

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

## **Nesilikagelové materiály v analýze léčiv IV.**

Diplomová práce

Tereza Ženíšková

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Prohlášení autora:

*„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.“*

Author's Declaration:

*“I declare that this thesis is my original copyrighted work. All literature and other resources I used while processing are listed in the bibliography and properly cited. The thesis was not misused for obtaining the same or different academic degree.”*

V Hradci Králové dne

.....

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odbornou pomoc, bezmeznou trpělivost a cenné rady a připomínky, bez kterých by tato práce nevznikla. Taktéž bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia. Tato diplomová práce byla vypracována v rámci projektu SVV 260 401.

## **Obsah**

Úvod .....	8
Teoretická část .....	9
Extrakční metody používané pro přípravu vzorku .....	9
Typy metod.....	9
Extrakce na pevné fázi – Solid Phase Extraction (SPE) .....	11
Výběr extrakční kolonky a pevné fáze.....	13
Reverzní mód.....	14
Normální mód.....	17
Iontově výměnná extrakce .....	19
Obecný postup SPE.....	21
Možnosti využití SPE.....	24
Moderní techniky odvozené od SPE.....	26
Pevné fáze na základě oxidů kovů.....	27
Mechanismus interakce oxidů kovů.....	27
Oxid zirkoničitý .....	30
Oxid titaničitý .....	33
Oxid hlinitý.....	34
Kvantitativní vyhodnocení HPLC záznamu .....	35
Experimentální část .....	38
Přístrojová technika.....	38
Chemikálie .....	39
Příprava roztoků .....	40
Výsledky a diskuze .....	42
Volba kondičionálního činidla.....	43
Kondicionace nového sorbentu.....	51
Rozklad indometacinu v elučním činidle .....	53
Vliv čípkoviny na extrakci .....	57
Linearita.....	58
Závěr .....	60
Zdroje .....	62

## Abstrakt

### **Nesilikagelové materiály v analýze léčiv IV.**

Diplomová práce

Tereza Ženíšková

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy  
Heyrovského 1203, Hradec Králové.

Příprava vzorku je důležitým krokem před samotnou analýzou. Umožňuje odstranění balastních látek, které by mohly interferovat při analýze či ji zcela znemožnit. Extrakce na pevné fázi patří mezi nejpoužívanější metody úpravy vzorku. Nejčastějším sorbentem je silikagel, stále se však objevují nové, odolnější sorbenty s odlišnou selektivitou. Tato práce se zabývá využitím oxidu zirkoničitého a jeho schopností separovat Lewisovy baze na základě ligandové výměny. Zkoumali jsme využití oxidu zirkoničitého při extrakci indometacinu jakožto Lewisovy baze z čípků. Byl prověřen vliv kondicionálních činidel, jejich polarita a elučních činidel. Jako nejvhodnější kondicionální činidlo se ukázal 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Eluce byla provedena roztokem amoniaku v methanolu. Po snaze snížit množství a koncentraci činidla byly použity 3 ml 0,25M  $\text{NH}_3$  v MeOH. Jako vnitřní standard byl použit diklofenak. Výtěžnost byla 83 % pro standard indometacinu a 72 % pro indometacin v čípku na regenerovaném sorbentu. Adsorpce analytu na nový neregenerovaný sorbent byla silnější a jako kondicionální činidlo se ukázal vhodnější 20% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  s výtěžností pro standard indometacinu 80 %, pro modelový čípek 84 %. Bylo prokázáno, že množství čípkoviny ve vzorku neovlivňuje výtěžnost a byla prokázána linearita extrakce.

Klíčová slova: SPE,  $\text{ZrO}_2$ , indometacin

## Abstract

### **Non-silica based materials in drug analysis IV.**

Diploma thesis

Tereza Ženíšková

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis  
Heyrovského 1203, Hradec Králové.

Sample preparation is an important step before the analysis itself. It enables removal of the ballast components, which could interfere with an analyte or even disable the analysis. Solid phase extraction (SPE) belongs among the most popular sample preparation techniques. Silica is the most often used sorbent for SPE, however new, more durable sorbents with different selectivity have appeared. This thesis focuses on employment of zirconium dioxide and its ability to retain analytes having Lewis base character via ligand exchange. We tested to use zirconium dioxide in extraction of indomethacin as a Lewis base from suppositories. The influence of conditioning solvents with different polarity and extractions solvents was investigated. 10% acetonitrile in methylene chloride was found to be the best solvent for conditioning of zirconia. Methanolic ammonia solution was used as eluent. After some experiments the concentration and the volume of the eluent was set at 0.25M NH<sub>3</sub> in MeOH and 3 mL. Diclofenac was used as the internal standard. The recovery for sorbent after its regeneration was found to be 83 % for the standard of indomethacin and 72 % for indomethacin in a suppository. The adsorption of the analyte on new, non-regenerated sorbent was stronger, therefore 20% acetonitrile in methylene chloride was found to be better for conditioning. The recovery was found to be 80 % for the standard of indomethacin and 84 % for suppository. The amount of the suppository mass was proven not to interfere with the extraction. Linearity of the extraction was proven.

