $\mu$ l (viz také Tab. 7 v kapitole 5.2.3 Linearita). Po změření samotných vzorků a vzorků s přídatky byla vypočtena skutečná koncentrace přídatku. Přesnost metody se má pohybovat mezi 85–115 %. Hodnoty splňující tento limit jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6: Přesnost a preciznost pro vzorek extraktu z drogy.**

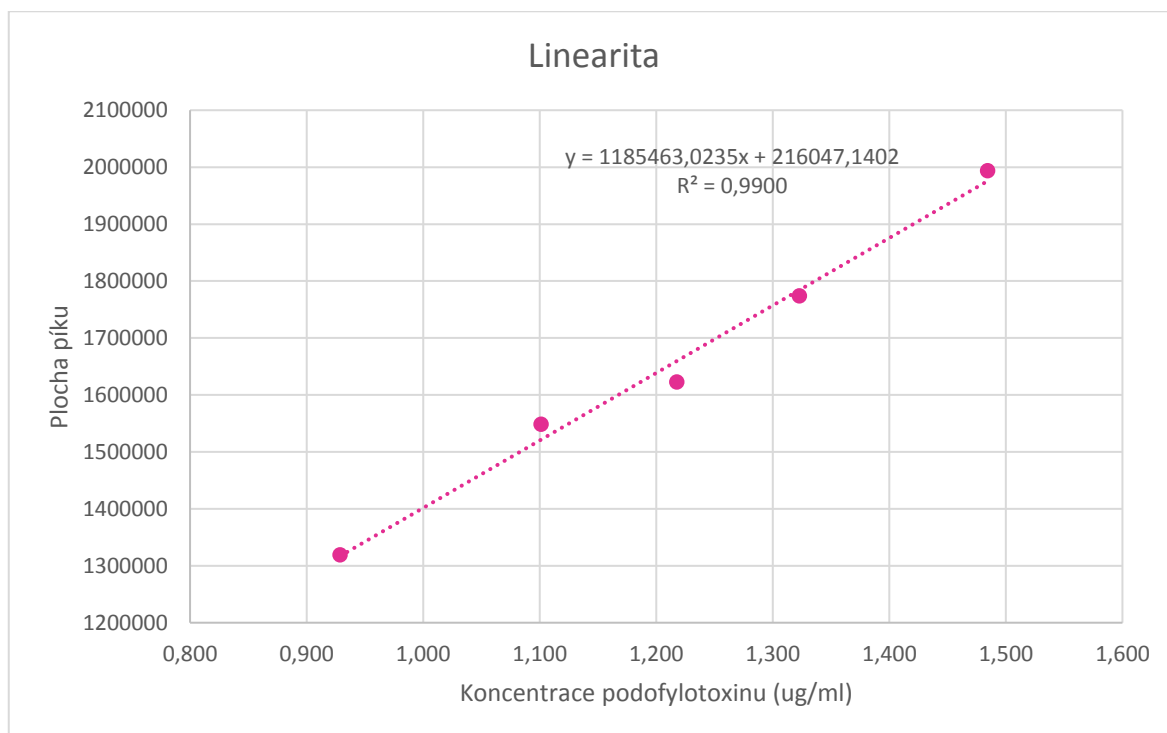
Koncentrační hladina	Koncentrace přídatku	Plocha píku	Vypočtená skutečná koncentrace přídatku [µg/ml]	Výtěžnost [%]	Průměr c [µg/ml]	Průměrná výtěžnost [%]	SD	RSD [%]
<b>80 %</b>	0,50 µg/ml	1429896	0,442	113,12	0,441	114,65	9226,96	0,649
		1423990	0,461	108,46				
		1411802	0,421	118,76				
<b>100 %</b>	0,63 µg/ml	1516948	0,532	118,42	0,571	110,35	83127,49	5,171
		1680341	0,594	106,06				
		1625245	0,586	107,51				
<b>120 %</b>	0,75 µg/ml	1816856	0,634	118,30	0,655	114,50	38239,09	2,155
		1762111	0,635	118,11				
		1743235	0,697	107,60				

### 5.2.3 Linearita

Kalibrační křivka byla měřena na 5 koncentračních hladinách. Koncentrace podofylotoxinu ve vzorku byla 0,610 µg/ml. Vypočítané koncentrace jsou s přidavkem standardního roztoku podofylotoxinu o koncentraci 10 µg/ml. Po jejím sestrojení byla získána rovnice pro výpočet přesných koncentrací a determinační koeficient  $R^2$ . Korelační koeficient R má hodnotu 0,9950, což odpovídá požadavku validace  $R \geq 0,99$ .

