

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Validace HPLC metody simultánního hodnocení nabumetonu a
jeho hlavního metabolitu 6-methoxy-2-naftylctové kyseliny**

Rigorózní práce

Hradec Králové 2006

Mgr. Vadim Vyskočil

Děkuji Doc.RNDr. Jaroslavu Sochorovi, Csc. za cenné rady, připomínky a odbornou pomoc. Děkuji též Mgr. Radimu Kučerovi a Mgr. Martě Chlupáčové za poskytnuté zázemí při mé práci.

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	NESTEROIDNÍ ANTIFLOGISTIKA (NSA)	8
2.2	SOUHRN VLASTNOSTÍ NABUMETONU A KYSELINY METHOXY-2-NAFTYLOCTOVÉ	6- 9
2.3	CHROMAROGRAFIE	12
2.3.1	KLASIFIKACE JEDNOTLIVÝCH METOD	12
2.3.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	15
2.3.2.1	INSTRUMENTACE	15
2.3.2.2	CHROMATOGRAFICKÉ PARAMETRY	22
2.3.2.3	HODNOCENÍ V HPLC	25
2.4	PŘÍPRAVA VZORKU	26
2.4.1	ÚPRAVA BILOGICKÉHO MATERIÁLU	27
2.4.1.1	DEPROTEINACE.	27
2.4.1.2	SPE - EXTRAKCE NA PEVNÝCH FÁZÍCH.	28
2.4.1.3	LLE - EXTRAKCE DO ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL.	31
2.5	VALIDACE METODY	35
2.5.1	LINEARITA	36
2.5.2	SPRÁVNOST	36
2.5.3	PŘESNOST	37
2.5.4	SELEKTIVITA	38
2.5.5	DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ LIMIT	38
2.5.6	ROBUSTNOST	39
2.6	HPLC METODY HODNOCENÍ NABUMETONU A 6MNA V ODBORNÉ LITERATUŘE	40
3	CÍL PRÁCE	46
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48

4.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, MATERIÁL A POMŮCKY	49
4.1.1	HPLC SESTAVA	49
4.1.2	PŘÍSTROJE	49
4.1.3	POMŮCKY	49
4.1.4	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	49
4.1.5	LÉČIVA A CHEMIKÁLIE	50
4.2	PŘÍPRAVA PUFRU A MOBILNÍ FÁZE	50
4.2.1	FOSFOREČNANOVÝ PUFR	50
4.2.2	MOBILNÍ FÁZE	50
4.3	CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY	51
4.4	IZOLACE NAB A 6MNA Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	51
4.4.1	ÚPRAVA DEPROTEINACÍ	51
4.4.2	IZOLACE NA PEVNÝCH FÁZÍCH (SPE)	51
4.4.3	EXTRAKCE ORGANICKÝM ROZPOUŠTĚDLEM (LLE)	52
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
5.1	STUDIE ÚPRAV VZORKŮ PLNÉ KRVE PŘI ANALÝZE NAB A 6MNA	54
5.1.1	ÚPRAVA VZORKU DEPROTEINACÍ	54
5.1.2	IZOLACE NAB A 6MNA POMOCÍ SPE A DEPROTEINACÍ	55
5.1.3	IZOLACE NAB A 6MNA POMOCÍ LLE	57
5.2	TESTOVÁNÍ VALIDAČNÍCH PARAMETRŮ	59
5.2.1	LINEARITA	59
5.2.2	SPRÁVNOST	62
5.2.2.1	PŘESNOST	63
5.2.2.2	SELEKTIVITA	64
5.2.2.3	DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ LIMIT	66
5.2.2.4	ROBUSTNOST	67
6	ZÁVĚR	72
7	POUŽITÁ LITERATURA	74

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC je dnes nejpoužívanější analytickou metodou v medicínském a farmaceutickém výzkumu. Jedná se hlavně o sledování lékových hladin v různých biologických tekutinách, nejčastěji v plazmě, krevním séru, plné krvi, moči aj. Bez HPLC se neobejdeme ve farmakokinetických, metabolických, toxikologických studiích, používá se také pro sledování biologické dostupnosti léčiv, distribuce léčiv, toxikománie a dalších.

Je to metoda vysoce selektivní a citlivá, dovolující použít širokou škálu detektorů pracujících na různých principech. Umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu velmi malých množství látek i z poměrně složitých biologických materiálů, a také separaci směsí, léčiv a jejich metabolitů.

Nesteroidní antiflogistikum nabumeton je pro – drug, jehož účinnost je závislá na jeho metabolitu 6-methoxy-2-naftyloctové kyselině. Pro simultánní sledování koncentrací obou látek v plné krvi je tedy s výhodou využito vlastností HPLC.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 NESTEROIDNÍ ANTIFLOGISTIKA (NSA)

Do této skupiny patří převážně látky kyselé povahy obsahující ve své molekule volnou karboxylovou skupinu, případně se jedná o látky enolického charakteru. Jejich mechanismus účinku spočívá především v inhibici syntézy prostaglandinů. Pro schopnost tlumit bolest a snižovat horečku se některá běžně používají jako analgetika-antipyretika ke kterým mají úzký vztah i po chemické a farmakologické stránce.

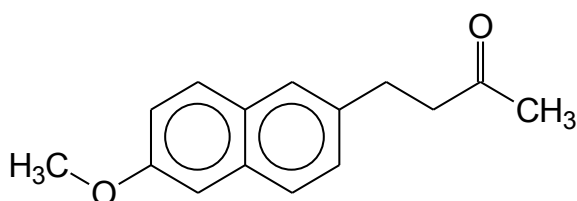
Těžištěm jejich použití je ale tlumení projevů zánětu – bolest, otok, zarudnutí a zvýšená teplota, zejména pohybového ústrojí. V revmatologii mají pak největší význam látky, které kromě vlivu na akutní fázi zánětu mají schopnost brzdit průběh degenerativních změn v pojivové tkáni – tiaprofenová kyselina. Mezi nesteroidní antiflogistika patří:

- Aromatické karboxylové kyseliny *Salicyláty* (kys. acetylosalicylová, aloxiprin)
Fenamáty (mefenámová, meklofenámová, tolfenámová a niflumová kyselina)
- Heterocyklické enoly *Pyrazolidindiony* (fenylbutazon, kebuson, tribuzon)
Oxikamy (piroxikam, tenoxikam)
- Deriváty arylalkanových kyselin *Fenaky* (diklofenak, indometacin...)
Profeny (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, tiaprofenová kyselina...)

Mechanismus účinku NSA spočívá v zásahu do metabolismu kyseliny arachidonové. Metabolity kyseliny arachidonové vznikají dvěma cestami a označují se podle enzymů, které je katalyzují. První cestou, působením cyklooxygenasy (COX), vznikají cyklické endoperoxidy, ze kterých dále vznikají prostacykliny, prostaglandiny a tromboxany. Rozlišujeme COX1 a COX2, přičemž mediátory zánětu jsou především látky vzniklé COX2. Naopak prostaglandiny vzniklé cestou COX1 mají mukoprotektivní účinek. Neselektivní inhibice má proto za následek častý výskyt nežádoucích účinků, projevujících se zejména poruchami GIT (okultní krvácení, ulcerace, eroze endotelu). Druhou cestou, působením lipooxygenasy, vznikají leukotrieny a hydroxyikosatetraenová kyselina. Jsou také mediátory zánětu, protože

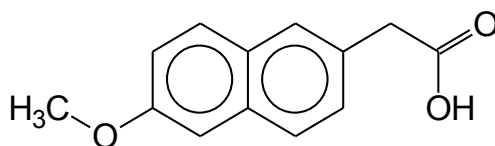
zvyšují cévní permeabilitu a usnadňují migraci a aktivaci leukotrienů. Dalšími významnými mediátory zánětu jsou bradikinin a lysozomální enzymy, jejichž uvolňování je inhibováno některými běžně užívanými antiflogistiky. Některá antiflogistika zasahují do procesu vzniku zánětu komplexně, jiná mají selektivnější působení.¹⁾

2.2 SOUHRN VLASTNOSTÍ NABUMETONU A KYSELINY 6-METHOXY-2-NAFTYLOCTOVÉ



Obr.č.1: Strukturní vzorec nabumetonu ²⁾

Nabumeton 4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-on je nesteroidní antiflogistikum, antirevmatikum, analgetikum, antipyretikum z velmi dobrou gastrointestinální tolerancí a nízkým výskytem nežádoucích účinků, vyvinuté firmou Beecham Pharmaceuticals v roce 1978. Na rozdíl od ostatních nesteroidních antiflogistik není kyselinou. Po podání do organismu se v játrech biotransformuje na účinný metabolit, kyselinu 6-methoxy-2-naftyloctovou



Obr.č.2: Strukturní vzorec 6-methoxy-2-naftyloctové kyseliny ²⁾

která vykazuje mnohem vyšší protizánětlivé účinky než nabumeton samotný. ³⁾

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Nabumeton (NAB) chemicky 4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-on
sumární vzorec $C_{15}H_{16}O_2$
molekulová hmotnost 228,29²⁾

Vlastnosti: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu (96%) a v methanolu, snadno rozpustný v acetonu⁴⁾ s teplotou tání 80 – 81°C.²⁾

Kyselina 6-methoxy-2-naftylactová (6MNA)

Sumární vzorec $C_{13}H_{12}O_3$

Molekulová hmotnost 216,24

Vlastnosti: bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v methanolu.

Mechanismus účinku

6MNA snižuje prostřednictvím inhibice cyklooxygenázy (COX) tvorbu endoperoxidů, prostacyklinů a prostaglandinu E2, které jsou nepřímo odpovědné za zánětlivé změny a bolest. Samotný nabumeton je jen slabým inhibitorem COX. Pro terapii je důležité, že je přednostně inhibována COX-2 a ne COX-1. COX-1 je ve tkáních přítomna fyziologicky a odpovídá za tvorbu protektivních prostanoidů. COX-2 se indukuje teprve po poškození tkáně a odpovídá za tvorbu výše jmenovaných mediátorů zánětu. To je důvod výborné tolerance a nízkého výskytu nežádoucích účinků nabumetonu.^{3), 5)}

Farmakologický účinek

Nabumeton je po perorálním podání dobře absorbován. Podléhá výraznému efektu první pasáže játry. Přibližně 35% podané dávky se rychle přeměňuje na aktivní metabolit 6MNA, 50% je konvertováno na inaktivní metabolity vylučované močí. Po jednorázové dávce je u zdravých dobrovolníků dosaženo vrcholových plazmatických koncentrací 6MNA za 3-6 hodin, rovnovážného stavu je dosaženo po 3-5 dnech obvyklé léčby. Podání nabumetonu současně se stravou nebo mlékem zvyšuje biologickou dostupnost aktivního metabolitu bez ovlivnění času nutného k dosažení vrcholových plazmatických koncentrací. 6MNA je t více než 99% vázána na plazmatické bílkoviny. Eliminační poločas 6MNA je 24 hodin; je mírně prodloužen u pacientů vyššího věku, prodlužuje se též při závažném stupni renální insuficience.^{3), 5)}

Indikace

Nabumeton je indikován ke krátkodobé i dlouhodobé léčbě osteoartrózy, revmatoidní artritidy, ankylozující spondylitidy, extraartikulárních revmatických onemocnění a k ovlivnění bolesti a zánětu u sportovních poranění. Aplikuje se v dávce 500 – 1000 mg jednorázově, nejlépe na noc. V závažných případech lze podat na začátku terapie až 2000 mg denně ve dvou dílčích dávkách.³⁾

Kontraindikace

Nabumeton je kontraindikován u dětí do 14 let, v graviditě a laktaci, při přecitlivělosti na nabumeton, při těžší poruše funkce ledvin nebo jater a při gastroduodenální vředové chorobě.³⁾

Nežádoucí účinky

Nabumeton se vyznačuje nízkou incidencí nežádoucích účinků v porovnání s ostatními nestroidními antiflogistiky. Jedná se o gastrointestinální dyskomfort (průjem, dyspepsie, nevolnost, zácpa meteorismus), dále se mohou vyskytnout poruchy CNS jako závratě, útlum a únava.³⁾

Registrované léčivé přípravky

V České republice je registrován léčivý přípravek Relifex[®] tbl.s obsahem 500mg NAB v jedné tabletě.

Držitel registračního rozhodnutí: SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Brentford, VB.³⁾

2.3 CHROMAROGRAFIE

Principem chromatografických metod je postupné, mnohokrát opakované vytvoření rovnovážných stavů dělených směsí mezi dvěma nebo i více fázemi.

- Stacionární fáze je umístěná v koloně nebo na vrstvě.
- Mobilní fáze unáší analyzovanou směs zakotvenou stacionární fází.

Při kontaktu stacionární a mobilní fáze s dělenou směsí dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Tyto interakce jsou jak z hlediska povahy, tak z hlediska velikosti působících sil nestejně.^{6), 7), 8)}

2.3.1 KLASIFIKACE JEDNOTLIVÝCH METOD

Prvním kritériem pro klasifikaci je **separační mechanismus**. Mechanismus dělení směsi je dán charakterem interakcí mezi stacionární fází, dělenou směsí a mobilní fází. Těmito mechanismy jsou: adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt, afinita.

- **Adsorpční chromatografie.** Podstatou je různá adsorbovatelnost dělených složek směsi na aktivním povrchu stacionární fáze. Různá adsorpce je dána zejména interakcemi mezi polárními skupinami separovaných látek a stacionární fází. Dochází tedy k interakci ion – ion, dipól – dipól, dipól – ion, k interakcím indukovaných dipólů, vodíkových vazeb, u hydrofobních povrchů i na základě hydrofobního efektu atd. Tato metoda je vhodná zejména pro dělení látek lišících se typem nebo počtem polárních skupin. Mobilní fází může být kapalina i plyn. Nejčastějšími adsorbenty jsou silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý, křemelina aj.^{6), 7), 9)}
- **Rozdělovací chromatografie.** K rozdělování směsi dochází na základě různého rozdělovacího koeficientu separovaných látek dělících se mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny (stacionární fáze je ukotvená na inertním nosiči) nebo mezi kapalinu a plyn,
V kapalinové rozdělovací chromatografii, je podstatou separace různá rozpustnost dělených látek ve vzájemně nemísitelných kapalinách,

V plynové rozdělovací chromatografii je principem různá rozpustnost dělených látek nesených plynem v kapalně stacionární fázi.^{7), 9)}

- **Iontovměnná chromatografie.** Lze ji realizovat jen jako kapalinovou chromatografii. Jedná se o chemickou reakci (výměnu iontů) mezi stacionární fází a analytem. Stacionární fáze je tvořena katexy nebo anexy. Různá afinita je pak dána rozdílným počtem, velikostí, mocenstvím nebo disociační konstantou iontů, případně iontových skupin.^{6), 9)}
- **gelová chromatografie** - v systému tuhá látka-kapalina. Principem je různá přístupnost pórů gelu, které mají definovanou velikost, pro látky s rozdílnou velikostí molekul. V systému tuhá látka-plyn, hovoříme o plynové chromatografii na **molekulových sítích**. K separaci složek směsi dochází na základě různých efektivních rozměrů molekul.⁹⁾
- **Afinitní chromatografie.** Jedná se o speciální metodu izolace biologicky aktivních látek. Je založena na specifických interakcích charakteristických pro některé biologické a biochemické procesy. Interakce probíhají mezi dvojicemi látek s vysokou selektivitou, např. protilátka – antigen, hormon – receptor, enzym – inhibitor. Jako nosič se většinou používá agarosa, na kterou je kovalentní vazbou vázána jedna látka z uvedených dvojic. Takto vázaný afinant selektivně zachycuje pouze žádanou složku – svého partnera z dvojice a ostatní látky se z kolony vymyjí. Zachycená látka se následně selektivně eluuje po změně složení mobilní fáze. Jde tedy vlastně o selektivní sorpci.¹⁰⁾

Z předcházejícího textu plyne, že mobilní fáze může být kapalina, nebo plyn. **Podle skupenství mobilní fáze** můžeme tedy dělit chromatografii na plynovou a kapalinovou.

- **Plynová chromatografie (GC).** Mobilní fázi tvoří inertní plyn, stacionární je pak tvořena kapalinou (rozdělovací princip separace) nebo pevnou látkou (adsorpční princip separace).
- **Kapalinová chromatografie (LC).** Mobilní fáze je kapalina, stacionární je buď pevná látka (adsorpční princip separace) nebo kapalina (rozdělovací princip separace), která se s mobilní fází nemísí.