Key words: SPE, ZrO<sub>2</sub>, indomethacin

## Seznam použitých zkratek

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AS</b>	Adeps solidus
<b>DIC</b>	Diklofenak
<b>DLLME</b>	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny ( <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> )
<b>DPX</b>	Extrakce pomocí naplněných špiček pipet ( <i>Disposable pipette tip extraction</i> )
<b>DSPE</b>	Disperzní SPE ( <i>Dispersive SPE</i> )
<b>EDTA</b>	Kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>HF-LPME</b>	Mikroextrakce do kapaliny pomocí tuhého vlákna ( <i>Hollow-fibre liquid phase microextraction</i> )
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
<b>IND</b>	Indometacin
<b>LLE</b>	Extrakce kapalina-kapalina ( <i>Liquid-liquid extraction</i> )
<b>LLME</b>	Mikroextrakce do kapaliny ( <i>Liquid-liquid microextraction</i> )
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MEPS</b>	Mikroextrakci plněným pevným sorbentem s využitím stříkačky ( <i>Microextraction by packed sorbent</i> )
<b>MIPs</b>	Molekulárně vtištěné polymery ( <i>Molecularly imprinted polymers</i> )
<b>MSPDE</b>	Extrakce disperzní tuhou fází ( <i>Matrix solid phase dispersion extraction</i> )
<b>MSPE</b>	Extrakce magnetickou tuhou fází ( <i>Magnetic solid phase extraction</i> )
<b>PBD</b>	Polybutadien
<b>PS</b>	Polystyren
<b>RAM</b>	Materiály s omezeným přístupem ( <i>Restricted access materials</i> )
<b>SBSE</b>	Sorpční extrakce míchadlem ( <i>Stir bar sorptive microextraction</i> )
<b>SDME</b>	Extrakce do jediné kapky rozpouštědla ( <i>Single-drop microextraction</i> )
<b>SPE</b>	Extrakce na pevné fázi ( <i>Solid phase extraction</i> )
<b>SPME</b>	Mikroextrakce tuhým vláknem ( <i>Solid phase microextraction</i> )
<b>TFC</b>	Chromatografie s turbulentním průtokem ( <i>Turbulent flow chromatography</i> )

## **Úvod**

V dnešní době je snaha nalézt nové selektivní a zároveň odolnější sorbenty určené k extrakci na tuhou fázi (*Solid-Phase Extraction*, SPE). Stále více se uplatňují tuhé fáze na bázi oxidů kovů a to jak v SPE tak v HPLC (*High performance liquid chromatography*, vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

SPE je rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda sloužící k úpravě vzorku před vlastní analýzou. Má diplomová práce přímo navazuje na předchozí studii zkoumající využití oxidu zirkoničitého jako sorbentu se schopností ligandové výměny pro extrakci ibuprofenu. Experimentální práce je zaměřena na studium využití oxidu zirkoničitého jako sorbentu pro extrakci indometacinu z čípku za použití diklofenaku jakožto vnitřního standardu.



# Teoretická část

## Extrakční metody používané pro přípravu vzorku

Analyt se většinou nachází ve vzorku se složitější maticí a bývá přítomen ve stopovém množství, proto je výhodné (a někdy i nezbytné) nejdříve vzorek před vlastní analýzou upravit. Cílem je snížit množství balastních látek a zakoncentrovat samotný analyt. Ačkoliv příprava vzorku je časově nejnáročnější součástí analýzy, má zásadní vliv na přesnost a správnost výsledků. Volba extrakční metody závisí na vlastnostech matrice a analytu. [1] [2] [3]

Obecně lze tyto metody rozdělit na konvenční, které jsou rozšířené a široce využívané v analytických laboratořích, a miniaturizované techniky, které vycházejí z konvenčních metod a pracují s menším množstvím vzorku i rozpouštědla. [3]

### **Typy metod**

#### Přímá extrakce

Jedná se nejčastěji o extrakci z pevné matrice. Probíhá na horizontální či rotační třepačce, ultrazvukové lázni či kontinuálních extraktorech (např. Soxhletův). Analyt se z matrice uvolní rozpuštěním ve zvoleném rozpouštědle. Výběr rozpouštědla závisí na vlastnostech analytu (polární rozpouštědlo pro polární látky, nepolární např. pro lipidy). Vzorek musí být dostatečně rozdrobněn, je však obtížné provést touto metodou přesné kvantitativní stanovení. Výtěžnost a rychlost lze ovlivnit zvýšením teploty a tlaku, a to až do fáze superkritické fluidní extrakce, kdy se jako rozpouštědlo používá nadkritická tekutina. [3]

#### Extrakce z kapaliny do kapaliny (*Liquid-Liquid extraction, LLE*)

Tato metoda je založena na extrakci analytu z polární (většinou vodné) fáze do nepolárního organického rozpouštědla (případně obráceně). Rozdělení analytu do obou fází je dáno rozdělovacím koeficientem  $D_c$

$$D_c = \frac{c_1}{c_2}$$

kde  $c_1$  je koncentrace analytu v organické fázi,  $c_2$  ve vodné fázi. Snadno tak lze oddělit polární a nepolární sloučeniny. Extrakční činidlo by mělo mít podobnou polaritu jako analyt a zároveň s ním nesmí reagovat. Opakovaná extrakce s menšími objemy

rozpouštědla vykazuje obecně vyšší výtěžnost než extrakce provedená jednou s velkým objemem rozpouštědla, jak popisuje rovnice pro několikanásobnou extrakci:

$$m_i = m_0 \left( \frac{V}{V + D_c V_E} \right)^i$$

kde je  $m_0$  hmotnost analytu před extrakcí a  $m_i$  po extrakci,  $V_E$  je objem extrakčního činidla,  $V$  objem roztoku a  $i$  je počet extrakčních stupňů. [4]