*Tabulka 7: Hodnoty kalibrační křivky.*

Koncentrační hladina	Přídavky [µl]	Koncentrace podofylotoxinu	Plocha píku
50 %	0,313	0,914 µg/ml	1319158
80 %	0,5	1,086 µg/ml	1548269
100 %	0,625	1,203 µg/ml	1622297
120 %	0,75	1,308 µg/ml	1774016
150 %	0,94	1,469 µg/ml	1993702



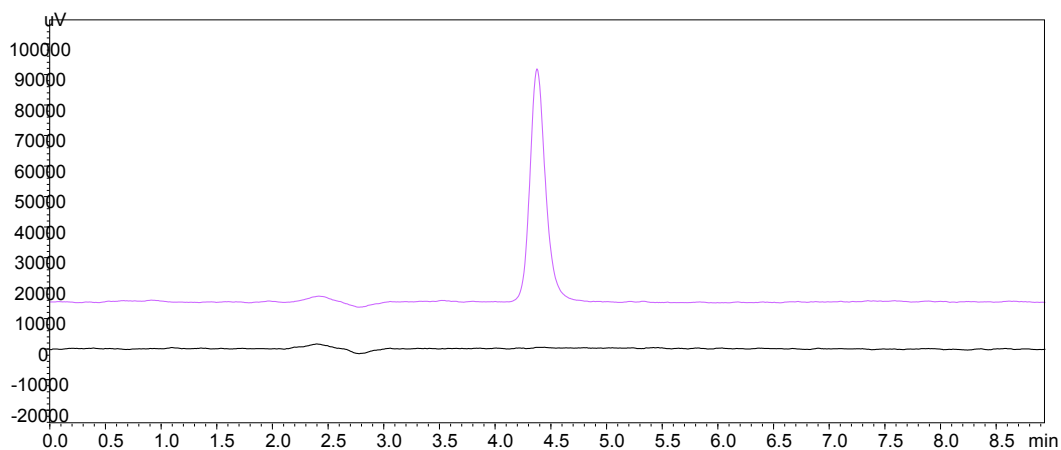
*Obrázek 20: Graf závislosti plochy píku na koncentraci podofylotoxinu v extraktu z drogy.*



### 5.2.4 Selektivita

Pro zjištění selektivity byl použit blank (pouze rozpouštědlo) a roztok standardu podofylotoxinu o koncentraci 0,506 µg/ml.

Chromatogram na obr. 21 znázorňuje nepřítomnost interferujících látek.



Obrázek 21: Chromatogram blanku (černá) a standardu podofylotoxinu o koncentraci 0,5 µg/ml (fialová).

### 5.2.5 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce a limit kvantifikace pro extrakt z drogy jsou vyjádřené ke koncentraci podofylotoxinu ve vzorku.

Hodnota LOD je 0,016 µg/ml a hodnota LOQ je 0,050 µg/ml.

### 5.3 Validace metody pro extrakt z kultury

Metoda validována pro analýzu extraktu z kultury měla následující parametry:

- Kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4
- Mobilní fáze 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN
- Gradientová eluce, změna poměru vodné složky: 0–8 min 70–10 %, 8–9 min 10 %, 9–10 min 10–70 %, 10–12 min 70 %
- Průtok 0,8 ml
- Teplota 40 °C
- Fluorimetrická detekce,  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm
- Doba analýzy 12 minut
- Nástřik 3  $\mu$ l

Sledovanými parametry byla preciznost, přesnost, linearita, limit detekce a limit kvantifikace.

#### 5.3.1 Preciznost

Preciznost byla měřena na třech koncentračních hladinách (50, 100 a 150 %), na každé z nich 3 vzorky. Hodnota RSD by měla být do 15 %. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8 a splňují předepsaný limit.