Technika chromatografie je závislá na způsobu transportu analyzované směsi stacionární fází. **Podle použité techniky** rozeznáváme eluční, frontální a vytěšňovací chromatografii.

- **Frontální metoda** spočívá v kontinuálním přívodu analyzované směsi na kolonu po celou dobu chromatografického procesu bez použití jiné, další mobilní fáze. Touto metodou se dá separovat pouze složka která se nejméně sorbuje
- Při **vytěšňovací** metodě je vzorek jednorázově nadávkován do proudu **mobilní fáze**, která má **vyšší afinitu** ke stacionární fázi než kterákoliv složka separované směsi. První je vytěšněna nejméně sorbovaná látka a poslední vychází mobilní fáze. Výsledkem je pak „obrácený“ chromatogram, kde výška píku udává kvalitativní a šířka kvantitativní charakteristiku látky.
- **eluční** chromatografie má nejvyšší separační účinnost a využívá se k preparacím s požadavkem vysoce účinného dělení směsi. Na kolonu se nanáší jednorázově malé množství vzorku. **Mobilní fáze, má** ke stacionární **nižší afinitu** než kterákoliv z analyzovaných látek. Látky jsou z kolony eluovány dle svých sorpčních vlastností a jsou od sebe vzájemně rozděleny. Tuto metodu lze realizovat za konstantních podmínek (isokratická eluce) ale také můžeme měnit složení mobilní fáze (gradientová eluce) Gradientová eluce se využívá zejména při iontovýměnné chromatografii s cílem lépe oddělit a urychlit proces.⁸⁾

Dle **uspořádání aparatury** rozlišujeme:

- **sloupcovou** chromatografii (plynová i kapalinová)
- chromatografii v **plošném uspořádání** -papír, tenká vrstva (pouze kapalinová)

Podle **účelu** kterému slouží rozlišujeme:

- **Analytickou chromatografii**, sloužící ke kvantitativní a kvalitativní analýze
- **Preparativní chromatografii**, používanou k čištění látek dále používaných v laboratorním měřítku
- Chromatografii **k výrobním účelům**¹¹⁾

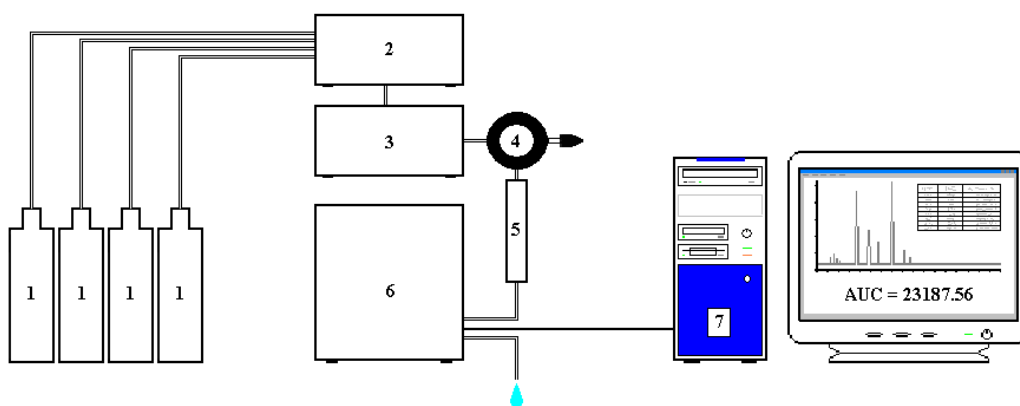
2.3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC (High performance liquid chromatography) je separační metoda, při které dochází k oddělení složek analyzované směsi na koloně naplněné sorbentem v důsledku jejich nesterjně rychlého putování ve směru toku mobilní fáze. Dle druhu náplně kolony zde mohou probíhat všechny chromatografické děje (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt). Umožňuje jak kvalitativní tak kvantitativní hodnocení vzorku. Jejými přednostmi jsou rychlost, selektivita, citlivost, malé množství nanášeného vzorku, možnost analýzy termolabilních látek, netěkavých látek a v neposlední řadě také možnost automatizace. To je také důvod širokého využívání HPLC v oblasti monitorování lékových hladin.

2.3.2.1 INSTRUMENTACE

Dnešní kapalinové chromatografy tvoří kompaktní celek integrující jednotlivé součásti a celý proces je řízen programově počítačem. Základní komponenty ze kterých sestává vysokoúčinný kapalinový chromaograf zobrazuje schéma na obrázku č.3. ⁶⁾

Obr.č.3: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu.



- 1) Zásobníky mobilní fáze, 2) Čerpadlo, 3) Směšovací zařízení, 4) Dávkovací zařízení,
- 5) Kolona, 6) Detektor, 7) Počítač,

Zásobníky mobilní fáze.

Nejčastěji kovové, skleněné nebo plastové nádoby. Bývají až čtyři a každá může obsahovat jinou složku MF. Přístroj jednotlivé složky smíchá ve směšovači v předem zadaném poměru. Kapalina tvořící MF obsahuje rozpuštěné plyny, které se uvolňují ve formě bublin. Protože je plyn lehce stlačitelný dochází ke kolísání tlaku v systému, tím ke změnám v průtoku MF, což vede ke snížení citlivosti a ovlivňuje reprodukovatelnost. Proto je nutné používat pouze odplyněnou mobilní fázi. Odplynění provádíme pomocí vakua, probublávání heliem, působením ultrazvuku nebo vzájemnou kombinací těchto metod. Mobilní fáze se ze zásobníků odvádí pomocí hadiček opatřenými filtry (nejčastěji z nerezavějící oceli). Filtry chrání čerpadla před mechanickým poškozením částicemi většími než 5 μm . Součástí moderních přístrojů je degaser, který provádí odplyňování mobilní fáze on-line.^{10),12)}

Čerpadla.

Základním požadavkem na vysokotlaká čerpadla je zajištění linearitu průtoku bez tlakových pulsů. V současnosti se používají reciproční čerpadla. V podstatě se jedná o dva až tři spojené písty koordinované pomocí elektroniky a pracující v tlakovém rozmezí 1 – 60 MPa.¹²⁾

Dávkovací zařízení.

Před vstupem do kolony se nachází dávkovač vzorku. Vzorek nanášíme pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky do dávkovací smyčky. Její objem je pevně dán a zaručuje přesné nadávkování. Dávkovač je opatřen šesticestným ventilem, který umožňuje nanášet bez přerušování průtoku mobilní fáze.⁸⁾

K nejmodernějším dávkovacím zařízením patří autosamplery, které mohou nejen nanášet vzorek na kolonu, ale i předem provádět se vzorkem požadované úpravy.¹⁰⁾

Kolony.

V koloně dochází k samotnému chromatografickému procesu a volba kolony má proto pro HPLC zásadní význam. Obecným požadavkem kladeným na kolonu je rozdělit co největší počet látek s co největší účinností v co nejkratším čase. Účinnost

kolon závisí na kvalitě použitého sorbentu, její délce, vnitřní geometrii, materiálu z něhož je zhotovena a na různých dalších faktorech jako je způsob plnění atd.⁸⁾

Na výrobu kolon se nejčastěji používá sklo, nebo nerezavějící ocel. Na materiálu závisí hlavně velikost pracovního tlaku. Skleněné kolony se hodí pro pracovní tlak do 30 MPa. Vnitřní průměr analytických kolon se pohybuje v rozmezí 2,1-4,6 mm a délka od 5 do 25 cm. Náplně kolon můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny.¹²⁾

1. Polymerizované sorbenty
2. Nepolymerizované sorbenty

Sorbenty polymerizovaných náplní jsou založené na principu prostorové sítě složené z styren-divinyl-benzenu, nebo to jsou makromolekulární matrice obsahující kyselou nebo zásaditou funkční skupinu

- katexové (anion - sulfoskupiny)
- anexové (kation - tetraalkylamoniové skupiny)

Tyto náplně jsou využívány v iontové výměnné chromatografii.¹²⁾

Sorbenty nepolarizovaných náplní jsou tvořeny nejčastěji SiO_2 , Al_2O_3 nebo ZrO_2 . Zirkoniové náplně mají oproti silikagelu daleko vyšší tepelnou a chemickou stabilitu. Dnes se z výhodou používá chemicky vázaných stacionárních fází. Převážně se jedná o silikagel na jehož hydroxilové skupiny je chemicky navázán alifatický řetězec různé délky (C8, C18) tzv. reverse phase, případně nesoucí různé skupiny viz. tab.1^{10),12)}

Tab.č.1: Příklady chemicky vázaných fází

Typ sorbentu	Navázaný řetězec	klesající polarita
volný silikagel SiO_2	-	↓
ethylhydroxy	$-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$	
propylkyano	$-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$	
propylamino	$-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$	
oktasilan	C8	
oktadecilsilan	C18	

Vzhledem k tomu, že většina léčiv má nízkou polaritu, nebo jsou nepolární, využívá se k jejich analýze kolon C18 s reverzně vázanou náplní. V tomto případě je

stacionární fáze nepolární a MF polární. Mechanismus interakcí vzorku a stacionární fáze je zde založen na tvorbě vodíkových můstků nebo Van der Waalsových sil.

Pro opticky aktivní látky se používají chirální stacionární fáze.^{8) 13)}

Detektory

Detektor sleduje signál eluovaných látek po jejich separaci na koloně. Zaznamenává některou z vlastností analytu, lišící se od vlastností MF. Signál je zesílen a kvalitativně i kvantitativně vyhodnocován počítačovým systémem.¹²⁾

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- Vysoká citlivost
- Reprodukovatelnost a linearita odezvy
- Nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- Univerzálnost-detekce všech oddělených složek vzorku

Některé vlastnosti nejužívanějších detektorů uvádí tab.č.2⁷⁾

Tab.č.2: HPLC detektory, selektivita a citlivost

Detektor	Selektivita	Citlivost [g/ml]
ultrafialový	ano	10^{-10}
infračervený	ano	10^{-6}
konduktometrický	ano	10^{-8}
amperometrický	ano	10^{-10}
fluorimetrický	ano	10^{-15}
hmotnostní spektr.	ano	10^{-18}
refraktometrický	ne	10^{-7}

Spektrofotometrické detektory UV, VIS.

Jsou nejčastěji používanými detektory, měří v UV nebo VIS oblasti spektra. V obou případech se využívá skutečnosti, že řada léčiv obsahuje dvojně vazby nebo aktivní skupiny, které v UV, nebo VIS absorbují a zároveň existuje řada rozpouštědel používaných jako mobilní fáze, které v této části spektra neabsorbují. Pokud

analyzované látky neabsorbují nebo je jejich molární absorpční koeficient nedostatečný pro citlivé stanovení, převádí se na vhodný derivát.^{8), 9), 10)}

Spektrofotometrické detektory s proměnlivou vlnovou délkou se využívají ve více než 80% měření. Jsou vysoce citlivé, i když o něco méně než detektory s pevnou vlnovou délkou, nebo filtrové s několika vlnovými délkami, oproti nim však disponují širokou škálou použitelnosti. Mají velkou oblast linearitu odezvy, jsou selektivní a umožňují jako mobilní fázi volit poměrně mnoho rozpouštědel.

Diode-array detector. (DAD) Je vybavený diodovým polem (až několik set diod) řízeným mikropočítačem, které umožňuje snímat celé absorpční spektrum eluátu, v rozmezí 1nm několikrát za vteřinu. Výsledky se ukládají do paměti přístroje. Výstupem je třírozměrný chromatogram, jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu.^{8), 9), 10)}

Infračervené detektory.

Infračervená spektrometrie je dnes v praxi běžně používanou metodou pro identifikaci sloučenin a řešení strukturálního uspořádání v molekule. Je rovněž založena na absorpci části záření jednotlivými molekulami analytu. IČ záření má ale ve srovnání s UV malou energii a nemění tak elektronový stav molekuly. Dochází ke změnám ve vibračních a rotačních pohybech molekuly. Absorbovaná kvanta energie zvyšují vnitřní energii připadající na vibrace atomů v molekule a rotaci jednotlivých částí molekuly.¹⁰⁾

Fluorimetrické (fluorescenční) detektory.

Principem je schopnost analyzované látky absorbovat UV excitační záření z intenzivního zdroje a přitom vydávat emisní (fluorescenční) záření o větší vlnové délce a tedy nižší energii než jakou má záření excitační. Použitelnost lze rozšířit vhodnou derivatizací, zavedením fluoroforu do molekuly stanovované látky. Jedná se o vysoce selektivní detektor, jehož odezva nezávisí na kolísání teploty a vyznačuje se dobrou linearitou. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič a přemění se na elektrický signál, jehož velikost je úměrná toku fluorescenčního záření.^{8), 9), 10)}

Elektrochemické detektory.

Principem měření je elektrochemická reakce na fázovém rozhraní elektroda-roztok (nejčastěji oxidačně-redukční). Sleduje se změna chování elektrochemického článku při měnícím se složení eluátu. Podstatou jsou vztahy mezi elektrickými

veličinami a koncentrací (c) sledované složky. Vliv ostatních závislých veličin se eliminuje např. udržováním na konstantní nebo nulové hodnotě. Měření probíhá tak, že se měří příslušná veličina buď za konstantního potenciálu pracovní elektrody, nebo za konstantního proudu. Mezi elektrochemické detektory řadíme např.: polarografické, voltampérometrické, coulometrické aj.^{8), 9)}

Hmotnostní detektor (MS).

MS detektory pracují s ionizovanými molekulami, které rozdělují dle poměru jejich hmotnosti a náboje. MS sestávají z iontového zdroje (ionizační komora), hmotnostního analyzátoru a samotného detektoru. Nejčastější typy ionizace ve spojení LC/MS:

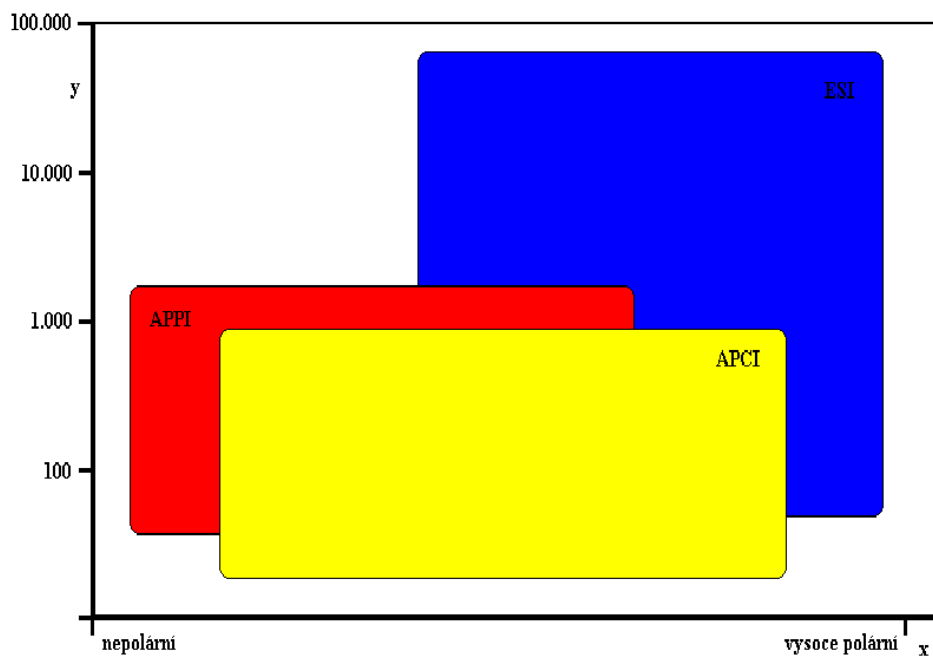
- Elektrosprejová ionizace (ESI)
- Chemická ionizace za normálního tlaku (APCI)
- Fotoionizace za normálního tlaku (APPI)

Všechny mají společné, to že pracují za atmosférického tlaku. Mobilní fáze je do komory vstříkována (nebulizována) ve formě aerosolu, který je tepelně převáděn do plynného skupenství a zároveň vysoušen přiváděným plynem, čímž dochází k zkoncentrování. Následně dochází k ionizaci molekuly a případně ke vzniku molekulárních fragmentů. Vzniklé ionty pak odcházejí kapilární dávkovací tryskou do hmotnostního analyzátoru. Typy hmotnostních analyzátorů:

- Quadrupol
- Trojitý quadrupol
- Sférická iontová past
- Lineární iontová past
- Analyzátor doby letu
- Iontová cyklotronová rezonance

Analyzátor slouží k výběru iontů podle poměru hmotnost a náboje, které pak pokračují na detektor. Můžeme skenovat celý obsah eluátu, nebo zúžit výběr jenom na ionty které nás zajímají.