U kyselých či bazických látek je třeba úpravou pH převést analyt do neionizovaného stavu a zlepšit tak jeho přechod do organické fáze. Hodnota pH roztoku se upravuje na základě Henderson-Hasselbalchovy rovnice:

$$pH = pKa + \log \frac{c_B}{c_A}$$

kde  $c_A$  a  $c_B$  jsou rovnovážné koncentrace konjugované kyseliny a zásady. Pro kyseliny upravujeme hodnotu pH tak, aby byla o 2 nižší než jejich pKa, pro baze naopak o 2 vyšší.

LLE je manuálně nenáročná, s dobrou výtěžností a reprodukovatelností, zároveň však dochází k poměrně velké spotřebě rozpouštědel. [2] [3]

#### Moderní metody odvozené od LLE

Řadíme sem početnou skupinu mikroextrakčních technik (LLME) jako např. SDME (*single-drop microextraction*), tedy extrakce do jediné kapky rozpouštědla, disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny DLLME (*dispersive liquid-liquid microextraction*) a mikroextrakci do kapaliny pomocí tuhého vlákna HF-LPME (*hollow-fibre liquid phase microextraction*). Do této skupiny dále patří on-line technika označovaná jako chromatografie s turbulentním průtokem (*turbulent flow chromatography*, TFC). Na chromatografickou kolonu se nanáší celý objem extraktu, což vede k větší citlivosti, nicméně hrozí přetížení separační kolony. [3] [5]

#### Srážení proteinů (*Protein precipitation*)

Rychlá a jednoduchá metoda sloužící k úpravě biologických materiálů. Pomocí organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) nebo silných kyselin ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), soli vícemocných iontů ( $\text{ZnSO}_4$  v  $\text{NaOH}$ ), taninu či proteolytických enzymů dojde k precipitaci proteinů. Precipitát nesmí na svůj povrch adsorbovat sledované látky. Po centrifugaci, kdy dojde k oddělení precipitátu a supernatantu, se

supernatant použije pro vlastní analýzu nebo se odpaří a rozpustí v minimálním množství rozpouštědla, čímž dojde k zakoncentrování analytu. Nevýhodou této metody je, že ostatní balastní látky (např. lipidy) zůstávají ve vzorku a pokud nejde rozpouštědlo odpařit, dojde také k naředění analytu. Další možností jak odstranit proteiny za vzorku je využít ultrafiltraci. [2] [3]

## **Extrakce na pevné fázi – Solid Phase Extraction (SPE)**

Tato metoda využívá pevnou fázi k selektivní extrakci, odstranění balastních látek a zakoncentrování analytů před další analýzou např. pomocí HPLC. Mechanismus separace je totožný s procesy probíhajícími při separaci látek v koloně v kapalinové chromatografii. Účinnost je však nižší vzhledem k menšímu množství sorbentu, větším částicím sorbentu a nižšímu pracovním tlakům. [1] [2] [6]

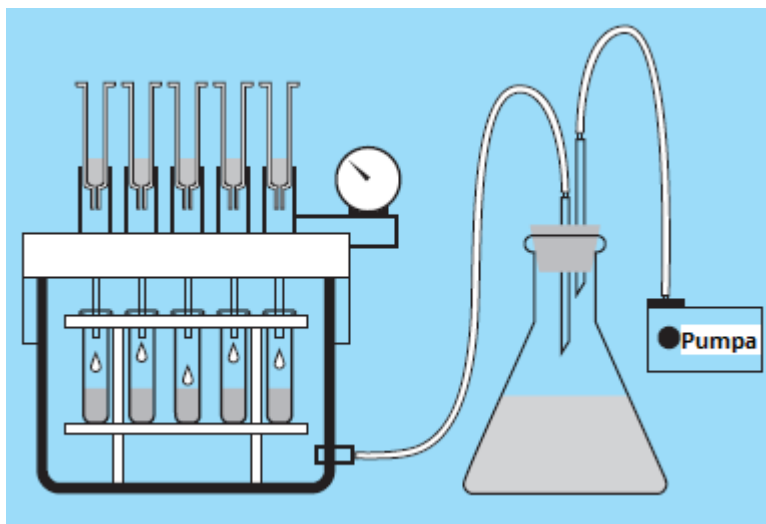
SPE byla známá spíše v teoretické rovině a málokdy praktikována až do roku 1977, kdy představila společnost Waters Corporation komerčně dostupné předpřipravené kolonky obsahující vázané silikagelové sorbenty. Samotný termín *solid phase extraction* byl zaveden v roce 1982 zaměstnanci firmy J. T. Baker Chemical Company. [1] [7]