**Tabulka 8: Preciznost metody pro extrakt z kultury.**

Koncentrace podofylotoxinu	Plocha píku	Průměr	SD	RSD [%]
1,107 $\mu$ g/ml	1399546	1408908,13	10307,61	0,732
	1407225			
	1419954			
1,624 $\mu$ g/ml	2063368	2045126,3	15861,12	0,776
	2037422			
	2034589			
2,087 $\mu$ g/ml	2497360	2482723	27800,59	1,120
	2450662			
	2500147			

### 5.3.2 Přesnost

Přesnost byla měřena na třech koncentračních hladinách (67, 100 a 133 %), na každé z nich byly měřeny tři vzorky. Koncentrace přídatku na hladině 67 % byla 0,2 µg/ml, na 100 % to bylo 0,3 µg/ml a na 133 % to bylo 0,4 µg/ml. Samotná kultura bez přídatku měla koncentraci 0,3078 µg/ml a plochu píku 334451. Hodnota přesnosti by se měla pohybovat mezi 85–115 % skutečné hodnoty, čemuž naměřené hodnoty vyhovují.

*Tabulka 9: Přesnost metody pro extrakt z kultury.*

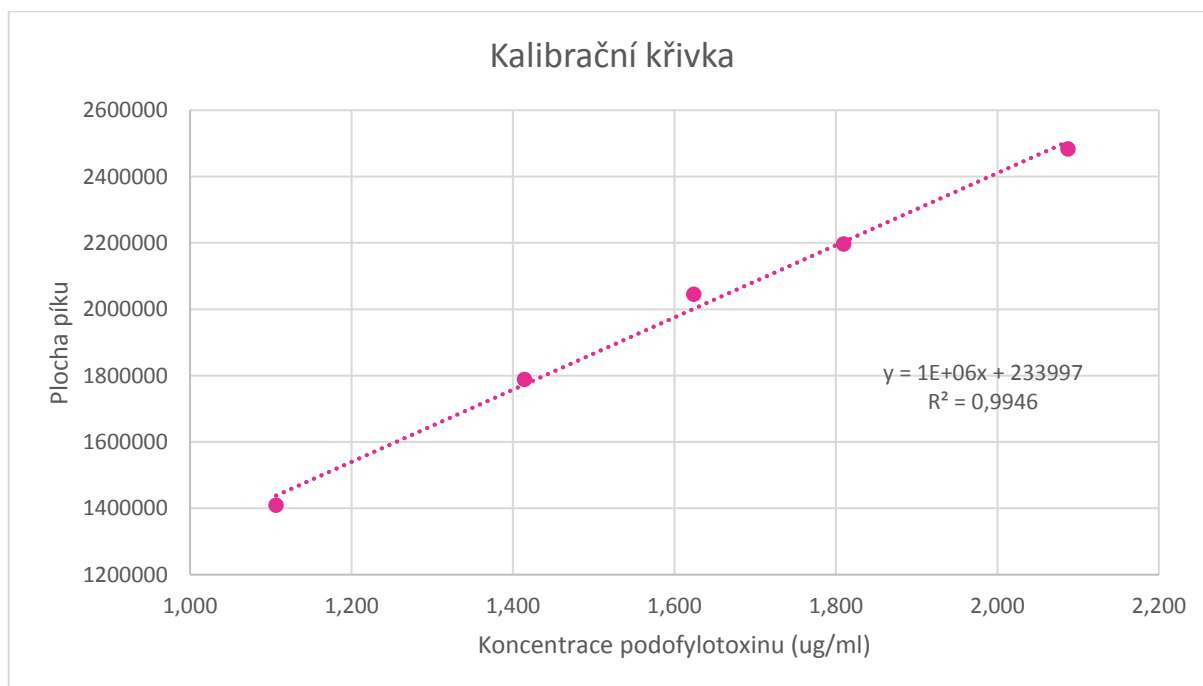
Koncentrační hladina	Plocha píku	c [µg/ml]	Koncentrace přídatku	Rozdíl [µg/ml]	Výtěžnost [%]	Prům. výtěžnost
67 %	551071	0,507	0,2 µg/ml	0,307	100,23	99,92 %
	555201	0,511		0,311	99,00	
	550036	0,506		0,306	100,54	
100 %	667372	0,614	0,3 µg/ml	0,314	97,99	97,27 %
	672514	0,619		0,319	96,54	
	669852	0,616		0,316	97,29	
133 %	771716	0,710	0,4 µg/ml	0,310	99,26	99,29 %
	773055	0,711		0,311	98,87	
	770024	0,708		0,308	99,76	