Výstupem z LC/MS je záznam časové závislosti na hmotnostním spektru, které vypovídá o molekulární hmotnosti, identitě kvantitě a čistotě sledované látky.¹⁴⁾



Graf.č.1: Aplikace techniky ionizace v závislosti na polaritě (osa x) a molekulové hmotnosti (osa y)

Ostatní typy detektorů.

Vodivostní detektor, mikroadsorpční detektor, kapacitní detektor.^{8), 9)}

2.3.2.2 CHROMATOGRAFICKÉ PARAMETRY

Eluční parametry: Při chromatografii protéká mobilní fáze stálou rychlostí. Od nanesení na kolonu do okamžiku kdy látka kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý čas, který závisí na sorbovatelnosti látky v daném chromatografickém systému a tedy na jejím druhu. Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky v koloně, označuje se jako retenční, nebo eluční čas t_R . K eluci látky je zapotřebí aby kolonou protekl určitý objem mobilní fáze. Také ten může látku charakterizovat jako tzv. retenční nebo eluční objem V_R . Oba údaje jsou si při stálé rychlosti mobilní fáze úměrné a lze je vyjádřit vztahem

$$V_R = t_R F_M$$

kde F_M je množství mobilní fáze protečené kolonou za jednotku času. Eluční objem je dán součtem dvou objemových veličin

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde V'_R je skutečný retenční objem a V_M mrtvý objem představující celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku, přes kolonu až po detektor. Mrtvý objem V_M se zjistí experimentálně jako retenční objem nesorbující se látky.

Analogicky se retenční čas nesorbované látky vyjádří jako mrtvý retenční čas t_M . Poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky A se označuje jako retenční faktor Rf

$$Rf = \frac{t_M}{t_R}$$

kteřý může mít hodnotu 0 až 1. Retenční čas pak můžeme vyjádřit vztahem

$$t_R = t'_R + t_M$$

Pro chromatografickou analýzu je účelné, aby Rf nevybočovalo z rozsahu asi 0,2 až 0,8.

V HPLC se dále pracuje s redukovaným retenčním časem t'_R , což je absolutní čas látky naměřený za běžných podmínek zmenšený o mrtvý retenční čas.

$$t'_R = t_R - t_M$$

K charakterizaci míry sorpce solutu na koloně slouží kapacitní faktor K což je bezrozměrná veličina

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M}$$

Kapacitní faktor vyjadřuje poměr celkového množství chromatografované látky ve stacionární fázi k celkovému množství této látky v mobilní fázi. K je přímo úměrný distribuční konstantě K_D

$$K = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

kde V_S je objem stacionární fáze.

Pro kvalitativní vyjádření rozdělení látek obsažených ve vzorku nám slouží veličina zvaná rozlišení R_S

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

kde w_1 a w_2 jsou šířky píků v jejich základně a t_{R1} a t_{R2} jsou příslušné retenční časy. V případě, že retenční časy vztahujeme na šířku píku v polovině výšky píku, musíme použít vzorec:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{1,0,5} + w_{2,0,5}}$$

Pro hodnocení účinnosti kolony byly zavedeny pojmy výškový ekvivalent teoretického patra H a počet teoretických pater n .

Pro výpočet počtu teoretických pater platí vztah

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

kde w je šířka píku při jeho bázi. V případě, že měříme šířku píku v polovině výšky, platí pro výpočet množství teoretických pater vztah

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

Čím větší je n , tím větší je účinnost kolony.

V případě, že známe počet teoretických pater n a celkovou délku kolony L , můžeme vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra H .

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

Pokud dosadíme výše jmenované rovnice do vztahu pro parametr rozlišení, je možné odvodit a popsat tři faktory, na kterých je rozlišení závislé:

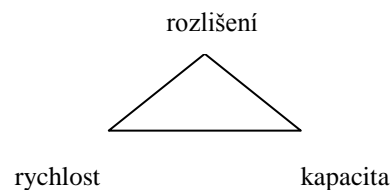
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K}{K + 1} \right)$$

kde $\frac{\sqrt{N}}{4}$ je účinnost, $\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$ je selektivita a $\left(\frac{K}{K + 1} \right)$ je kapacita.

Selektivitu kolony můžeme vyjádřit pomocí relativní retence, kde platí vztah ^{8), 12), 15), 16)}

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{K_2}{K_1}$$

Dosažení optimálních separačních hodnot představuje kompromis mezi třemi faktory a to mezi rozlišením, kapacitou a rychlostí. Vzájemný vztah je možné schematicky znázornit pomocí chromatografického trojúhelníku (Obr.č.4): Vzájemný vztah těchto tří veličin je možné ovlivňovat změnou sorbentu, složením mobilní fáze, pH a teplotou¹²⁾



Obr.č.4: Vztah separačních hodnot

2.3.2.3 HODNOCENÍ V HPLC

Signál z detektoru je po příslušném zesílení registrován integrátozem nebo počítačem, čímž získáme chromatografický záznam, chromatogram ve formě píků pro kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení analýzy.⁷⁾

Kvalitativní analýza.

Pro identifikaci složek směsi rozdělené vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsou významná retenční data (retenční čas). Nejvýhodnější postup identifikace složky je porovnání retenčních charakteristik daného píku s údaji standardních látek. Nejspolehlivější je přitom metoda standardního přídavku do dělené směsi a provedení druhého měření.⁷⁾

Průkaznou identifikaci jednotlivých složek směsi je možné provést v zařízeních spojujících HPLC a hmotnostní spektrometr (HPLC-MS) tzv. on-line analýza, případně porovnání kompletních UV-VIS spekter získaných použitím diode array detektoru.⁷⁾

Kvantitativní analýza.

Kvantitativní zastoupení složky ve směsi je dáno plochou pod píkem. U symetrických píků lze ke zjištění koncentrace stanovované složky (c_x) využít způsob přímého srovnání výšek píků standardu (h_s) a stanovované složky (h_x):

$$c_x = (h_x \cdot c_s) / h_s$$

Obsah látky ve vzorku se zjišťuje vždy relativně s použitím standardů. Při metodě vnějšího standardu se porovnává plocha píku stanovované složky s plochou píku standardu stanovované složky, analyzovaného za stejných podmínek. Při metodě vnitřního standardu (IS) se přidá přesně známé množství standardní látky přímo do analyzované směsi před chromatografií. Protože standard i vzorek jsou při tomto způsobu provedení vystaveny stejným vlivům, dochází tím k jejich eliminaci. Podmínkou je úplné oddělení IS od ostatních složek směsi. ■

2.4 PŘÍPRAVA VZORKU

Jedná se o velmi důležitou část HPLC analýzy a jejím úkolem je získat homogenní, reprodukovatelný roztok vhodný k nástřiku na kolonu. Cílem je zbavení se možných interferujících látek, ochrana chromatografické kolony získání vzorku rozpustného v mobilní fázi a jeho zkoncentrování. Dalším úkolem přípravy vzorku může být derivatizace pro zlepšení detekce nebo separace.

Materiál ze kterého získáváme vzorky může být anorganického nebo organického původu plynného, kapalného nebo pevného skupenství. Látka navíc bývá rozpuštěná , nebo dispergovaná v jiných materiálech, jako jsou biologické matrice, léčivé přípravky v různých lékových formách aj.¹⁰⁾

Tab.č.3: Procesy při přípravě vzorku:

Získávání vzorku	statisticky validovaným procesem
Skladování a uchovávání vzorku	používání adekvátních kontejnerů a procesů s ohledem na povahu materiálu
Předúprava vzorku	sušení, drcení rozemílání, prosévání
Navazování a ředění	s obezřetností na reaktivní, nestabilní nebo biologické materiály, za použití kalibrovaného laboratorního vybavení
Alternativní předúprava	odsolování, odpařování, vymrazování...
Odstraňování částic	filtrace, centrifugace
Extrakce sledovaných látek	LLE, SPE
Derivatizace	zlepšení detekce případně separace

2.4.1 ÚPRAVA BILOGICKÉHO MATERIÁLU

V některých ojedinělých případech se dá vzorek biologické materiálu aplikovat metodou přímého nástřiku. Nejčastěji se takto aplikuje vzorek moči, která obsahuje relativně málo endogenních látek. Aby bylo možno použít tuto metodu, musí být mimo jiné, ve vzorku vysoká koncentrace stanovované látky a minimální interference endogenních látek s použitou detekční metodou. Aplikace biologických tekutin na kolonu vede k jejímu rychlému ucpání, proto se při této metodě používají tzv. předkolony, které částečně hlavní analytickou kolonu chrání. Zvláštním případem přímého nástřiku je technika přepínání kolon „column switching HPLC“. Vzorek biologického materiálu se nastříkne, rozpouštědlem z jednoho čerpadla je vnesen na kolonku, kde je zadržena analyzovaná látka (endogenní látky prochází do odpadu). Přepnutí ventilu umožní, že mobilní fáze z druhého čerpadla vymyje z kolonky zadržanou látku a ta je unášena na analytickou kolonu.¹²⁾

Nejčastější způsoby úpravy vzorku biologického materiálu.^{12), 17)}

- deproteinace (vysrážení proteinů)
- extrakce do organických rozpouštědel (LLE)
- extrakce na pevných fázích (SPE)

2.4.1.1 DEPROTEINACE.

Deproteinací se zabránilo vysrážení proteinů na koloně. Po deproteinaci se vzorek centrifuguje a alikvot čirého supernatantu se nanáší na kolonu, nebo při nízké koncentraci léčiva se supernatant odpaří do sucha a odparek je pak rozpuštěn v minimálním množství mobilní fáze.¹²⁾

Deproteinace biologického materiálu musí splňovat tyto podmínky:¹⁷⁾

- kompletní odstranění proteinů
- precipitát nesmí adsorbovat na svůj povrch sledované léčivo)
- deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo ani interferovat při detekci

Proteiny můžeme odstraňovat několika způsoby:¹⁷⁾

- precipitací srážecími činidly
- enzymovou deproteinací
- ultrafiltrací

Precipitace.

Pracujeme s činidly, které jsou s vodou mísitelná. Používají se:^{12), 17)}

- organická rozpouštědla (methanol, ethanol, acetonitril, aceton)
- silné kyseliny (trichloroctová, trifluoroctová, chloristá, fosforečná, chlorovodíková)
- soli těžkých kovů ($ZnSO_4$ a NaOH, $ZnSO_4$ a $Ba(OH)_2$, $CuSO_4$ a Na_2WO_4 a H_2SO_4)
- kombinace (methanol a kyselina chloristá, acetonitril a ultrazvuk)

Enzymová deproteinace.

Jedná se o proteolýzu enzymem (trypsin, papain, sobtilisin, ketodas aj.) Její výhodou je šetrnost k analyzované látce.¹⁷⁾

Ultrafiltrace.

Tímto způsobem se oddělí volné (nízkomolekulární) léčivo od léčiva vázaného (makromolekula) přechodem přes semipermeabilní membránu.¹⁷⁾

2.4.1.2 SPE - EXTRAKCE NA PEVNÝCH FÁZÍCH.

Elegantní, jednoduchá a rychlá metoda k čištění a izolaci sloučenin z roztoků s použitím pevného sorbentu, vykazující dobrou výtěžnost a reprodukovatelnost.¹²⁾

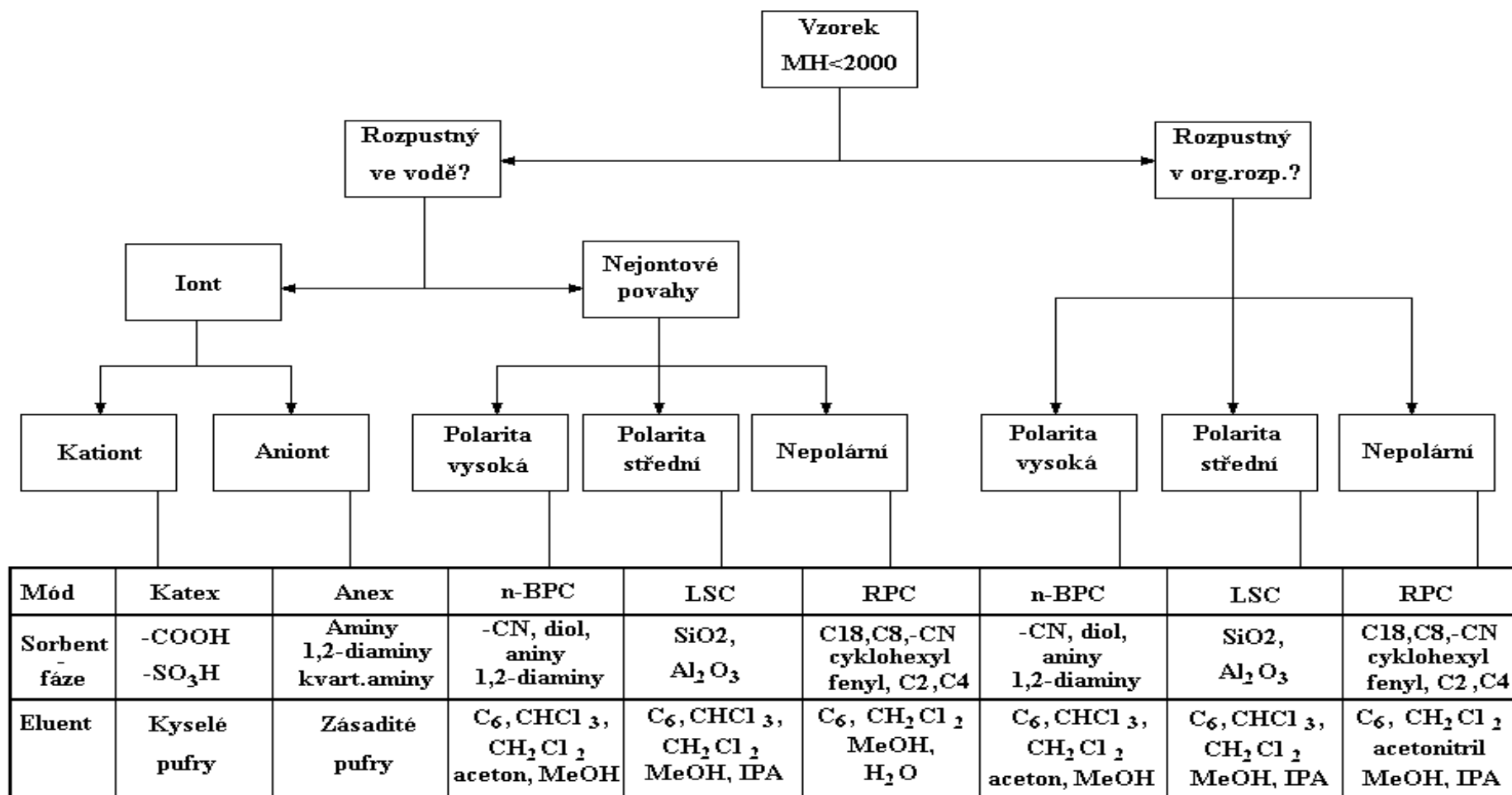
Sorbenty můžeme rozdělit na dvě skupiny.

- polární sorbenty (silikagel, oxid hlinitý, oxid hořečnatý, křemelina, chemicky vázaný kyanopropyl, aminopropyl, propylkarboxylové

kyseliny, nebo ionexové kvartérní amíny, benzensulfonová a propylsulfonová kyselina)

- nepolární (aktivní uhlí, celulóza, polystyrénové sorbenty, chemicky vázané fáze C8 a C18)

Kolonky jsou jednorázové, sériově vyráběné. Extrakci lze provést přetlakem nebo podtlakem, pomocí extrakčního vakuového zařízení. Kolonka se před extrakcí aktivuje pomocí methanolu a vody, poté se nanese zkoumaný vzorek, následuje promytí vodou (odstranění endogenních látek) a nakonec eluce vhodným extrakčním činidlem.¹⁷⁾



Obr.č.5: Schéma postupu při SPE. Příklady sorbentů, použitelných fází a elučních rozpouštědel. Kde n-BPC je kolonka s navázanou polární fází, LSC je normální fáze, RPC je reverzně vázaná fáze, IPA je isopropylalkohol.