Nyní stále více konkuruje extrakci kapalina-kapalina. Výhody SPE jsou především zkrácený čas extrakce, nižší požadavky na manuální práci a nepotřebnost drahého a křehkého skla, nižší spotřeba organických rozpouštědel a nutnost jejich likvidace. SPE může být v některých případech ekologičtější a ekonomičtější z hlediska využívaných rozpouštědel než LLE. Při SPE dochází k zakoncentrování ředěných či příliš objemných vzorků. Při správném postupu je efektivní, výtěžnost se mnohdy blíží 100 %. Díky komerční výrobě SPE kolonek je extrakce opakovatelná a navíc může být automatizována (např. on-line spojení s HPLC). SPE též umožňuje uchovávat analyt v naadsorbovaném stavu na pevném sorbentu extrakční kolonky. [1] [6] [7]

Principem SPE je využití afinity analytů v kapalném vzorku k pevnému sorbentu. SPE se provádí pomocí extrakční kolonky, zhotovené z polypropylenu či ze skla, naplněné sorbentem, který je z obou stran stlačen porézními fritami, vyrobenými z polyethylenu, teflonu či nerezové oceli. V dnešní době je dostupná široká paleta extrakčních kolonek různých velikostí, předplněných různými typy sorbentu. V případě potřeby je však možné naplnit extrakční kolonky ručně požadovaným

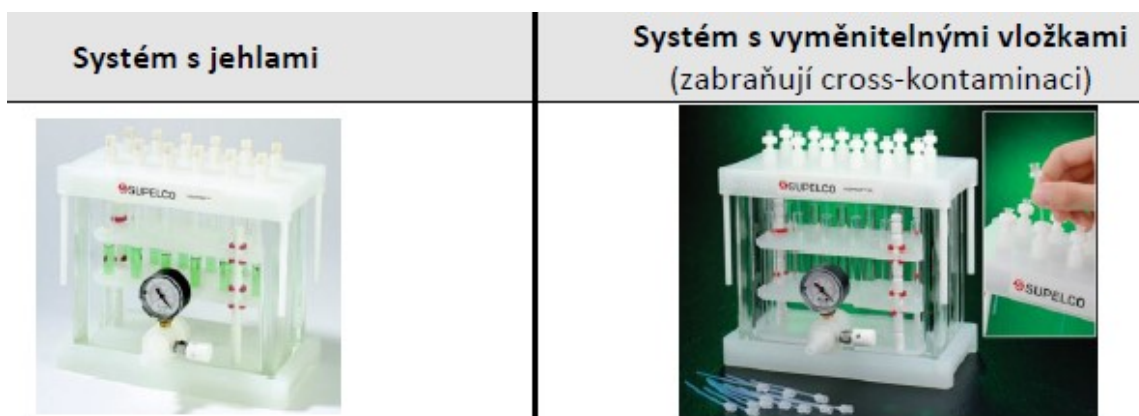
sorbentem. K dispozici jsou i disky, vytvořené ze sklených vláken, na kterých jsou zakotvené částice sorbentu.

Díky sorbentu s větší zrnitostí, než se využívá u HPLC, lze extrakci urychlit pomocí lehkého podtlaku. Extrakční kolony se spojí s vakuovou aparaturou a vakuum je zajištěno vodní vývěvou nebo vakuovým čerpadlem, viz Obrázek 1. [8] [9] [10]



**Obrázek 1. Schéma SPE extrakce při použití podtlaku – převzato a upraveno [10]**

Komerčně dostupná jsou 5, 10, 12, 16, 20, 24 a 96 pozicová plata či systémy s jehlami. Každý tzv. manifold, tedy manuální systém pro SPE standardně zahrnuje víko, šroubovací ventily k regulaci průtoku, skleněnou nádobku, manometr na měření vakua a víceúčelový stojánek pro různé typy skla, většinou zkumavek či vialek pro sběr extrakčních frakcí, viz Obrázek 2. [7] [8] [9] [10]