### 5.3.3 Linearita

Stanovení linearity bylo provedeno pomocí změření pěti koncentračních hladin, konkrétně 50, 80, 100, 120 a 150 %. V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty koncentrace podofylotoxinu tomu odpovídající a jejich plochy píků. Z kalibrační křivky potom byla získána rovnice, ze které lze spočítat přesné koncentrace, a determinační koeficient  $R^2$ . Korelační koeficient  $R$  má hodnotu 0,9973, což odpovídá požadavku validace  $R \geq 0,99$ .

*Tabulka 10: Hodnoty kalibrační křivky pro extrakt z kultury.*

Koncentrační hladina	Koncentrace podofylotoxinu	Plocha píku
50 %	1,107 $\mu\text{g/ml}$	1408908
80 %	1,414 $\mu\text{g/ml}$	1788420
100 %	1,624 $\mu\text{g/ml}$	2045126
120 %	1,809 $\mu\text{g/ml}$	2196683
150 %	2,087 $\mu\text{g/ml}$	2482723



*Obrázek 22: Graf závislosti plochy píku na koncentraci podofylotoxinu v extraktu z kultury.*

### 5.3.4 Limit detekce, limit kvantifikace a selektivita

Vzhledem k tomu, že bylo k dispozici jen malé množství vzorků po izolaci z kultury a ve všech byla v různém množství přítomna analyzovaná látka, nebylo možné tyto validační parametry provést.

Pro přibližné stanovení hodnoty LOQ jsme vybrali vzorek kultury s nejnižším kvantifikovatelným obsahem podofylotoxinu o koncentraci 0,154 µg/ml. Vzorek byl rozpipetován do 6 insertů a byla vypočítána hodnota RSD.

*Tabulka 11: LOQ pro extrakt z kultury.*

Měření	Koncentrace µg/ml
1	0,154
2	0,130
3	0,132
4	0,141
5	0,187
6	0,164
<b>Průměr</b>	0,151
<b>RSD (%)</b>	14,4

Výsledná hodnota RSD je 14,4 %, vzhledem tomu, že se jedná o hodnotu blízkou 15 %, která je limitní pro LOQ, koncentrace nižší než 0,154 µg/ml bude pravděpodobně pod touto hranicí.

## 5.4 Využití metody stanovení podofylotoxinu v extraktech

Optimalizovaná a validovaná metoda byla během druhé validace metody pro extrakt z kultury již používána pro měření přibližně 200 vzorků. Ty byly připravovány na Katedře farmakognosie studentem Jiřím Olšarem a jeho školitelem PharmDr. Tomášem Siatkou, CSc. pro diplomovou práci s názvem Podofylotoxin v jalovci virginském.

Extrakty z upráškované drogy byly získávány různými technikami – ultrazvukem, třepáním, macerováním za chladu za použití různých rozpouštědel, teplot a časů.

Práce byla již obhájena v roce 2020.

Dále byla metoda použita pro zjištění obsahu podofylotoxinu u různých odrůd jalovce – mimo již zmíněného *Juniperus virginiana* i u *Juniperus chinensis* Hetzii a *Juniperus sabina Tamariscifolia*. Usušené jehličí bylo jemně namleto a od každé odrůdy byly testovány 3 navážky a pro každou spočítána průměrná hodnota obsahu (viz Tab. 12).

**Tabulka 12: Obsah podofylotoxinu v různých odrůdách jalovce.**

	<i>J. virginiana</i>	<i>J. chinensis</i>	<i>J. sabina</i>
<b>Obsah podofylotoxinu [mg/g]</b>	2,80	0,018	1,09
	3,26	0,025	1,15
	2,74	0,019	1,24
<b>Průměr [mg/g]</b>	<b>2,93</b>	<b>0,021</b>	<b>1,16</b>

Naměřené hodnoty odpovídají hodnotám uváděných v literatuře např. [37], v některých případech lze nalézt i jiné, vyšší i nižší. Podstatné je, z jaké části rostliny byl extrakt připraven. Například u *J. chinensis* je obsah podofylotoxinu v celé rostlině oproti kalusu z listů poloviční. [38]