2.4.1.3 LLE - EXTRAKCE DO ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL.

Látky se rozdělují podle Nernstova zákona mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny v rozdělovacím poměru K . Ten je dán poměrem celkové koncentrace látky v organické fázi k celkové koncentraci této látky ve vodné fázi. Rozpouštědla volíme tak, aby K byl co největší. Nejdůležitější faktory při LLE.^{10),12)}

- fyzikálně chemické vlastnosti léčiva
- pH vodní fáze
- vzájemný poměr fází
- způsob a doba trvání extrakce

Polarita rozpouštědla se volí podle fyzikálně chemických vlastností extrahovaných látek. Nepochární rozpouštědla mají nízkou dielektrickou konstantu, polární rozpouštědla vysokou dielektrickou konstantu. Cílem je zvolit rozpouštědlo (příp. směs rozpouštědel), kde bude extrahovaná látka nejlépe rozpustná. Přehled rozpouštědel uvádí tabulka č.4. Podmínky kladené na rozpouštědla:¹⁰⁾

- nemísitelnost s H_2O
- nesmí reagovat s extrahovanou látkou
- snadná těkavost (extrakt se zpravidla zahušťuje)
- čistota rozpouštědla (zpravidla destilace na koloně)

Tab.č.4: č. Přehled rozpouštědel

Vodná rozpouštědla	Organická rozpouštědla nemísitelná s vodou	organická rozpouštědla mísitelná s vodou (nepoužitelná pro LLE)
voda	alifatické uhlovodíky	alkoholy (do C_6)
kyselá rozpouštědla	diethylether a jiné ethery	ketony (do C_6)
zásaditá rozpouštědla	methylen chlorid, chloroform	nízkomolekulární aldehydy
solné roztoky	ethylacetát a jiné estery	nízkomolekulární karboxylové kyseliny
komplexotvorná, iontpárová, chelatovná činidla	alifatické ketony (C_6 a víc)	acetonitril
kombinace předešlých	alifatické alkoholy (C_6 a víc)	dimethylsulphoxid, dioxan
	toluen, xyleny (UV absorbce!) kombinace předešlých	

Do organického rozpouštědla přechází pouze neionizovaná forma léčiva, proto je důležité nastavit vhodné pH vodní fáze. Většina léčiv má charakter slabých kyselin nebo bazí (vyjádřeno hodnotou pKa). Vztah mezi pKa a pH tedy poměr ionizované a neionizované formy popisuje Henderson-Hasselbalchova rovnice

$$\text{pro kyseliny} \quad pKa = pH + \log \frac{[c_N \text{ kyseliny}]}{[c_D \text{ kyseliny}]}$$

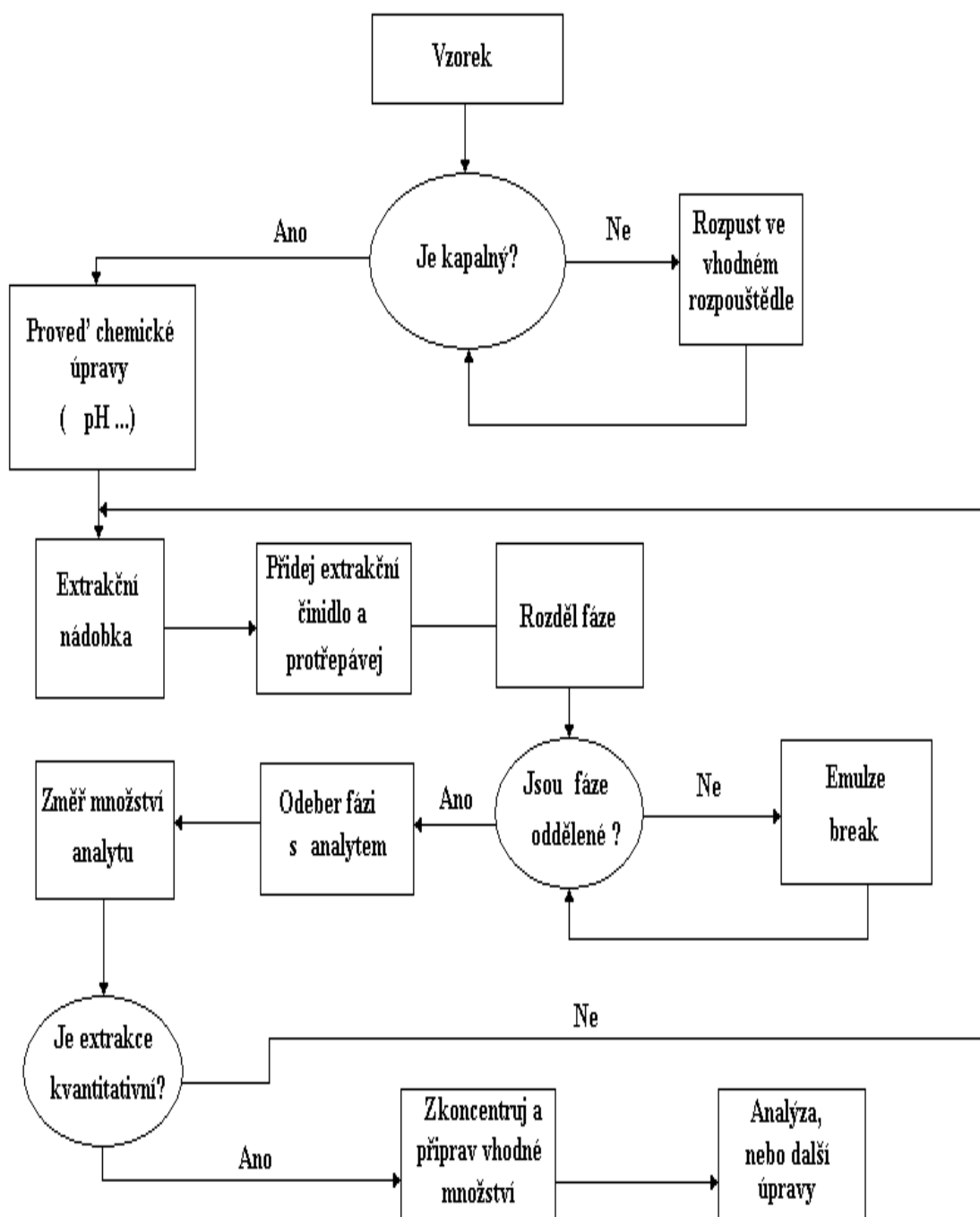
$$\text{pro baze} \quad pKa = pH + \log \frac{[c_D \text{ baze}]}{[c_N \text{ baze}]}$$

Hodnotu pH upravujeme nejčastěji pomocí různých pufrů, eventuálně pomocí kyselin nebo zásad, pokud tyto nemají vliv na změnu struktury extrahované látky tak, aby poměr mezi nedisociovanou a disociovanou složkou byl 100 : 1 tj. aby nedisociovaný podíl tvořil nejméně 99%.

Změna poměru fází. Nejčastěji se poměr vodné a organické fáze pohybuje mezi 1 : 5 až 1 : 10. Větším množstvím organického rozpouštědla se zvyšuje extrahovatelnost sledované látky.

LLE provádíme s pomocí třepačky kde je důležitá intenzita třepání, doba třepání, poloha extrakční zkumavky atd. Následuje Centrifugace (přičemž sledujeme otáčky/minutu a dobu centrifugace). Nakonec oddělíme organickou fázi a zahustíme proudem N_2 , (příp. za zvýšené teploty).¹⁷⁾

Obr.č.6: Schéma LLE procedury



Některé problémy spojené s LLE:

- Vytvoření emulze
- Analyt se silně váže na částice
- Analyt se váže na vysokomolekulární složky – v biologickém materiálu zejména na proteiny
- Fáze se částečně vzájemně mísí

Vytvoření emulze je problém který se může vyskytovat u některých vzorků (např. matrice obsahuje tuky) nebo je dán vlastnostmi rozpouštědel. Pokud nejsou jednotlivé fáze ostře ohraničeny a tedy rozděleny na vodní a organickou složku, je významně ovlivněna výtěžnost analytu. Emulzi můžeme rozdělit (break) :

- Přidáním soli do vodní fáze
- Zahříváním nebo chlazením extrakční baňky
- Filtrací přes skelnou vatu
- Filtrací přes fázově-separační filtrační papír
- Centrifugací

Pokud jsou ve vzorku obsaženy částice, může adsorbce analytu na ně způsobit nízkou výtěžnost. V takových případech se po filtraci vzorku promývá filtrát silnějším rozpouštědlem. Silnější rozpouštědlo získáme změnou pH, zvýšením iontové síly nebo použijeme polárnější rozpouštědlo.

Nízká výtěžnost může být dána vazbou na proteiny. Toto je problém zejména měření hladin léků a jejich metabolitů z fyziologických tekutin. Řešením může být:

- Přidání detergentu
- Přidání organického rozpouštědla nebo silné kyseliny
- Naředěním vodou
- Vytěsněním látkou, která se váže silněji.

I vzájemně nemísitelné roztoky mají malou, omezenou vzájemnou mísitelnost. Tímto může být narušen relativní objem obou fází. V praxi se to řeší vzájemnou saturací

obou rozpouštědel v separační baňce. Teprve takto saturovaná rozpouštědla se použijí pro LLE.¹⁰⁾

2.5 VALIDACE METODY

Selektivní a sensitivní analytické metody pro kvantitativní hodnocení léčiv a jejich metabolitů jsou základem pro úspěšné provádění preklinických, biofarmaceutických a klinických farmakologických studií. Bioanalytické metody validace zahrnují všechny procesy, které určují, že daná metoda použitá pro kvantifikaci analytu v biologickém vzorku, jako je krev, plazma, sérum, nebo moč, je spolehlivá a reprodukovatelná pro zamýšlené použití.¹⁸⁾

Úplná validace je nutná vždy

- když provádíme bioanalytickou metodu poprvé
- jedná-li se o analýzu nové látky
- když zkoumáme metodou nový metabolit

příklady kdy se vyžaduje částečná validace

- metodu provádíme v jiné laboratoři, nebo jiným analytikem
- provádíme změny v detekčním zařízení
- měníme způsob extrakce z biologického materiálu
- měníme biologickou matrix (plazma – moč)
- měníme živočišný druh ze kterého matrix pochází
- provádíme instrumentální, nebo softvérové změny

Základní parametry pro validaci:¹⁹⁾

linearita
správnost (accuracy)
přesnost (precision) – opakovatelnost
- reprodukovatelnost
selektivita
detekční limit
kvantifikační limit
robustnost (ruggedness)

2.5.1 LINEARITA

Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Linearita analytické metody se doloží buď graficky, nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Uvádí se korelační faktor (míra linearity), směrnice (míra citlivosti)

Test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky v rozmezí 50 – 150 % deklarovaného obsahu a stanovení minimálně pět různých koncentrací standardní látky.²⁰⁾

2.5.2 SPRÁVNOST

Správnost je test charakterizující těsnost shody mezi výsledkem analýzy a přijatou referenční hodnotou. Referenční hodnotou může být skutečný známý obsah látky, nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou, které správnost je zaručena.

Pokud se stanovovaná látka nachází v matrici jež může při měření interferovat, testuje se správnost metody pomocí standardního přídávku účinné látky k samotné matrici nebo k analyzovanému přípravku.

Statisticky se správnost hodnotí pomocí výtěžnosti (R), která se vypočítá podle vzorce:

$$R(\%) = 100 \cdot c_i / c_0$$

kde c_i je zjištěná koncentrace a c_0 skutečná koncentrace.²¹⁾

2.5.3 PŘESNOST

Přesnost analytické metody je míra shody mezi výsledky nezávislých měření homogenního vzorku.

Má tři složky:

opakovatelnost (repeability),	kdy se opakovaně měří stejný vzorek jedním pracovníkem na stejném zařízení
intermediární přesnost,	která vyjadřuje variabilitu uvnitř laboratoře, mění-li se analytici a zařízení
reprodukovatelnost (reproducibility),	kdy se stejný vzorek analyzuje různými pracovníky na různých zařízeních v různých laboratořích. ^{21), 22)}

Přesnost stanovujeme nejméně ze šesti nezávislých analýz provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Zjišťuje se tak chyba celého analytického postupu.^{20) 22)}

Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka RS_D .

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

y_i – naměřené hodnoty vyjádřené jako poměr ploch stanovované látky ku vnitřnímu standardu, \bar{y} – průměr naměřených hodnot, n – počet naměřených hodnot.

Vyžaduje se pouze doložení opakovatelnosti.²¹⁾

2.5.4 SELEKTIVITA

Selektivita je schopnost analytické metody kvantitativně stanovit analyt v přítomnosti možných vedlejších látek (nečistot, rozkladných produktů případně pomocných látek u léčiv). Přesnost stanovení analyzované látky nesmí být těmito látkami ovlivněna. Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez a vzorku s přidanými vedlejšími látkami. Selektivitu je také možné doložit jako výtěžnost standardního přídávku čisté látky k materiálu, obsahujícímu stálé množství jiných látek, případně stačí doložit např. chromatogramy blanku, známých vedlejších a rozkladných produktů a podobně.²⁰⁾²¹⁾

2.5.5 DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ LIMIT

Detekční limit (LOD) je nejnižší deklarovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. Definuje se jako trojnásobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu – šumu.

Kvantitativní limit (LOQ) je nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Definuje se jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu (S_N).

Směrodatnou odchylku šumu lze odhadnout při měření blanku, ze záznamu šumu v okolí retenčního času stanovované látky. Středem šumu se narýsuje nulová linie a od ní se změří nejvyšší kladná (r^+) a záporná (r^-) amplituda šumu.

$$S_N = (r^+ - r^-) / 5$$

$$LOD = 3S_N \frac{K}{b_1}$$

$$LOQ = 10S_N \frac{K}{b_1}$$

Kde K (plocha píku/výška píku) je poměr charakteristický pro stanovovanou látku a b_1 (plocha píku/koncentrace analytu) je poměr daný směrnici regresní rovnice z kapitoly linearita.²¹⁾

2.5.6 ROBUSTNOST

Robustnost je míra schopnosti metody dávat správné a přesné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek ke kterým může docházet i když pracovní postup zůstává zachován. Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. Je vhodné upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky, např. průtoková rychlost, změna pH, změna poměru složek mobilní fáze.

Stanovení robustnosti zvyšuje důvěryhodnost metody při jejím dlouhodobém rutinním použití a potvrzuje možnost přenesení metody do jiných laboratorních podmínek. Výsledkem testování metody je tolerované rozmezí hodnot předepsané pro každý parametr metody. K tomuto testu se připraví jeden vzorek standardu analyzované látky. Před jednotlivými analýzami se změni pracovní podmínky podle parciálního faktorového experimentu.²⁰⁾²¹⁾

2.6 HPLC METODY HODNOCENÍ NABUMETONU A 6MNA V ODBORNÉ LITERATUŘE

Tab.č.5: Analýza NAB v lidské plazmě pomocí HPLC.²³⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	Výtěžnost [%]	Korelační koeficient
LLE (ethylacetat)	NAB	Cisapride	Nova-Pack C18 (150x3,9) předkolona 4x3 C18	acetonitril, 0,02% triethylamin okyselená H ₃ PO ₄ (85%) na pH 7 50:50	1,4	Fluorescenční Ex 230 nm Em 356 nm	0,313	> 80	0,999

Tab.č.6: Simultánní analýza naproxenu, NAB a 6MNA z léčiv a lidské moči.²⁴⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	Výtěžnost [%]	Korelační koeficient
SPE (Bond-Elut Certify II, reversní f. s anexem)	NAB	methyl p-toluate	Wakosil 5C18 150x4,6	HSA 0,5g/1000ml acetonitril voda triethylamin 500:500:1	1	UV 270 nm	1,5	> 90	> 0,999
	6MNA						0,2	> 90	> 0,999
	Naproxen						0,3	> 90	> 0,999

Tab.č.7: Srovnávací studie biotransformace a rozkladu NAB v člověku a čínském praseti pomocí HPLC.²⁵⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [nmol/ml]	Výtěžnost [%]	Korelační koeficient
SPE (Superclean LC18, eluce Me-OH)	NAB 6MNA 3 rozkladné produkty fáze I.	Naproxen	LiChroCARD 125x4 LiChrospher 100 RPC18 LiChroCART 4-4	acetonitril voda CH ₃ COOH 45:55:1	1	UV 265 nm	1	80	0,998
							0,2	78	0,999
od 1 do 9							82 - 87	0,995 - 0,998	
1	81						0,999		
1	78						0,999		
od 1 do 9							81 - 85	0,999	
LLE (Diethylether)	NAB 6MNA 3 rozkladné produkty fáze I.	Naproxen	LiChroCARD 125x4 LiChrospher 100 RPC18 LiChroCART 4-4	acetonitril voda CH ₃ COOH 45:55:1	1	Fluorescenční Ex 230 nm Em 350 nm	0,01	80	0,999
							0,01	79	0,999
							0,01 - 0,02		81 - 84
LLE (Diethylether)	NAB 6MNA 3 rozkladné produkty fáze I.	Naproxen	LiChroCARD 125x4 LiChrospher 100 RPC18 LiChroCART 4-4	acetonitril voda CH ₃ COOH 45:55:1	1	Fluorescenční Ex 230 nm Em 350 nm	0,01	79	0,999

Tab.č.8: Identifikace a určení NAB metabolitů II. Fáze.²⁶⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce
LLE (Diethylether)	NAB	Naproxen	LiChroCARD 125x4 LiChrospher 100 RPC18 LiChroCART 4-4	acetonitril voda CH ₃ COOH A) - 45:55:1 (NAB, 6MNA) B) - 10:90:1 (metabolity fáze II.)	1	DAD 195 - 380 s 1 nm posunem, následně MS
	6MNA					
	rozkladné produkty fáze II.					