**Obrázek 2. Typy systémů pro SPE - převzato a upraveno [9]**

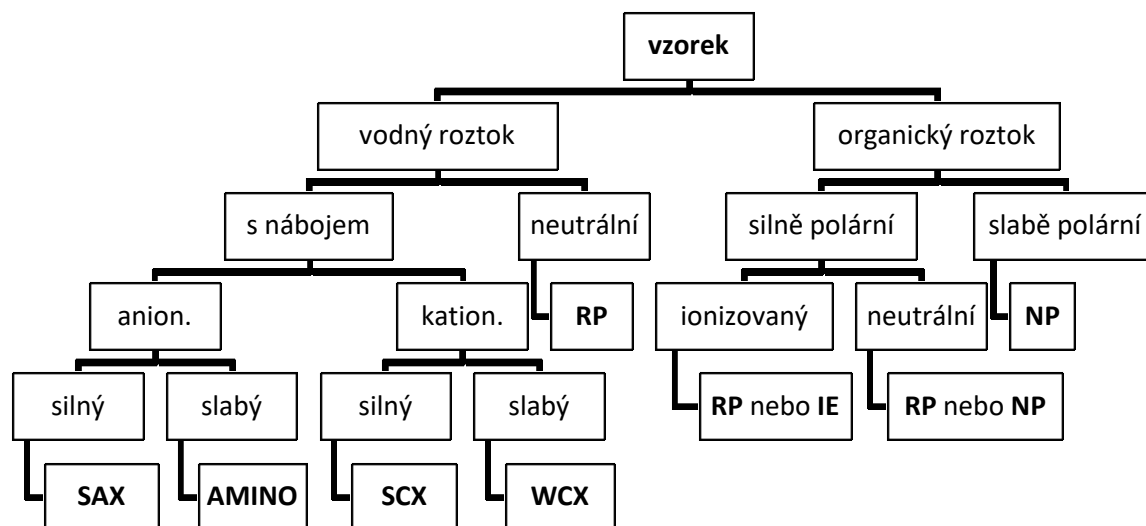
## Výběr extrakční kolonky a pevné fáze

Volba velikosti kolonky a typu sorbentu závisí na mnoha faktorech. Velikost extrakční kolonky se obecně určuje podle množství vzorku. V případě extrakce při normálním či reverzním uspořádání fází platí pravidlo, že množství extrahované látky by nemělo přesáhnout 5 % hmotnosti sorbentu, tzn. při 100 mg sorbentu v 1ml kolonce by extrahovaná látka neměla přesáhnout množství 5 mg. Při extrakci za využití iontové výměny se extrakční kapacita konkrétních sorbentů liší. Výběr kolonky dle množství vzorku a sorbentu znázorňuje Tabulka 1. [8] [11]

**Tabulka 1. Výběr velikosti kolonky a množství sorbentu [8]**

Objem vzorku	Velikost kolonky	Množství sorbentu
<1 ml	1 ml	50/100 mg
1 – 250 ml Pomalá rychlost extrakce	3 ml	500 mg
1 – 250 ml Rychlá extrakce	6 ml	500 mg
10 – 250 ml Potřeba větší kapacity sorbentu	12, 20 nebo 60 ml	1, 2, 10 g
<1 l Pomalá rychlost extrakce	12, 20 nebo 60 ml	1, 2, 10 g

Sorbent vybíráme podle vlastností vzorku. Záleží na tom, je-li matrice rozpustná ve vodě či v organických rozpouštědlech, a zda je analyt ionizován či neionizován. Výběr sorbentu znázorňuje Obrázek 3. [1] [8]



**Obrázek 3. Postup výběru sorbentu pro izolaci organických látek z roztoku [1]**

SAX: silný anex; SCX: silný katex; WCX: slabý katex, RP: reverzní fáze; NP: normální fáze; IE: extrakce na základě iontové výměny

Od pevné fáze se požaduje, aby byla schopna požadovanou látku rychle a reprodukovatelně zadržet v definovaném množství a následně umožnit kompletní eluci daným činidlem. Sorbent by měl být chemicky a tepelně stabilní. Samozřejmě nesmí reagovat s analytem ani s rozpouštědlem a nesmí se v rozpouštědle sám rozpouštět. [1] [8] [12]

Sorbenty můžeme rozdělit dle chemického složení na anorganické oxidy (silikagel a oxidy kovů), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní fáze, hybridní fáze a fáze na bázi grafitového uhlíku. [12]

#### Vliv pH vzorku na sorpci

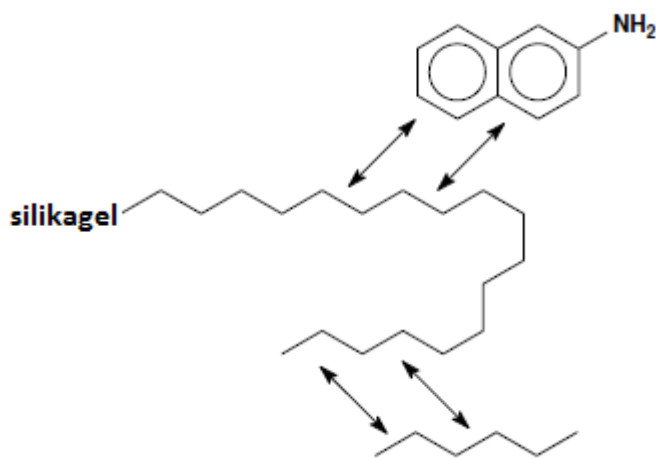
Pokud je látka ionizovatelná, pak je extrakce závislá na pH. Při extrakci na reverzní fázi v případě kyselého či bazického analytu je však žádoucí upravit pH tak, aby byl analyt neionizován a byl zadržen sorbentem. V případě extrakce pomocí iontové výměny má pH vzorku i rozpouštědla na sílu retence velký vliv. Musí se docílit takového pH, aby analyt a funkční skupiny sorbentu měly vzájemně opačné náboje. Pokud se provádí extrakce na normální fázi, tak se většinou využívají organická nepolární rozpouštědla a hodnota pH nehraje tak zásadní roli. Někdy je ale nutno sílu interakcí mezi analytem a pevnou fází upravit pomocí přídavku kyseliny nebo base. [1] [8] [13]