## 6. Závěr

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá podofylotoxinem, jeho fyzikálně-chemickými a farmakologickými vlastnostmi, použitím, polosyntetickými deriváty a jeho nejvýznamnějšími rostlinnými zdroji. Také jsou zde popsány podmínky separace podofylotoxinu pomocí HPLC nalezené v odborné literatuře. Následně se teoretická část věnuje vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Je zde vysvětlen princip, dále jsou popsány charakteristiky analýzy, stacionární fáze, detektory a separační módy. Poté se teoretická část věnuje validaci metody, kde jsou popsány základní validační parametry.

Experimentální část práce se týká analýzy podofylotoxinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K analýze byly využívány dva rostlinné zdroje podofylotoxinu – extrakt z jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L., var. Blue Arrow) a explantátové kultury jalovce virginského. Byly vybírány co nejvhodnější podmínky analýzy. Byly zkoušeny tři různé stacionární fáze, ze kterých byla jako nejlepší vybrána kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4. Poté byl sledován vliv různých mobilních fází na eluci podofylotoxinu, ze kterých byla zvolena mobilní fáze 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN 45:55. Dále byl sledován vliv teploty, kde byla jako nejlepší vyhodnocena teplota 40 °C. Také byla zkoušena doba extrakce drogy na ultrazvuku, kde nejlepší výtěžnost byla dosažena při době 30 minut. K detekci byl vybrán fluorimetrický detektor s excitační vlnovou délkou nastavenou na 240 nm a emisní vlnovou délkou na 320 nm. Analýza probíhala 9 minut za průtoku 0,8 ml/min a nástřiku 3 µl. Pro explantátovou kulturu nebyla vhodná analýza isokratickou elucí, proto bylo zkoušeno několik gradientů, ze kterých byl následně vybrán nejvhodnější – 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN, změna poměru vodné složky: 0–8 min 70–10 %, 8–9 min 10 %, 9–10 min 10–70 %, 10–12 min 70 %. V tomto případě analýza probíhala 12 minut, s průtokem 0,8 ml/min a nástřikem 3 µl. Obě metody byly následně validovány. Z validačních parametrů byla hodnocena přesnost, preciznost, linearita a u extraktu i selektivita, LOD a LOQ. Vybrané validační parametry splňovaly kritéria.

Praktické využití validované metody našly při vypracování jiné diplomové práce na Katedře farmakognozie. Dále byly analyzovány validovanou metodou i jiné odrůdy jalovce.

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Kandidát:** Markéta Nováková

**Školitel:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** HPLC analýza podofylotoxinu

Diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek HPLC metody pro analýzu podofylotoxinu. Metoda byla vyvíjena pro analýzu extraktu z drogy z jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L., var. Blue Arrow). Byly testovány různé stacionární fáze, mobilní fáze, teplota, doba extrakce pomocí ultrazvuku. Jako optimální byly vybrány tyto podmínky: doba extrakce drogy na ultrazvuku 30 minut, kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4, mobilní fáze 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN v poměru 45:55, teplota 40 °C, průtok 0,8 ml/min, nástřik 3 µl, fluorimetrická detekce  $\lambda_{ex}$  240 nm,  $\lambda_{em}$  320 nm, doba analýzy 9 minut. Metoda byla poté vyvíjena i pro extrakt z explantátové kultury jalovce virginského, pro který byla zvolena gradientová eluce. Tato metoda měla následující podmínky: kolona LiChrospher 100 RP-18 250-4, mobilní fáze 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN, změna poměru vodné složky: 0–8 min 70–10 %, 8–9 min 10 %, 9–10 min 10–70 %, 10–12 min 70 %, teplota 40 °C, průtok 0,8 ml/min, nástřik 3 µl, fluorimetrická detekce  $\lambda_{ex}$  240 nm,  $\lambda_{em}$  320 nm, doba analýzy 12 minut. Obě metody byly následně validovány. Hodnocenými parametry byla přesnost, preciznost, linearita, selektivita, limit detekce a limit kvantifikace.