Tab.č.9: Stanovení NAB a 6MNA v lidské plazmě HPLC metodou. Rešerše z Chemical Abstracts.²⁷⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí c [μg/ml]
–	NAB	2-(6-methoxy-2-naftyl)-propionová kyselina	–	methanol acetátový pufr 0,05mol/l pH 3 65:35	–	–	1,0 - 40,0
	6MNA						

Tab.č.10: Vývoj HPLC metody pro výzkum rozkladu nabumetonu a tiaprofenové kyseliny po expozici teplotě 40°C a UV záření.²⁸⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	t _R [min]	Korelační koeficient
-	NAB	-	reversní chemicky vázaná C18	acetonitril, 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ pH 3 4:6	1,2	UV 254 nm	500	31,4	-
	rozkladné látky						-	2 - 25 a 41 - 47	
-	NAB	-		acetonitril, voda 6:4	1	UV 332 nm	500	7,6	-
	rozkladné látky						-	-	

Tab.č.11: Studie bioekvivalence nabumetonu z tablet dvou různých výrobců v lidském séru metodou HPLC.²⁹⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	t _R [min]	Korelační koeficient
LLE (ether)	NAB	2 - naftol	reversní chemicky vázaná C18	acetonitril 1,5% CH ₃ COOH 25:75	1	UV - 280 nm	1000	13	> 0,999

Tab.č.12: Stanovení nabumetonu a 6MNA v plazmě metodou HPLC.³⁰⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [v/v/v]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	Výtěžnost [%]	Korelační koeficient
LLE (n-hexan - ethylacetát 50:50)	NAB	6-chloro-2- naftyloct. kys.	reversní chemicky vázaná C18	methanol acetátový pufr 0,05mol/l pH 3 70:30	1	Fluorescenční Ex 284 nm Em 320 nm	250	92	0,999
	6MNA						100	93	0,999

Tab.č.13: Stanovení nabumetonu a 6MNA v plazmě a v tabletách pomocí HPLC.³¹⁾

Extrakce	Sledovaná látka	IS	Kolona	Mobilní fáze [ml/ml/ml]	Průtoková rychlost [ml/min]	Detekce	LOQ [ng/ml]	Výtěžnost [%]	Korelační koeficient
LLE (n-hexan - ethylacetát 50:50)	NAB	-	reversní chemicky vázaná C18	acetonitril, triethylamin, CH ₃ COOH koncentrovaná, voda 500:1,5:8: ad 1000	2	UV 270 nm	1500	93,3 - 95,2	0,999
	6MNA						1100	94,1 - 96	0,999

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo určit jednak vhodný způsob izolace NAB a 6MNA z plné králičí krve HPLC metodou za simultánního stanovení obou složek a jednak zvalidovat tuto metodu. V práci jsou testovány základní validační parametry: linearita, přesnost, správnost, robustnost, selektivita a detekční a kvantifikační limit.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, MATERIÁL A POMŮCKY

4.1.1 HPLC SESTAVA

Čerpadlo: LCP 4120, ECOM s.r.o., Praha, ČR

Dávkovač: Rheodyne s 10 µl a 20µl smyčkou, Rheodyne, Cotati, CA, USA

Analytická skleněná kolona: SeparonTM SGX-C-18, 150 x 3,3mm ID, (7,5 µm),
Tessek, Praha, ČR

UV detektor: LCD 2084, ECOM s.r.o., Praha, ČR

PC s programem: CSW, DataApex s.r.o., Praha, ČR

4.1.2 PŘÍSTROJE

Elektrická třepačka: Chirana, Stará Turá, SR

Centrifuga: T51, VEB, MLW Engesdorf, SRN

Ultrazvuková lázeň: K10, Kraitex s.r.o. SR

Vakuové zařízení: Visiprep, Supelco, USA

Extrakční kolonka: SILICA-cart SGX-18 Tessek, Praha, ČR

PH metr: MV 870, Präcitronic, SRN

Vodní vývěva

4.1.3 POMŮCKY

kádinky, Erlenmayerovy baňky, odměrné baňky, odměrné válce, odsávací baňky,
zkumavky, centrifugační zkumavky laboratorní lžička

svorky, držáky

dělené pipety, nedělené pipety, pipetík

mikrostříkačka, Hamilton, Švýcarsko

4.1.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

plná králičí krev, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové,
katedra patologické fyziologie

4.1.5 LÉČIVA A CHEMIKÁLIE

acetonitril p.a., Lachema, Neratovice, ČR

dihydrogenfosforečnan draselný BP 73, ZZ, Praha, ČR

dichlormethan, p.a., Lachema, Brno, ČR, přečištěný destilací

fosforečnan sodný, Lachema, Brno, ČR

kyselina fosforečná 85%, p.a., Lachema, Neratovice, ČR

kyselina 6-methoxy-2-naftyloctová, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA

methanol, p.a., Lachema, Neratovice, ČR,

nabumeton, Sigma, St. Louis, MO, USA

naproxen, Sigma, St. Louis, MO, USA

voda čištěná

4.2 PŘÍPRAVA PUFRU A MOBILNÍ FÁZE

4.2.1 FOSFOREČNANOVÝ PUFŘ

Fosforečnanový pufr jsem připravil dle ČSL 4, smícháním 88,9 ml základního roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného 0,066 mol/l a 11,1 ml základního roztoku hydrogenfosforečnanu sodného 0,066 mol/l. Na příslušné pH jsem pufr upravil pomocí 5% H_3PO_4 .³²⁾

4.2.2 MOBILNÍ FÁZE

Methanol-fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 60 : 40 Methanol jsem před smísením s pufrům 20 min. odplyňoval vakuem, stejně tak fosforečnanový pufr. Po smísení v příslušném poměru jsem vakuem odplyňoval ještě 2 min. Dále byla mobilní fáze probublávána heliem.

4.3 CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY

- **Kolona:** C-18, 150 x 3,3mm ID, (7,5 µm).
- **Mobilní fáze:** methanol-fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 60 : 40.
- **Průtoková rychlost:** 0,4 ml/min, tlak 14,6 MPa.
- **Detekce:** UV při vlnové délce 231 nm.
- **Vnitřní standard:** naproxen
- **Dávkovací smyčky:** 10 a 20 µl

4.4 IZOLACE NAB A 6MNA Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

4.4.1 ÚPRAVA DEPROTEINACÍ

Vzorek jsem si připravil z 0,2 ml plné krve, 50 µl methanolického roztoku NAB 0,1 mg/ml a 50 µl methanolického roztoku 6MNA 0,01 mg/ml. Vzorek jsem hemolyzoval 0,2 ml destilované vody, 5 min. třepal a na 5 min vystavil působení ultrazvuku. Deproteinaci jsem provedl přidáním 0,5 ml methanolu a opět 5 min. třepal. Centrifugoval jsem 5 min. při 3600 ot/min. Z vzorku jsem odebral supernatant a tímto byl vzorek připraven k nástřiku na kolnu.

4.4.2 IZOLACE NA PEVNÝCH FÁZÍCH (SPE)

Sledované látky jsem izoloval z plné králičí krve. Vzorek jsem si připravil z 0,2 ml plné krve, 50 µl NAB 0,1 mg/ml a 50 µl 6MNA 0,01 mg/ml. Vzorek jsem podrobil deproteinaci, kterou jsem prováděl pomocí 0,5 ml methanolu a následně okyselil fosforečnanovým pufrem pH 1,5. Vzorek jsem 5 min. třepal, poté vystavil na 5 min. působení ultrazvuku a následně 5 min. centrifugoval při 3600 ot/min. Na kolonku jsem nanášel 1,2 ml čirého supernatantu.

K provedení SPE jsem využíval extrakční kolonky C18. Kolonku jsem musel nejprve aktivovat 5 ml methanolu a poté 5 ml destilované vody. Na takto připravenou kolonku jsem nanášel čirý supernatant (1,2 ml). Abych odstranil balastní látky, promyl jsem kolonku 5 ml destilované vody. Jako extrakční činidlo jsem opět použil 3 ml dichlormethanu. Eluát z kolonky jsem odpařil mírným proudem dusíku do sucha a odparek rozpustil v 200 µl mobilní fáze. Tímto byl vzorek připraven k nástřiku na analytickou kolonu.

Práci s extrakční kolonkou jsem prováděl na vakuovém zařízení pro extrakci na kolonách.

4.4.3 EXTRAKCE ORGANICKÝM ROZPOUŠTĚDLEM (LLE)

Biologickým materiálem ze kterého jsem extrahoval NAB a 6MNA byla plná králičí krev. Vzorek jsem si připravil z 0,2 ml plné krve, 50 μ l methanolického roztoku NAB 0,1 mg/ml a 50 μ l methanolického roztoku 6MNA 0,01 mg/ml, a 50 μ l methanolického roztoku IS 0,01mg/ml. Vzorek jsem hemolyzoval 0,2 ml destilované vody, 5 min. třepal a na 5 min vystavil působení ultrazvuku. Okyselil přidáním 0,5 ml fosforečnanového pufru pH 1,5 a 5 min. třepal. Následovalo přidání 3 ml extrakčního činidla – dichlormethanu a opět 5 min. třepání. Centrifugoval jsem 5 min. při 3600 ot/min. Z vzorku jsem odebral 2 ml organické fáze a odfoval mírným proudem dusíku. Odparek jsem rozpustil v 200 μ l mobilní fáze. Tímto byl vzorek připraven k nástřiku na kolonu.

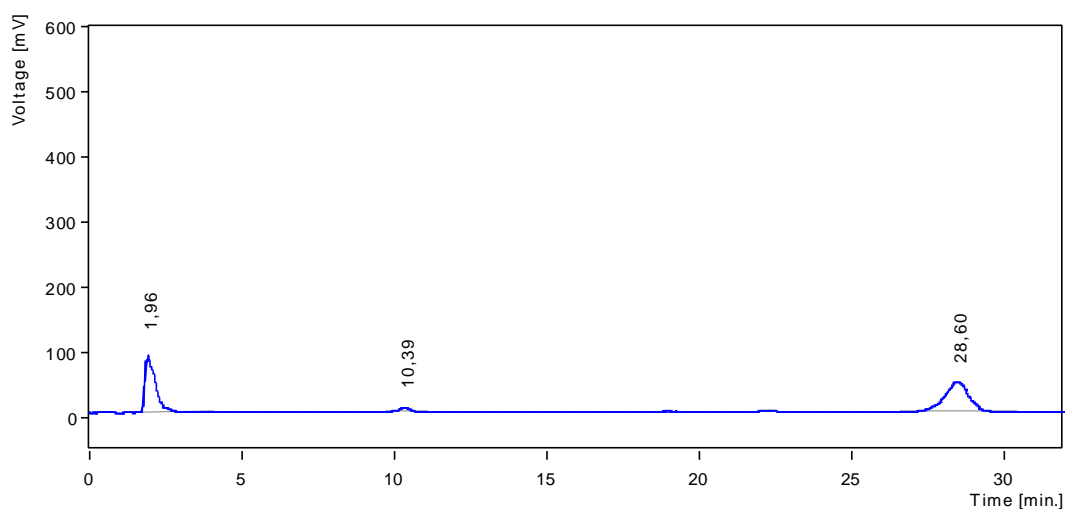
5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 STUDIE ÚPRAV VZORKŮ PLNÉ KRVE PŘI ANALÝZE NAB A 6MNA

V rámci studia úprav vzorku plné krve při analýze nabumetonu a kyseliny 6 methoxy-2-naftyloctové jsem zkoušel 3 nejčastěji užívané izolační postupy. Cílem bylo vybrat nejvhodnější postup pro analýzu obou látek v plné krvi, kterým by byl možno nejlépe stanovit obě látky. Chromatografické podmínky uvedené v kap 4.3 jsem převzal ze své diplomové práce.³³⁾

5.1.1 ÚPRAVA VZORKU DEPROTEINACÍ

Úprava vzorku pomocí deproteinace je rychlá a jednoduchá metoda. Vzorek jsem si připravil z 0,2 ml plné krve, 50 μ l methanolického roztoku NAB 0,1 mg/ml a 50 μ l methanolického roztoku 6MNA 0,01 mg/ml. Vzorek jsem hemolyzoval 0,2 ml destilované vody, 5 min. třepal a na 5 min vystavil působení ultrazvuku. Deproteinaci jsem provedl přidáním 0,5 ml methanolu a opět 5 min. třepal. Centrifugoval jsem 5 min. při 3600 ot/min. Z vzorku jsem odebral supernatant a naněs na kolonu (10 μ l).



Obr.č.7: HPLC chromatogram vzorku plné krve s NAB a 6MNA - supernatant po deproteinaci methanolem.

Chromatografická kolona: reverzní chemicky vázaná C18
Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)
Detekce: UV λ 231 nm

Z chromatogramu je zřejmé, že dochází k výraznému poklesu výtěžnosti. Je to dáno zejména nízkou koncentrací analytu – vzorek není před nástřikem zahuštěn. Je

také možné, že dochází k vazbě sledovaných složek na precipitát. Při použití acetonitrilu jako deproteinačního činidla za stejných podmínek jako u methanolu byl výsledek extrakce ještě horší. Úpravu vzorku pouhou deproteinací proto nelze pro dané podmínky aplikovat.

5.1.2 IZOLACE NAB A 6MNA POMOCÍ SPE A DEPROTEINACÍ

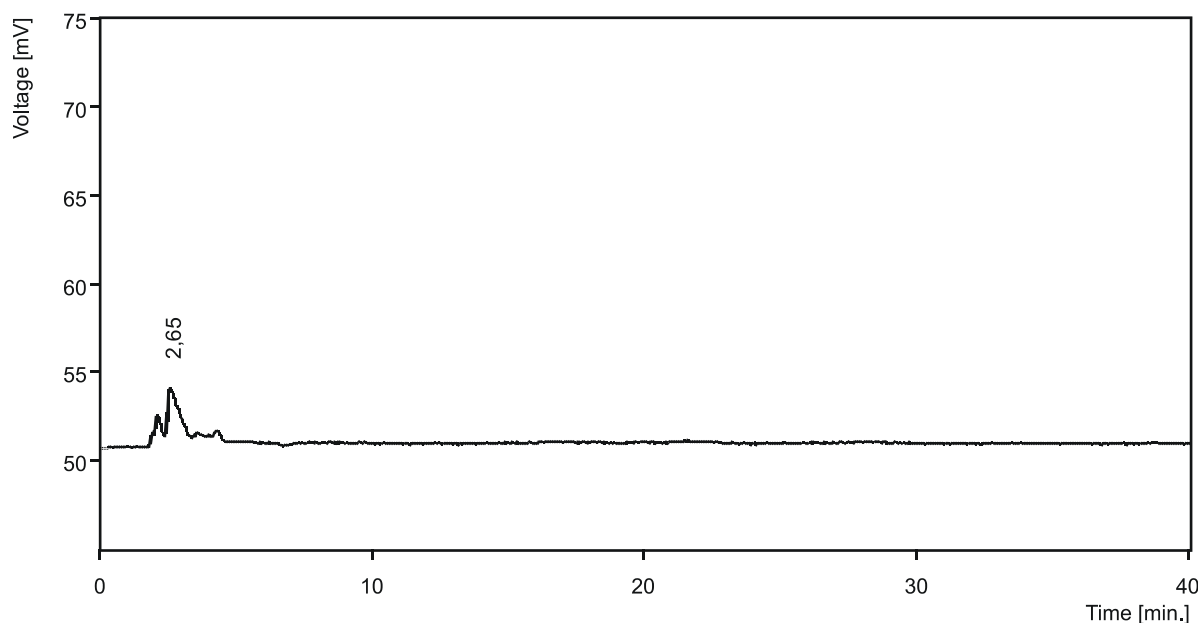
Při i SPE docházelo po aplikaci hemolyzovaného vzorku na extrakční kolonu k postupnému ucpávání kolony, což se projevovalo nárůstem tlaku. Bylo proto nutné odstranit většinu balastních látek z analyzovaného vzorku. Vzorek plné krve byl nejprve upraven deproteinací methanolem a na extrakční kolonu byl nanesen supernatant. Se supernatantem se extrakční kolona neucpávala a SPE byla proveditelná. Optimální postup SPE s předchozí deproteinací vzorku plné krve je uveden v kapitole 4.4.2.