### **Reverzní mód**

Extrakce na reverzní fázi dnes patří mezi nejčastěji využívaný separační mód, většinou je první volbou v separaci jak neutrálních tak iontových vzorků. Název extrakce na reverzní fázi se odvozuje od toho, že uspořádání fází je opačné k dřívějšímu uspořádání fází, při kterém byla pevná fáze polární a kapalná nepolární. Extrakce je založena na nepolárních interakcích (van der Waalovy síly, disperzní síly) mezi analytem a sorbentem, viz Obrázek 4. Jedná se o nízkoenergetický proces analogický LLE s tím rozdílem, že nepolární fázi představuje nejčastěji nepolárními skupinami modifikovaný silikagel. Extrahované analyty jsou zpravidla středně polární až nepolární. K eluci analytu z pevné fáze se používají polární organická rozpouštědla (methanol, acetonitril), která vzájemné interakce mezi analytem a pevnou fází přerušují. [1] [8] [14]

## Sorbenty

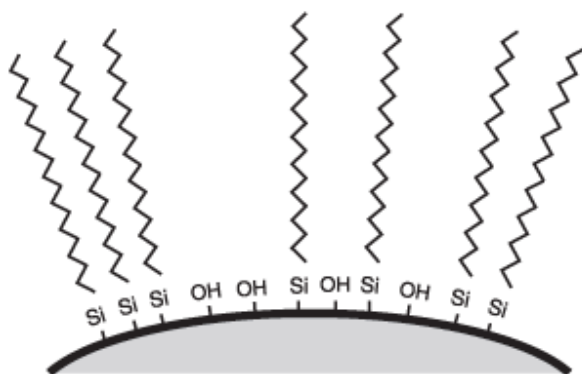
Stacionární fázi představuje nejčastěji, jak již bylo dříve uvedeno, silikagel s povrchem modifikovaným hydrofobními uhlíkatými řetězci jako C18, C8 nebo fenylem, popř. existují alkylfenylové a bifenylové stacionární fáze. Nosiči pro vázanou fázi mohou být i hybridní sorbenty nebo kovové oxidy. Nevýhodou chemicky vázaných fází na bázi silikagelu je jejich omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí: silikagel modifikovaný C18 je krátkodobě stabilní při pH 2 - 9, dlouhodobě pH 3 - 7). [8] [12] [14] [15]



**Obrázek 4. Interakce mezi analyty a sorbentem zprostředkované van der Waalsovými silami pro oktadecyl modifikovaný silikagel – převzato a upraveno [1]**

Retenční schopnost a selektivita sorbentu je určena jeho fyzikálně chemickými vlastnostmi, zatímco účinnost kolony je dána strukturou a velikostí částic. Retence je ovlivněna typem substituentů. Roste se zvyšujícím se počtem a délkou alkylů v homologických řadách a v přítomnosti arylů či objemných substituentů, často halogenů. Aromatické substituenty mají vyšší polaritu a liší se v selektivitě především k aromatickým látkám (kvůli možnosti  $\pi$ - $\pi$  interakcí). Přítomnost polárních skupin (např.  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) retenci snižuje. [14]

Všechny stacionární fáze na bázi silikagelu obsahují určité procento reziduí nesubstituovaných silanolových skupin – viz Obrázek 5. Ty mohou sekundárně interagovat zvláště s bazickými analyty a ovlivňovat jejich retenci.



**Obrázek 5. Fáze na bázi silikagelu s vázanými alkyly obsahující volné silanolové skupiny - převzato a upraveno [10]**

Eluční činidlo se volí podle jeho polaritu. S klesající polaritou stoupá eluční síla. Nejčastěji používaná rozpouštědla při RP extrakci jsou methanol, acetonitril a ethylacetát. Tato činidla jsou schopná narušit van der Waalsovy síly mezi analytem a nepolárními skupinami sorbentu, s rezidui silanolových skupin tvoří vodíkové můstky a jsou schopna rozpustit zbytkovou vodu, která může být uchycena v navázané fázi. V případě použití nepolárnějšího činidla (např. dichlormethan) je nutno před elucí sorbent důkladně vysušit pomocí vakua od zbytkové vody, jinak rozpouštědlo není schopno interagovat s celou plochou sorbentu a výtěžnost se citelně snižuje. [14]

Dalším možným sorbentem pro reverzní SPE je grafitový uhlík. Získal si pověst jako látka schopná extrakce vysoce polárních, ve vodě velmi dobře rozpustných organických látek z vodných vzorků. Způsob retence analytů se liší od sorbentů na bázi silikagelu. Rozlišujeme dva typy grafitového uhlíku – porézní a neporézní. [1]

Neporézní grafitový uhlík neobsahuje mikropóry a jeho povrch je téměř homogenní, složený z atomů uhlíku stavby grafitu. Sorbent se chová jako reverzní fáze (zajištěno nespecifickými van der Waalsovými silami), a zároveň jako iontoměnič (díky elektrostatickým interakcím). Grafitový uhlík bez pórů lze použít k simultánní extrakci neutrálních, bazických i kyselých látek, často i bez potřeby úpravy pH. Eluce však může být právě kvůli silným interakcím sorbentu s analytem náročná. [1]