# ABSTRACT

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis**

**Candidate:** Markéta Nováková

**Tutor:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Title of Thesis:** HPLC Analysis of Podophyllotoxin

The diploma thesis is focused on optimization of HPLC method for the analysis of podophyllotoxin. The method was developed for the analysis of *Juniperus virginiana* leaves extract. Various stationary phases, mobile phases, temperatures, ultrasonic extraction times were tested. Following conditions were chosen as optimal: 30 minutes ultrasonic extraction time, LiChrospher 100 RP-18 250-4 column, 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN 45:55 mobile phase, temperature 40 °C, flow rate 0,8 ml/min, sample volume 3 µl, fluorescence detection  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm, time of analysis 9 minutes. The method was also developed for the analysis of plant tissue cultures of *Juniperus virginiana*, for which gradient elution was chosen. This method had following conditions: LiChrospher 100 RP-18 250-4 column, mobile phase 0,1% CH<sub>3</sub>COOH:ACN, change of acetic acid ratio: 0–8 min 70–10 %, 8–9 min 10 %, 9–10 min 10–70 %, 10–12 min 70 %, temperature 40 °C, flow rate 0,8 ml/min, sample volume 3 µl, fluorescence detection  $\lambda_{\text{ex}}$  240 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  320 nm, time of analysis 12 minutes. Subsequently, both methods were validated. Evaluated parameters included precision, accuracy, linearity, selectivity, limit of detection and limit of quantification.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN – acetonitril

APCI – atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – atmospheric pressure photoionization, fotoionizace za atmosférického tlaku

CAD – Corona-discharge detector, aerosolový detektor nabitých částic

DAD – diode array detector, detektor s diodovým polem

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EMA – European Medicines Agency, Evropská léková agentura

ESI – electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

FD – fluorescenční (fluorimetrický) detektor

FDA – Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

GPC – gel permeation chromatography, gelová permeační chromatografie

HILIC – hydrophilic interaction chromatography, chromatografie hydrofilních interakcí

HPLC – high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPV – human papillomavirus, lidský papilomavirus

ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva

LC-MS – liquid chromatography-mass spectrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostní chromatografií

LOD – limit of detection, limit detekce

LOQ – limit of quantification, limit kvantifikace

MeOH – methanol

MF – mobilní fáze

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

NP-HPLC – normal phase high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích

ODS – oktadecylsilikagel

RSD – relativní směrodatná odchylka

RP-HPLC – reversed phase high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích

SEC – size exclusion chromatography, molekulová vylučovací chromatografie

SF – stacionární fáze

SST – system suitability test, test způsobilosti systému

$t_R$  – retenční čas

UHPLC – ultra-high performance liquid chromatography, ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV – ultraviolet, ultrafialové záření

UV/VIS – ultraviolet/visible, ultrafialová a viditelná oblast světla

UZ – ultrazvuk

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Český lékopis 2017*. Doplněk 2019. Praha: Grada, 2019. ISBN 978-80-271-2531-9.
- [2] HRDINA, Vratislav. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-256-0.
- [3] SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
- [4] GORDALIZA, M., P.A. GARCÍA, J.M. Miguel DEL CORRAL, M.A. CASTRO a M.A. GÓMEZ-ZURITA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon* [online]. 2004, **44**(4), 441-459 [cit. 2020-12-08]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104001953?via%3Dihub>
- [5] OLŠAR, Jiří. *Podofylotoxin v jalovci virginském (Juniperus virginiana)*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie. Vedoucí práce Siatka, Tomáš.
- [6] CANEL, Camilo, Rita M. MORAES, Franck E. DAYAN a Daneel FERREIRA. Podophyllotoxin. *Phytochemistry* [online]. 2000, **54**(2), 115-120 [cit. 2020-12-08]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200000947>
- [7] PubChem Database. *Etoposide*, CID 36462 [online]. [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36462>
- [8] PubChem Database. *Teniposide*, CID 452548 [online]. [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/452548>
- [9] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [10] MALINOVÁ, Tereza. *Využití kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze IV*. 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Vedoucí práce Pilařová, Pavla.
- [11] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *HPLC – historie a*

*základní principy* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod\\_resource/content/7/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%201\\_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod_resource/content/7/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%201_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf)

[12] <https://laboratoryinfo.com/hplc/> [staženo 29.12.2020]

[13] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *HPLC – popis základního hardwaru* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%202\\_HPLC%20instrumentace.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%202_HPLC%20instrumentace.pdf)

[14] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha 2013. Praha. ISBN 978-80-260-4243-3.