Po vypracování izolačního postupu pro nabumeton a 6MNA byl postup aplikován i na modelový vzorek obsahující vnitřní standard.

Výtěžnost izolace jsem hodnotil pomocí porovnání píků standardu, kterým byl methanolickeý roztok NAB 0,1 mg/ml 6MNA 0,01 mg/ml a IS 0,01mg/ml naředěný na odpovídající koncentraci. Na kolonu jsem nanášel 10 µl vzorku i standardu.

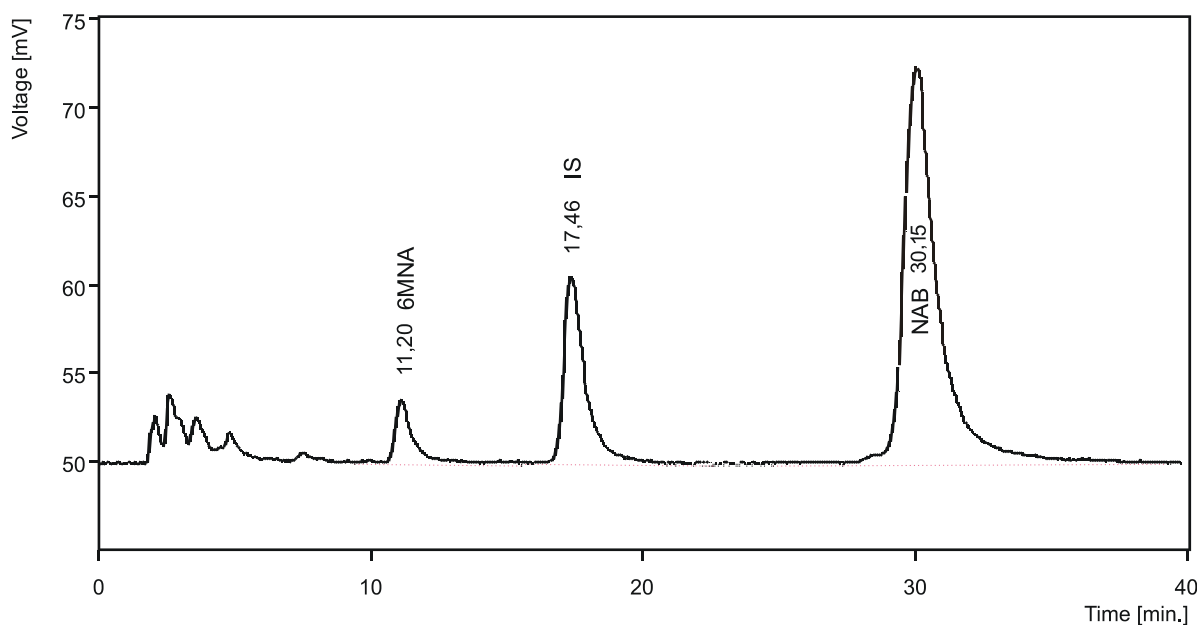
Nejllepší výtěžnosti jsem dosahoval použitím methanolu jako deproteinačního činidla a fosforečnanového pufru pH 1,5 k okyselení a to 90,41% u 6MNA a 71,03% u NAB.

Extrakci na pevných fázích jsem nakonec pro provedení HPLC analýzy nezvolil, protože se mi nedařilo reprodukovat výsledky výtěžnosti.



Obr.č.8: HPLC chromatogram plné krve bez NAB a 6MNA. SPE (viz.kap. 4.4.2)

Chromatografická kolona: reverzní chemicky vázaná C18
 Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)
 Detekce: UV λ 231 nm



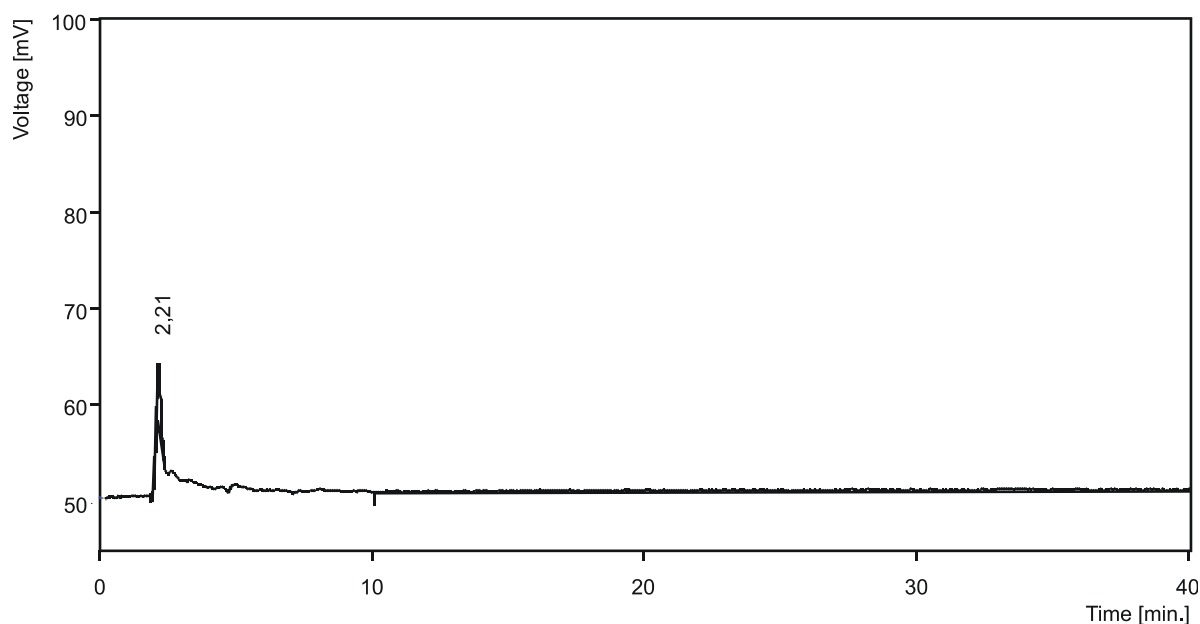
Obr.č.9: HPLC chromatogram vzorku plné krve obsahujícího NAB, 6MNA a IS. SPE (viz. kapitola 4.4.2.)

Chromatografická kolona: reverzní chemicky vázaná C18
 Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5(60 : 40)
 Detekce: UV λ 231 nm

5.1.3 IZOLACE NAB A 6MNA POMOCÍ LLE

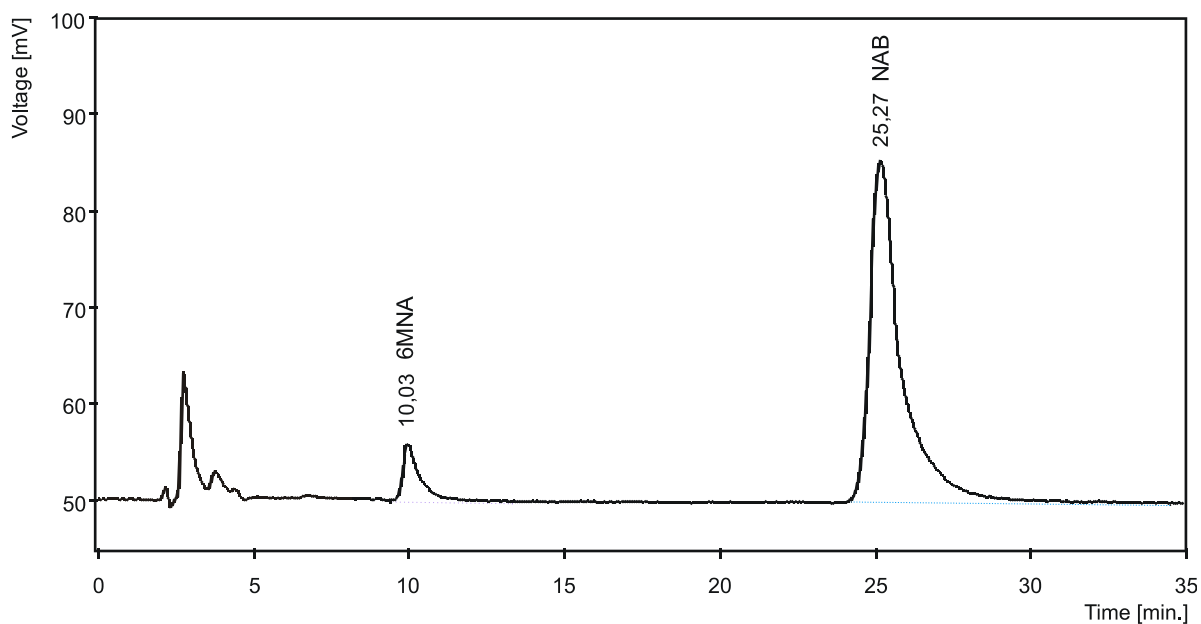
LLE jsem se zabýval ve své diplomové práci a proto uvádím pouze konečné provedení viz. kapitola (4.4.3).³³⁾

Výtěžnost izolace jsem hodnotil pomocí porovnání píků standardu, kterým byl methanolický roztok NAB 0,1 mg/ml a 6MNA 0,01 mg/ml, naředěný na odpovídající koncentraci. Výtěžnost 6MNA byla 88,76% u NAB pak 83,01%. Na kolonu jsem nanášel 10 μ l vzorku i standardu



Obr.č.10: HPLC chromatogram plné krve bez NAB a 6MNA. LLE (viz.kapitola 4.4.3.)

Chromatografická kolona: reverzní chemicky vázaná C18
Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)
Detekce: UV λ 231 nm



Obr.č.11: HPLC chromatogram vzorku plné krve obsahujícího NAB a 6MNA. LLE (viz.kapitola 4.4.3.)

Chromatografická kolona: reverzní chemicky vázaná C18
 Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)
 Detekce: UV λ 231 nm

Z ohledem na dobrou reprodukovatelnost a přibližně stejnou výtěžnost jsem se rozhodl použít pro HPLC analýzu úpravu vzorku LLE.

5.2 TESTOVÁNÍ VALIDAČNÍCH PARAMETRŮ

5.2.1 LINEARITA

Linearita byla hodnocena proměřením čtyř kalibračních roztoků. Pro přípravu vzorků jsem použil LLE. HPLC analýza probíhala za podmínek uvedených v (4.4.3).

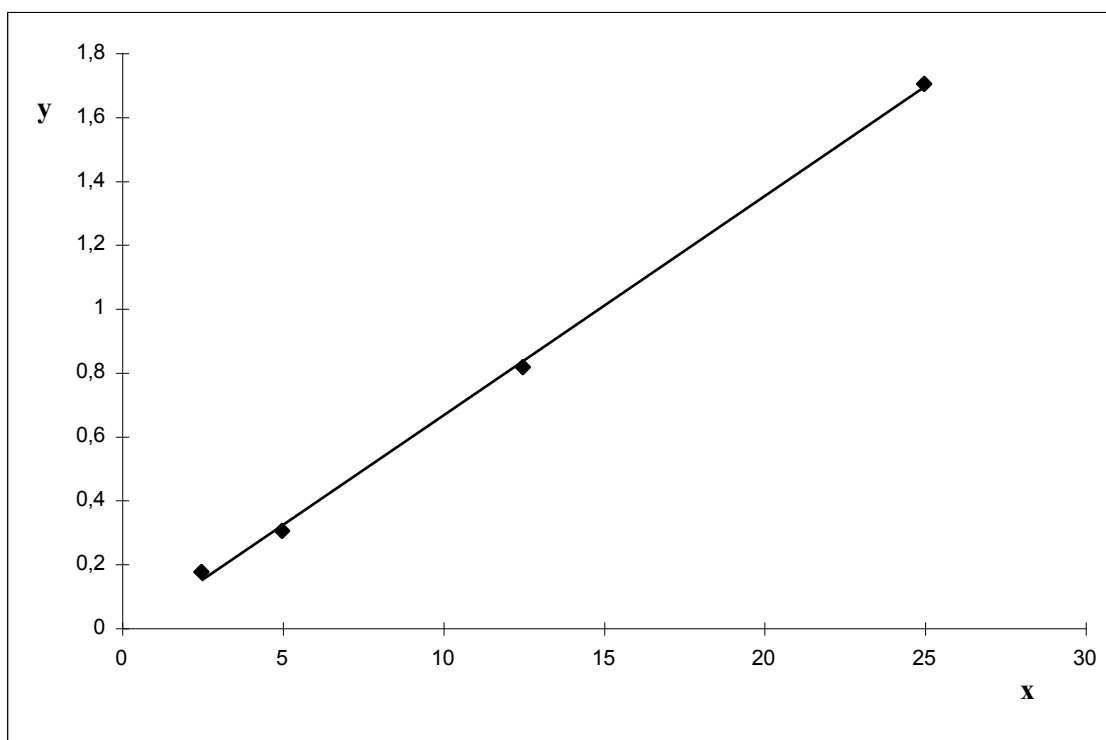
Vzorky pro kalibrační křivku byly tvořeny 0,2 ml plné krve 50 μ l NAB a 50 μ l 6MNA s odstupňovanou koncentrací, a 50 μ l IS vždy 0,01 mg/ml. Jednotlivé koncentrace uvádí tabulka č.14.

Tab.č.14: Koncentrace NAB, 6MNA a IS [μ g/ml]
plné krve ve vzorcích na linearitu

Vzorek č.	NAB	6MNA	IS
1.	25	2,5	2,5
2.	12,5	5	2,5
3.	5	12,5	2,5
4.	2,5	25	2,5

Postup přípravy vzorku uvádím v kapitole (4.4.3) HPLC podmínky byli následující: stacionární fáze reverzní chemicky vázaná C18, mobilní fáze methanol fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 60 : 40, průtoková rychlost 0,4 ml/min, tlak 14,6 MPa. UV detekce při vlnové délce 231 nm. Na kolonu jsem nanášel 20 μ l.