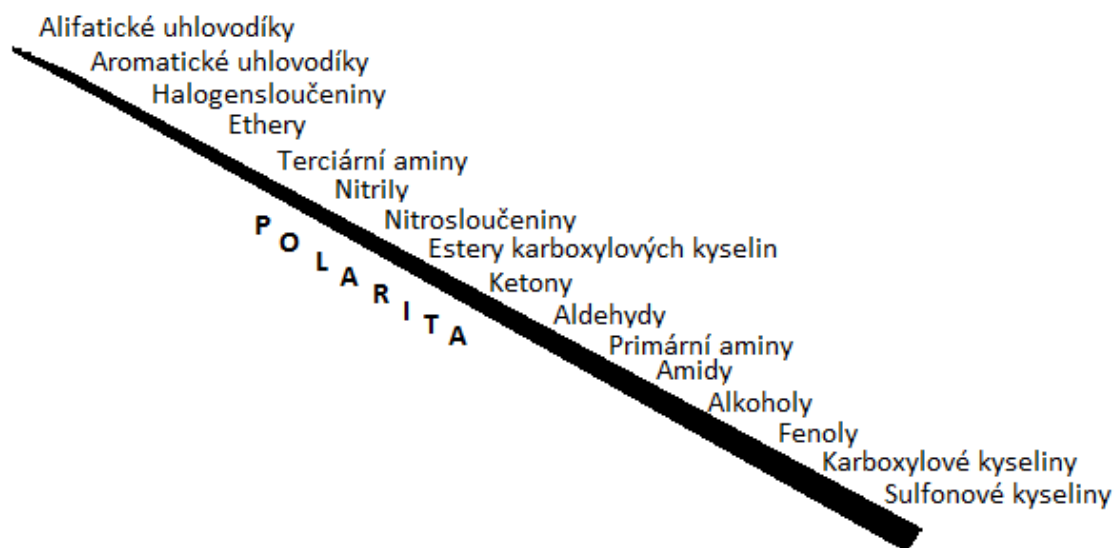
Porézní grafitový uhlík má ještě více homogenní nepolární povrch než neporézní. Sorbenty tohoto typu jsou složené z plochých šestiúhelníků, tvořených atomy uhlíku a uspořádaných do grafitových vrstev. Dochází k delokalizaci  $\pi$  elektronů, a proto lze díky této struktuře primárně selektivně separovat aromatické planární látky.



Sekundární roli hrají funkční skupiny analytu. Eluce se provádí středně polárními až nepolárními rozpouštědly. [1] [12]

## Normální mód

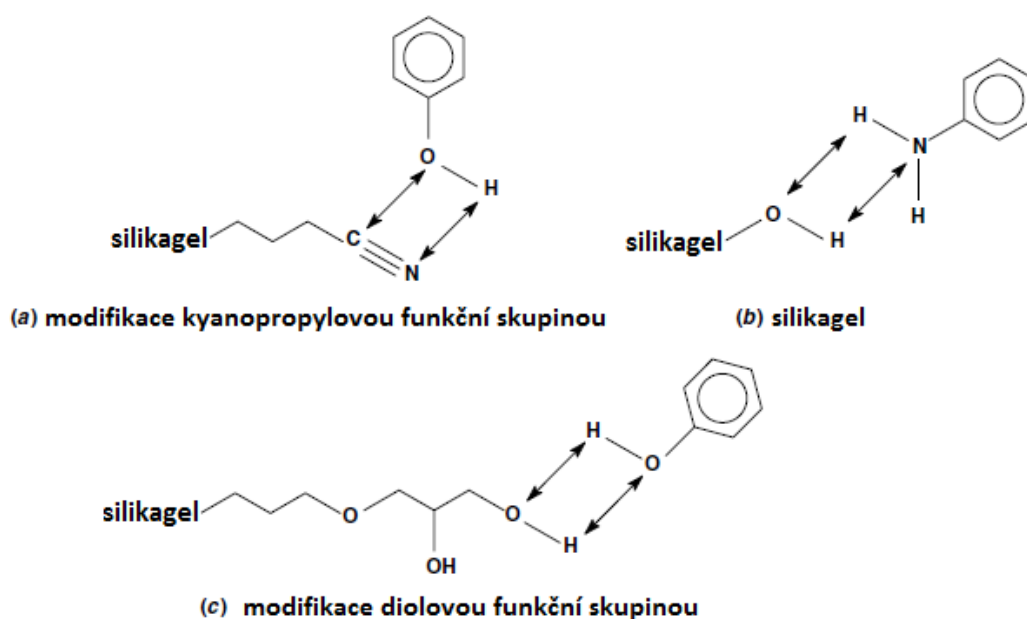
Extrakce na normální fázi spočívá v použití polární stacionární fáze. Do roku 1960 představovalo toto uspořádání pevné a kapalné fáze standardní typ separace, odtud tedy název normální. Většinou se pracuje s polárním analytem, středně polární až nepolární matrix a polární stacionární fází. Mechanismus extrakce je založen na polárních interakcích: tvorba vodíkových můstků,  $\pi$ - $\pi$  interakce, dipól-dipól interakce a dipól-indukované interakce. Dochází k navázání polárních skupin analytu na lokalizovaná adsorpční centra na povrchu stacionární fáze (např. silanolové skupiny silikagelu). Při eluci analyt o tato místa soupeří s elučním činidlem a uvolňuje se. Retence látek na stacionární fázi se s rostoucí polaritou analytů zvyšuje. Organické látky s jednou funkční skupinou lze seřadit podle rostoucí polarity, tzn. podle rostoucí retence, viz Obrázek 6. [8] [12] [14]