[15] Teorie HPLC / Základy HPLC. Hplc.cz [online]. [cit. 2021-02-25]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>

[16] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *Kvalitativní a kvantitativní analýza, vývoj analytické metody* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241561/mod\\_resource/content/5/Lekce%207\\_Kvalita%2C%20kvantita%2C%20vyvoj%20metody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241561/mod_resource/content/5/Lekce%207_Kvalita%2C%20kvantita%2C%20vyvoj%20metody.pdf)

[17] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0

[18] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *HPLC – stacionární fáze a separační módy* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod\\_resource/content/1/Lekce%204\\_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf)

[19] Laboratoryinfo.com. [Online] aktualizováno 11. 1. 2020. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications [cit. 2021-01-19]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>

- [20] Technologie s pevným jádrem a porézním povrchem. CHROMSERVIS [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/core-shell-technology?lang=CZ>
- [21] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *HPLC – detektory* [online]. [cit. 2018-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%203\\_Detektory.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf)
- [22] <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-v-fluorescence-detectors> [staženo 29.12.2020]
- [23] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod\\_resource/content/6/Lekce%206\\_MS.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce%206_MS.pdf)
- [24] DOHNAL, Jiří a Helena BRUSOVÁ. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Praha: Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-085-6.
- [25] HPLC Separation Modes. *Waters.com* [online]. [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_US)
- [26] Matysová L. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Speciální metody instrumentální analýzy: *Iontovýmienná a gelová chromatografie* [online]. [cit. 2020-12-31]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/277189/mod\\_resource/content/1/Iontov%C3%BDm%C4%9Bnn%C3%A1%20a%20gelov%C3%A1%20chromatografie.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/277189/mod_resource/content/1/Iontov%C3%BDm%C4%9Bnn%C3%A1%20a%20gelov%C3%A1%20chromatografie.pdf)
- [27] DANIELSON, Neil D. Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*. Academic Press, 2003, s. 673-700. ISBN 9780122274107.
- [28] Pražské analytické centrum inovací (projekt), (Tesařová E., Ed.). *Analýza chirálních sloučenin*. Praha: VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-86238-23-4.

- [29] Kovaříková, P.; Stariat, J. MOODLE pro výuku 1 Univerzita Karlova. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze: *Validace HPLC metody* [online]. [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod\\_resource/content/5/Lekce%2011\\_Validace%20HPLC%20metody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod_resource/content/5/Lekce%2011_Validace%20HPLC%20metody.pdf)
- [30] NOVÁKOVÁ, Lucie. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*. 2013, (1292), 25-37.
- [31] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2 (R1): Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register (2005).
- [32] BRANDÃO, Hugo N. et al. Determination of podophyllotoxin and related aryltetralin lignans by HPLC/DAD/MS from Lamiaceae species. *Microchemical Journal*. 2017, (130), 179-184.
- [33] KARTAL, Murat et al. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004, 35(3), 441-447.
- [34] ZHANG, Jie, Shu-Yun SHI et al. Simultaneous determination of five active compounds from *Dysosma Difformis* roots by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2014, 37(9), 1226-1236.
- [35] ZHANG, Xiao Yun, Hua QIAO a Yan Bin SHI. HPLC method with fluorescence detection for the determination of ligustilide in rat plasma and its pharmacokinetics. *Pharmaceutical Biology*. 2014, 52(1), 21-30.
- [36] LIM, C.K. Analysis of aryltetrahydronaphthalene lignans and their glucoside conjugates in podophyllin resin by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996, 722, 267-271.
- [37] RENOARD, Sullivan et al. Podophyllotoxin and Deoxypodophyllotoxin in *Juniperus bermudiana* and 12 Other *Juniperus* Species: Optimization of Extraction, Method Validation, and Quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59(15), 8101-8107.

[38] MURANAKA T. et al. Production of Podophyllotoxin in *Juniperus Chinensis* Callus Cultures Treated with Oligosaccharides and a Biogenetic Precursor. *Phytochemistry*. 1998, 49(2), 491-496.