S každým vzorkem jsem provedl pět měření. Sledoval jsem poměr výšek píků NAB a 6MNA s IS. Kalibrační křivku znázorňují grafy č.2. a 3



Graf č.2: Závislost poměru výšek pík NAB/IS (osa y) na koncentraci [$\mu\text{g/ml}$] (osa x)

vzorek	x [$\mu\text{g/ml}$]	y (h NAB/ h IS)
1	25	1,701082322
2	12,5	0,814083587
3	5	0,301802893
4	2,5	0,173222959

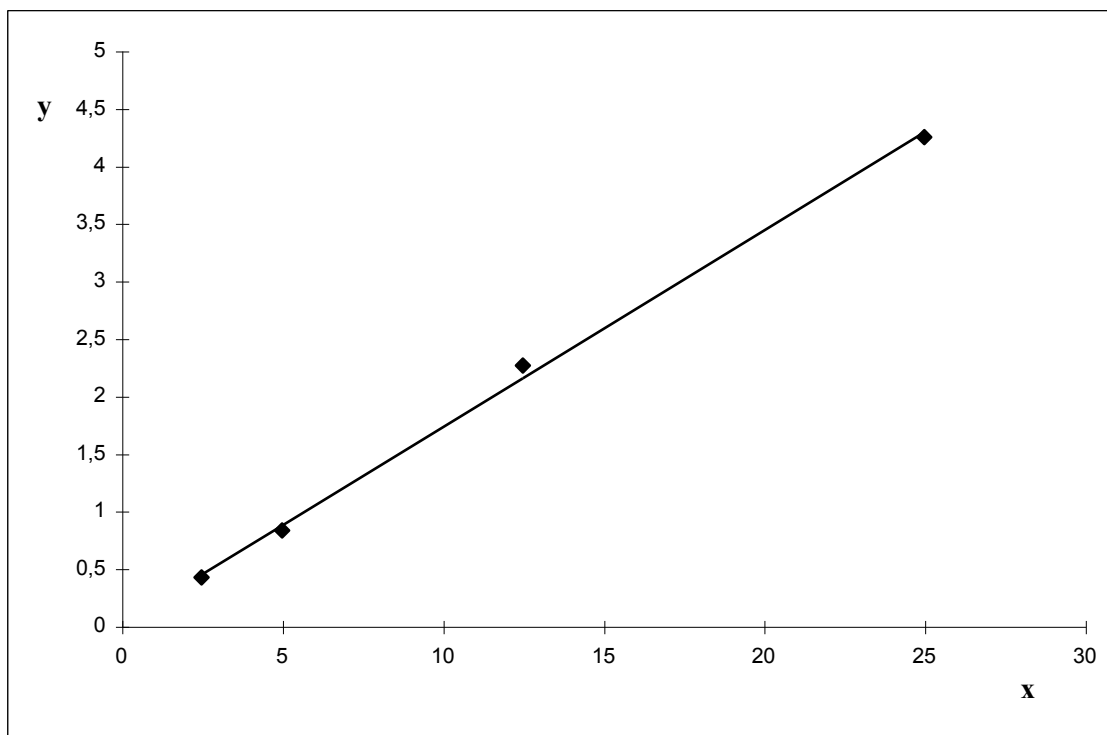
Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n = 4$ počet stupňů volnosti: $\nu = 2$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	$k = 0,0686$	$\pm 0,0015$
absolutní člen	$q = -0,024$	$\pm 0,022$

koeficient korelace	$R = 0,9995$
reziduální odchylka	$s_{\text{rez}} = 0,0268$

hodnota F-statistiky	$F = 2,01\text{E}+3$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí	99,9%



Graf č.3: Závislost poměru výšek píků 6MNA/IS (osa y) na koncentraci [$\mu\text{g/ml}$] (osa x)

vzorek	x [$\mu\text{g/ml}$]	y (h 6MNA/ h IS)
1	2,5	0,420690884
2	5	0,830543948
3	12,5	2,261412485
4	25	4,248615666

Regresní funkce : $y = kx + q$

počet: bodů $n = 4$ počet stupňů volnosti: $v = 2$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek		
směrnice	$k = 0,171$	$\pm 0,005$
absolutní člen	$q = 0,016$	$\pm 0,072$

koeficient korelace	$R = 0,99913$
reziduální odchylka	$s_{\text{rez}} = 0,0883$

hodnota F-statistiky	$F = 1,15\text{E}+3$
Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí	99,9%

5.2.2 SPRÁVNOST

Připravil jsem 6 vzorků postupem uvedeným v kapitole (4.4.3), o následujícím složení: 0,2 ml plné králičí krve, 50 μ l NAB o koncentraci 0,1 mg/ml, 50 μ l 6MNA o koncentraci 0,02 mg/ml a 50 μ l IS (naproxen) o koncentraci 0,01mg/ml. Každý vzorek jsem proměřil 5x a pro výpočet byl použit poměr výšek píků NAB/IS a 6MNA/IS jako průměr těchto pěti měření.

Koncentrace jednotlivých složek ve vzorku přepočtené na μ g/ml plné krve jsou uvedeny v tabulce č.15.

Tab.č.15: Koncentrace NAB, 6MNA a IS přepočtené na μ g/ml plné krve

NAB	6MNA	IS
25	5	2,5

Postup úpravy vzorků byl stejný jako v případě vzorků na linearitu, stejné byly i podmínky provedení HPLC analýzy. Získané poměry výšek píků analyzovaných látek a vnitřního standardu jsem dosadil do kalibrační křivky a odečetl koncentrace nabumetonu a 6-methoxy-2-naftylctové kyseliny.

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulkách č.16 a č.17.

Tabulka č.16: Poměry výšek píků ke standardu a nalezené a skutečné koncentrace 6MNA.

Vzorek	c 6MNA nalezená [μ g/ml]	h 6MNA/IS	skutečná c [μ g/ml]	REC%
1.	4,5209	0,78953998	5	90,418
2.	4,7141	0,82258004		94,282
3.	4,7987	0,83704789		95,974
4.	4,5361	0,7921394		90,722
5.	4,5101	0,78769302		90,202
6.	4,6065	0,80417884		92,13
Průměr	4,6144	0,80552986		92,288

Tabulka č.17: Poměry výšek píků ke standardu a nalezené a skutečné koncentrace NAB.

Vzorek	c NAB nalezená [μg/ml]	h NAB/IS	skutečná c [μg/ml]	REC%
1.	24,3442	1,64567185	25	97,3768
2.	24,2692	1,64052764		97,0768
3.	24,2471	1,63901181		96,9884
4.	24,2828	1,64146046		97,1312
5.	24,5714	1,66125537		98,2856
6.	24,3423	1,64554153		97,3692
Průměr	24,3428333	1,64557811		97,37133

5.2.2.1 PŘESNOST

Roztok pro test přesnosti byl připraven způsobem popsáním v kapitole (4.4.3) s následujícím složením: 0,2 ml plné králičí krve, 50 μl NAB o koncentraci 0,02 mg/ml, 50 μl 6MNA o koncentraci 0,01 mg/ml a 50 μl IS (naproxen) o koncentraci 0,01mg/ml.

Provedl jsem šest nástřiků, výšky píků (h) NAB a 6MNA jsem dal do poměru k výšce píků IS a vypočítal průměrnou hodnotu (h_P) těchto poměrů, směrodatnou odchylku S_D , a relativní směrodatnou odchylku RS_D podle vzorců:

$$S_D = \sqrt{\sum (h_P - h_i)^2 / (n-1)}$$

$$RS_D = 100 \cdot S_D / h_P$$

Kde h_P je průměr naměřených hodnot, h_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako poměr výšek stanovované látky a IS, n je počet jednotlivých hodnot.

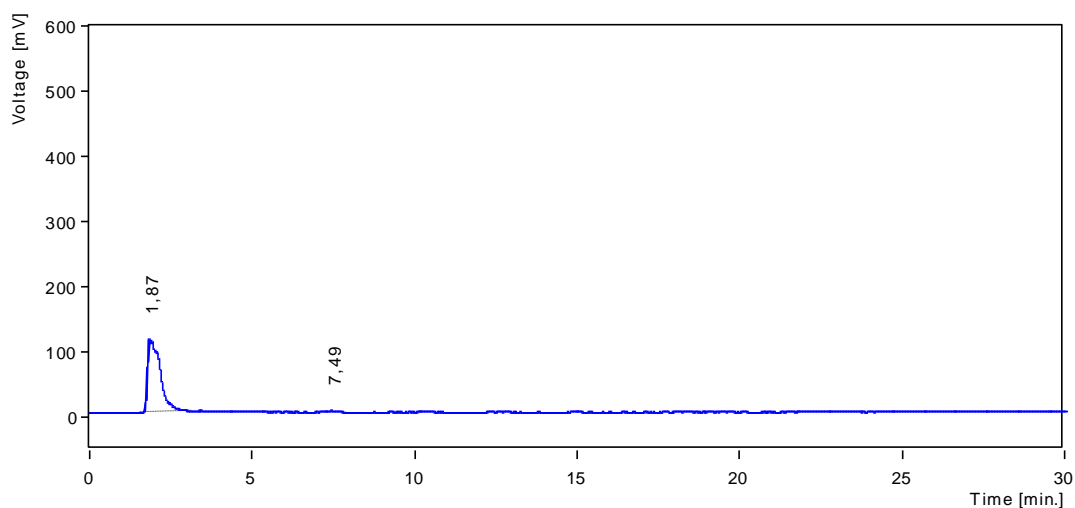
Výsledky měření a vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.18.

Tabulka č.18: Přesnost RS_D NAB a 6MNA

Nástřík č.	h NAB/IS	h 6MNA/IS
1.	0,31634	0,1172918
2.	0,298702	0,115647
3.	0,307998	0,1162693
4.	0,311144	0,1161025
5.	0,307621	0,1167624
6.	0,306569	0,116128
průměr	0,308062333	0,116366833
S_D	0,005797607	0,000577343
RS_D %	1,881959055	0,496140193

5.2.2.2 SELEKTIVITA

Selektivita byla testována srovnáním chromatogramu blanku obrázek č. 12 a chromatogramu vzorku obrázek č.13. Z chromatogramů je zřejmé, že retenční časy NAB, 6MNA, IS neinterferují mezi sebou ani s píky a šumem blanku.

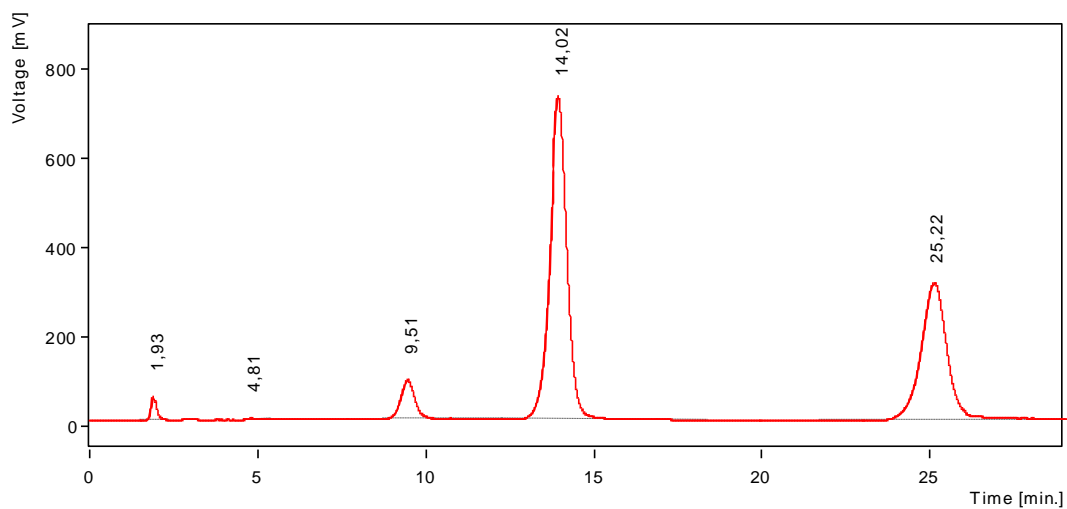


Obr.č.12: HPLC chromatogram vzorku plné králičí krve bez analyzovaných látek, upravený dle postupu (4.4.3).

Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)

Průtoková rychlost: 0,4 ml/min

Detekce: UV λ 231 nm



Obr.č.13: HPLC chromatogram vzorku plné králičí krve s 6MNA (9,51), IS (14,02), a NAB (26,22), upravený dle postupu (4.4.3).

Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)

Průtoková rychlost: 0,4 ml/min

Detekce: UV λ 231 nm

5.2.2.3 DETEKČNÍ A KVANTIFIKAČNÍ LIMIT

Detekční (*LOD*) a kvantifikační (*LOQ*) limit jsem zjišťoval výpočtem podle vztahů

$$LOD = 3Sn \frac{K}{b1}$$

$$LOQ = 10Sn \frac{K}{b1}$$

kde *Sn* je směrodatná odchylka šumu, *K* je poměr plochy a výšky píku charakteristický pro stanovovanou látku a *b1* poměr plochy píku ke koncentraci analytu daný směrnici regresní rovnice. Směrodatnou odchylku lze odhadnout ze změřených šumu v okolí *t_R* stanovovaných látek z chromatogramu plné krve bez přidavku těchto látek. Výpočet *Sn* je pak

$$Sn = \frac{(r^+ - r^-)}{5}$$

kde *r⁺* je největší a *r⁻* nejmenší hodnota amplitudy šumu.

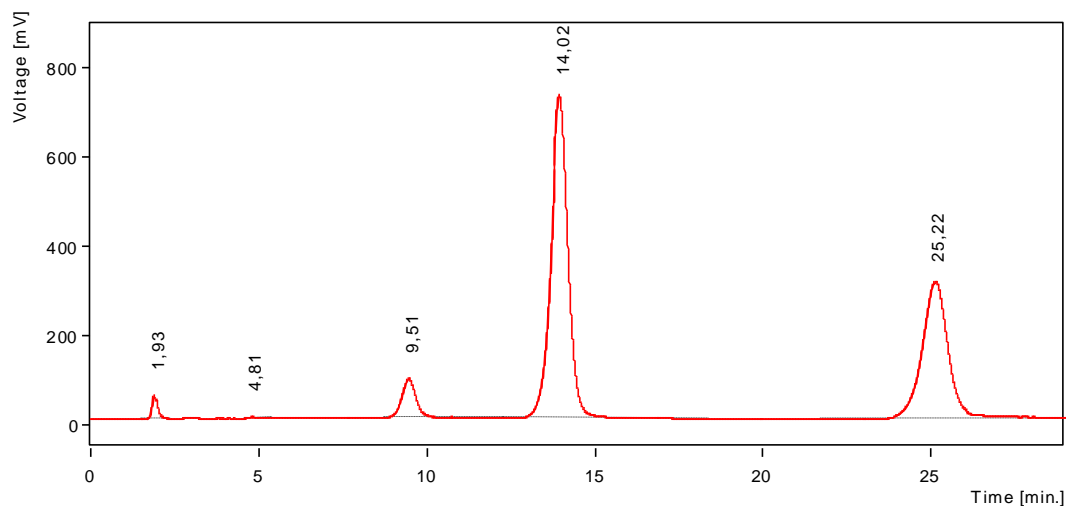
Výsledky výpočtů *LOD* a *LOQ* stanovovaných látek popisuje tabulka č.19.

Tab.č.19: Výsledky

	NAB	6MNA
LOD [µg/ml]	0,41	0,06
LOQ [µg/ml]	1,36	0,63

5.2.2.4 ROBUSTNOST

Roztok pro test robustnosti byl připraven způsobem popsaným v kapitole (4.4.3) s následujícím složením: 0,2 ml plné králičí krve, 50 μ l NAB o koncentraci 0,02 mg/ml, 50 μ l 6MNA o koncentraci 0,01 mg/ml a 50 μ l IS (naproxen) o koncentraci 0,01 mg/ml. Byl sledován vliv změny průtokové rychlosti, změna poměru složení mobilní fáze a změna pH vodní složky mobilní fáze, na retenční čas a změnu počtu teoretických pater (n). Při každé změně chromatografických podmínek jsem provedl tři měření ze kterých jsem stanovil průměrnou hodnotu t_R zaokrouhlenou na dvě desetinná místa. Vztah pro výpočet počtu teoretických je uvedený v kapitole (4.4.3).



Obr.č.14: HPLC chromatogram plné krve s NAB, 6MNA a IS provedený za standardních podmínek

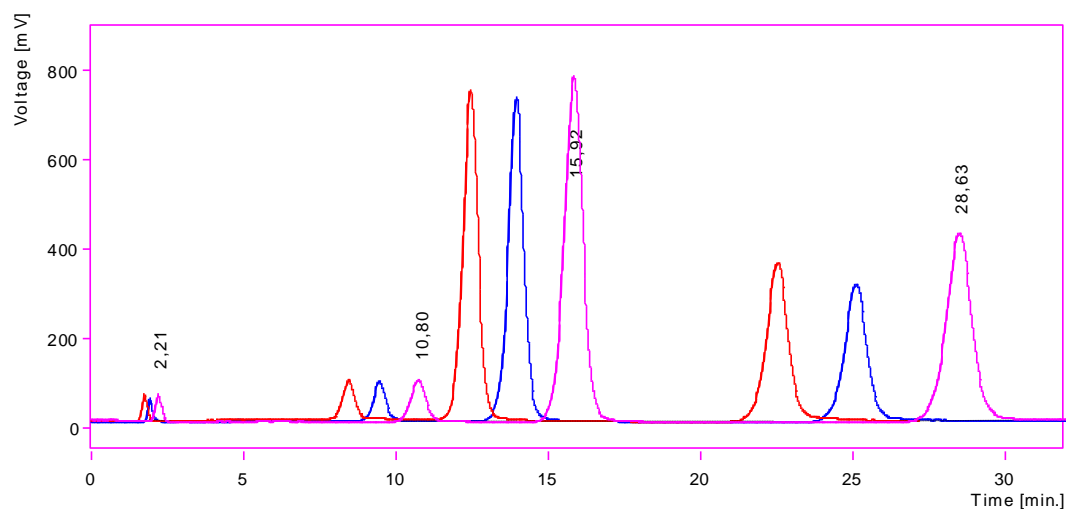
Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)

Průtoková rychlost: 0,4 ml/min

Detekce: UV λ 231 nm

Průtoková rychlost

Při standardních podmínkách byla průtoková rychlost 0,4 ml/min. Pro test robustnosti jsem vyzkoušel ještě průtokovou rychlost 0,45 a 0,35 ml/min. Výsledky uvádí tabulka č.20 a č.21 a obrázek č.15.



Obr.č.15: HPLC chromatogram plné krve s NAB, 6MNA a IS.
Červená-0,45 ml/min, modrá-0,4 ml/min – normál, fialová-0,35 ml/min
Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (60 : 40)
Detekce: UV λ 231 nm

Tab.č.20: Vliv změny průtoku MF na t_R

Průtoková rychlost [ml/min]	t_R 6MNA [min]	t_R IS [min]	t_R NAB [min]
normál 0,4	9,54	14,05	25,26
0,45	8,55	12,6	22,67
0,35	10,97	16,21	29,2

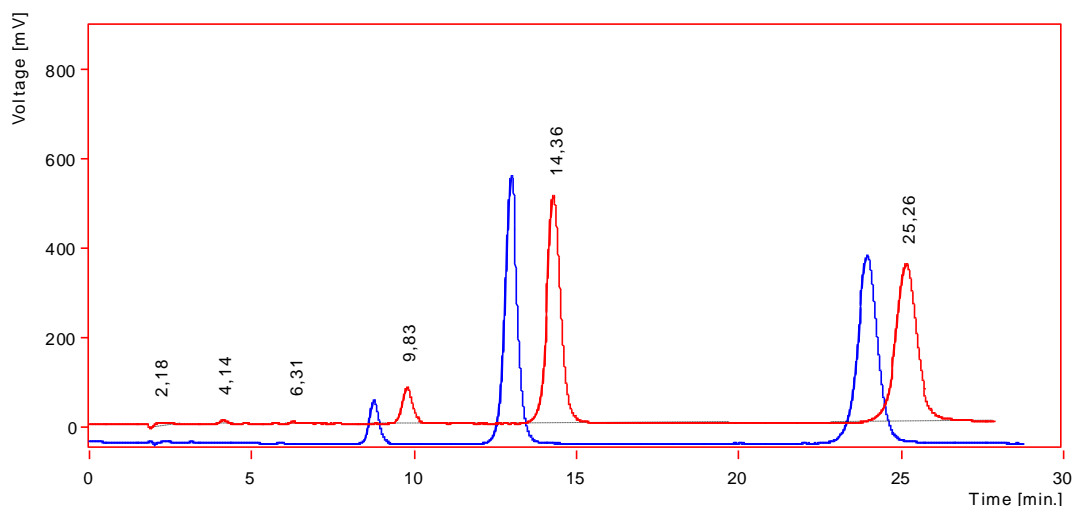
Tab.č.21: Vliv změny průtoku MF na počet teoretických pater n

Průtoková rychlost [ml/min]	n 6MNA	n IS	n NAB
normál 0,4	2497,84	3412,84	5616,52
0,45	2114,58	2963,99	5016,56
0,35	2205,32	3085,33	5464,26

Vztah pro výpočet počtu teoretických pater je uvedený v kapitole 2.3.2.2.

Vliv pH pufru

Při standardních podmínkách bylo pH fosforečnanového pufru v mobilní fázi 2,5. Testoval jsem ještě mobilní fázi s puftrem o hodnotě pH 3 a 2. Výsledky uvádí tabulka č.22 a č.23.



Obr.č.16: HPLC chromatogram plné krve s NAB, 6MNA a IS.
 Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr (60 : 40)
 Červená - pH 3, modrá - pH 2
 Průtoková rychlost: 0,4 ml/min
 Detekce: UV λ 231 nm

Tab.č.22: Vliv změny pH pufru MF na t_R

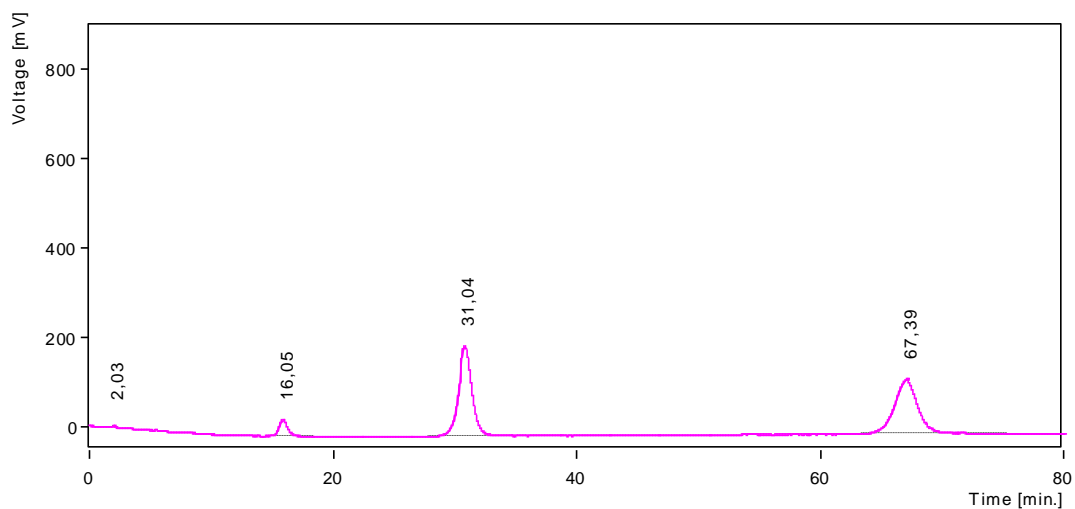
pH pufru v MF	t_R 6MNA [min]	t_R IS [min]	t_R NAB [min]
normál pH 2,5	9,5365	14,05	25,2635
pH 3	9,01	13,3235	24,42
pH 2	9,8335	14,3635	25,2565

Tab.č.23: Vliv změny pH pufru MF na počet teoretických pater n

pH pufru v MF	n 6MNA	n IS	n NAB
normál pH 2,5	2497,84	3412,84	5616,52
pH 3	4386,09	5396,19	7509,05
pH 2	4920,35	5569,73	7565,05

Poměr složek mobilní fáze

Při standardních podmínkách bylo složení mobilní fáze methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 60 : 40 (v/v). Dále jsem vyzkoušel poměr 50 : 50 a 70 : 30. Výsledky uvádí tabulka č.24 a č.25 a obrázek č.17 a č.18.

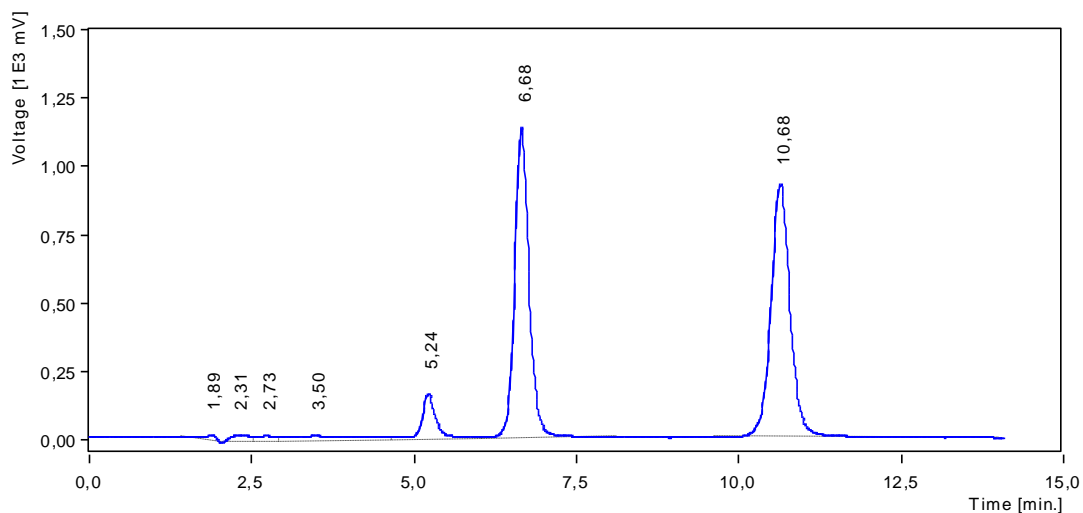


Obr.č.17: HPLC chromatogram plné krve s NAB, 6MNA a IS.

Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (50 : 50)

Průtoková rychlost: 0,4 ml/min

Detekce: UV λ 231 nm



Obr.č.18: HPLC chromatogram plné krve s NAB, 6MNA a IS.

Mobilní fáze: methanol – fosforečnanový pufr pH 2,5 (70 : 30)

Průtoková rychlost: 0,4 ml/min

Detekce: UV λ 231 nm

Tab.č.24: Vliv změny poměru složek MF na t_R

Poměr složek MF	t_R 6MNA [min]	t_R IS [min]	t_R NAB [min]
normál 60/40	9,54	14,05	25,26
50/50	16,05	31,04	67,39
70/30	5,2	6,62	10,57

Tab.č.25: Vliv změny poměru složek MF na počet teoretických pater n

Poměr složek MF	n 6MNA	n IS	n NAB
normál 60/40	2497,84	3412,84	5616,52
50/50	2807,25	3833,44	6208,88
70/30	3802,88	4705,76	6580,131

Metoda je robustnější ke změně průtokových rychlostí, než ke změně pH pufru mobilní fáze. K největším změnám dochází při změně poměru složek mobilní fáze, kdy nastává velký posun t_R a pro kvantitativní hodnocení by bylo potřeba sestavit kalibrační křivku podle modifikovaných podmínek.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo určit vhodný způsob izolace NAB a 6MNA z plné králičí krve HPLC metodou za simultánního stanovení obou složek a následně tuto metodu zvalidovat.

Zkoušel jsem nástřik supernatantu po deproteinaci, SPE, SPE spojenou s deproteinací i LLE. Samotná deproteinace neposkytovala prakticky žádnou výtěžnost. Při použití SPE docházelo k ucpávání extrakční kolony a ve spojení SPE s deproteinací byla izolace proveditelná, ale nedocházelo k reprodukovatelným výtěžnostem. Jako nejvhodnější izolační postup jsem tedy vybral LLE dichlormethanem. Vzorek jsem před extrakcí podrobil hemolýze 0,2 ml destilované vody a okyselení fosforečnanovým pufrům pH 1,5. Odparek po odfoukání do sucha jsem rozpouštěl v 200 μ l mobilní fáze.

K HPLC měření jsem používal analytickou skleněnou kolonu SGX-C-18. Mobilní fáze byla složená z methanolu a fosforečnanového pufru pH 2,5 v poměru 60 : 40, průtoková rychlost byla 0,4 ml/min. UV detekce probíhala při vlnové délce 231 nm. Jako vnitřní standard jsem použil naproxen.

Dále jsem provedl validaci metody. Dokázal jsem linearitu metody. Prokázal jsem lineární závislost pro 6MNA i NAB v koncentracích 2,5 – 25 μ g/ml králičí krve. Korelační koeficient byl v obou případech $> 0,999$

Prozkoumal jsem správnost metody, průměrná recovery odpovídá hodnotě 92,28 % pro 6MNA a hodnotě 97,37 % pro NAB.

Ověřil jsem přesnost metody vyjádřenou jako opakovatelnost. RS_D pro NAB je 1,88 % a pro 6MNA 0,50 %.

Prokázal jsem selektivitu. Metoda je selektivní, nedochází k žádné interferenci mezi píky analyzovaných složek ani balastů z krve.

Prozkoušel jsem robustnost metody. Metoda je relativně robustní při změně průtokové rychlosti mobilní fáze a změně pH pufru, který je součástí vodní složky mobilní fáze. K výrazným změnám dochází při změně poměru složek mobilní fáze.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Hartl J.; Palát K.: Farmaceutická chemie II., Praha, Karolinum, 1994
- 2) Pharmaceutische Stoffliste 7.vydání. Frankfurt am Main, 1990
- 3) SÚKL Praha: Mikroverze AISLP - ČR 2005.4 pro MS Windows
- 4) European Pharmacopoea 5. edice, Aubin, Liguge
- 5) Katzung B. G.: Základní a klinická farmakologie, Praha, H&H, 1994
- 6) Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Praha, Karolinum, 2002
- 7) Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty. Praha, Karolinum, 1995
- 8) Churáček J.; Jandera, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. Praha, SNTL, 1984
- 9) Zýka J a kol.: Analytická příručka. Praha, SNTL, 1988
- 10) R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, 2nd edition, Wiley-Interscience, 1997
- 11) Vondrák D., Vulteren j.: Analytická chemie, Bratislava, SNTL, 1985
- 12) Klíma, J.; Grafnetterová, J.: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7. Praha, Avicenum, 1987
- 13) Hejduková P.:Diplomová práce, Hradec Králové, 2003
- 14) Basics of LC/MS, Agilent Technologies, 2001
- 15) Čermáková, L.; Fetl, L.; Němcová, I.; Němec, I.; Pacáková, V.; Štulík, K.: Analytická chemie 2. Instrumentální analýza. Praha, SNTL, 1980
- 16) Český lékopis 2002, 3,díl, s. 3455 – 3458, Praha, Grada Publishing s.r.o., 2002

- 17) Babjuk, J.; Perlík, F.; Šídlo, Z.: Bioanalytika léků. Praha, Avicenum, 1990.
- 18) CDER and CVM Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/>).
- 19) Shabir G.: Analytical method Validation: similarities and differences in ICH/FDA/USP, Pharm. Tech. Eur., 12/2001 s. 72 - 84
- 20) Šabartová, J.: Věstník SUKL 1 (1994) 6-8
- 21) Holík, M.: Validace analytických metod: Postup při práci a příprava protokolu se zaměřením na HPLC a TLC, Přírodovědecká fakulta MU Brno, 1995
- 22) International conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH official Website, www.ich.org/pdf/ICH/Q2B.pdf
- 23) Kobylinska K.;Barlinska M.; Kobylinska M.: Analysis of nabumetone in human plasma by HPLC. Application to single dose pharmacokinetic studies., J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) s.323 – 328
- 24) Mikami E.; Goto t.; Ohno T.; Matsumoto H.; Nishida M.: Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6- methoxy-2-naphtylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography., J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) s.917-925
- 25) Nobilis M.; Kopecký J.; Květina J.; Svoboda Z.; Pour M.; Kuneš J.; Holčapek M.; Kolářová L.: Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using HPLC with UV, fluorescence and mass spectrometric detection., J. Pharm. Biomed. Anal.32 (2003) s.641-656

- 26) Nobilis M.; Holčapek M.; Kolářová L.; Kopecký J.; Kuneš M.; Svoboda Z.; Květina J.: Identification and determination of phase II nabumetone metabolites by HPLC with DAD and MSD., *J.Chromatography. A.* 1031 (2004) s.229 - 236
- 27) Huang, L.; Xu, Ch.; Zhang, Z.: Determination of the active metabolite of nabumetone in human plazma by reversed phase high performance liquid chromatographic assay. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 12, 1992, s 198 199.
In *Chemical Abstracts*, 117, 1992, 225 641 u.
- 28) Zabrzewska, B.; Bogdan, A.; Kaniewska, A.; Duszak, E.; Zelazowska, E.: Analytical investigations on selected non-steroidal anti-inflammatory drugs. Part I. Investigations on nabumetone and tiaprofenic acid. *Acta Pol. Pharm.*, 55, 1998, s. 179 – 188
- 29) Young-Joo, L.; Eun-Ju, J.; Jeong-Uk, L.; Yong-Hae, H.; Suk-Jae, Ch.; Min-Hwa L.; Chang-Koo, S.: Bioequivalence study of nabumetone tablets in man. *Arch. Pharm. Res.*, 18, 1995, s. 340 - 345
- 30) Ray, J. E.; Day, R. O.: High performance liquid chromatography determination of a new anti-inflammatory agent, nabumetone, and its major metabolite in plazma using fluorimetric detection. *J. Chromatogr.*, 336, 1984, s. 234 – 238
- 31) Al-Momani, I. F.: Determination of nabumetone and its major metabolite in plazma and tablet formulations by reverse-phase HPLC. *Anal. Lett.*, 30, 1997, s. 2485 – 2492
- 32) Československý lékopis. Vydání čtvrté. Praha, AVICENUM, 1987, s. 363 – 364, 370
- 33) Vyskočil V.: Diplomová práce, Hradec Králové, 2001