Obrázek 6. Organické látky s jednou funkční skupinou seřazené dle polarity [12]

Vliv na polaritu, a tedy i selektivitu separace má i možnost tvorby intramolekulárních vodíkových můstků. Retence dále závisí na dostupnosti adsorpčních center sorbentu a geometrickém uspořádání molekuly analytu, protože síly umožňující extrakci jsou krátkého dosahu. Objemné funkční skupiny sterickým vlivem retenci snižují. Významné rozdíly v selektivitě podle polarity se však uplatňují pouze mezi prvními členy homologických řad, s rostoucím počtem atomů uhlíku v alifatické řadě

selektivita pro sousední homology klesá, u aromatických sloučenin je situace ještě komplikovanější. Eluční činidlo musí být méně polární než stacionární fáze, ale zároveň více než analyt. Často se jedná o směs dvou rozpouštědel s odlišnou polaritou. Mezi nejčastější sorbenty pro extrakci v normálním uspořádání fází patří silikagel  $(\text{SiO}_2)_x$ , oxid hlinitý  $(\text{Al}_2\text{O}_3)$ , flurosil  $(\text{MgSiO}_3)$  a sorbenty na bázi silikagelu s navázanými polárními funkčními skupinami. Mezi slabě polární fáze lze zařadit materiály s diolovou funkční skupinou nebo nitroskupinou. Středně polární fáze jsou zastoupeny kyanopropylovou funkční skupinou. Silně polární fáze mají navázané krátké alifatické aminoskupiny jako aminopropyl, díky kterým vykazují zcela odlišnou selektivitu od původního silikagelu. Dokáží oddělit i látky s velmi blízkou chemickou strukturou – např. polohové izomery (díky sterickým vlivům jsou *cis* izomery zadržovány silněji než *trans* izomery) nebo komplexní směsi látek jako léčiva či lipidy. Příklady sorbentů a znázornění jejich interakcí s analytem zobrazuje Obrázek 7. [1] [8] [12]



**Obrázek 7. Pevné fáze pro NP extrakci a jejich interakce s analytem pomocí dipolární interakce a vodíkových můstků – převzato a upraveno [1]**

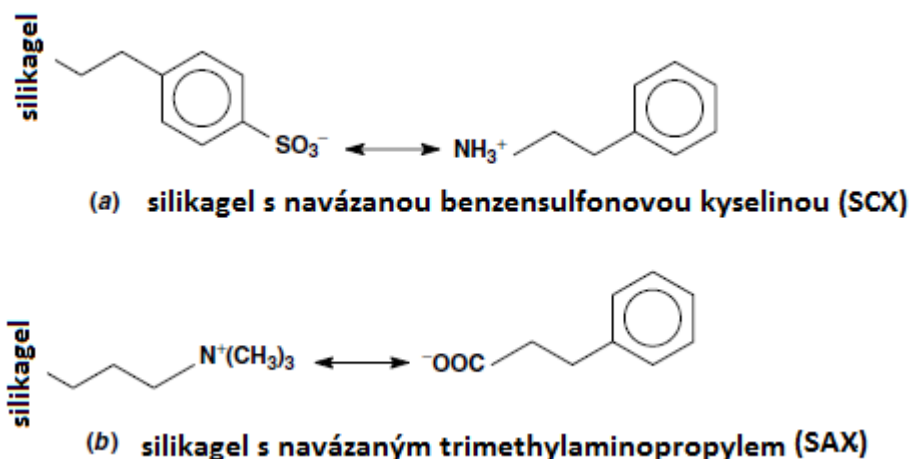
Čistý silikagel je anorganický polymer  $(\text{SiO}_2)_x$ , použitelný často samotný nebo jako základ pro další chemicky vázané pevné fáze. Skládá se ze siloxanových můstků  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$  a silanolových skupin  $-\text{Si}-\text{OH}$ . Částice silikagelu pro SPE jsou většinou nepravidelné, v průměru mezi 40 a 60  $\mu\text{m}$ , s velikostí pórů 60 Å. Díky větší velikosti zrn není nutný pro separaci tak vysoký tlak jako u silikagelu používaného při HPLC. Tento sorbent je nesmírně hydrofilní, musí být uchováván suchý a vzorky

musí být relativně bezvodé. Největší nevýhodou silikagelu (a sorbentů na bázi silikagelů obecně) je jejich stabilita pouze při hodnotách pH mobilní fáze 2 – 9. Při nižším pH dochází k hydrolyze siloxanové vazby, zatímco při vyšším pH hrozí rozpuštění a vymytí silikagelu. Na pH rozpouštědla závisí i optimalizace celé extrakce, která je tím pádem omezena možnostmi silikagelových sorbentů. Čistý silikagel se často používá na pročištění vzorku, kdy se na sorbent naadsorbují balastní látky a samotný analyt nezadržen proteče. Na tento tzv. *clean up* vzorků i na adsorpci analytů se využívají též materiály z oxidů hliníku. Mohou mít pKa kyselé (Alumina-A, pKa ~5), neutrální (Alumina-N, pKa ~6.5) či zásadité (Alumina-B, pKa ~8.5). [8] [14] [16]

### **Iontově výměnná extrakce**

Iontově výměnná extrakce (též extrakce pomocí iontoměničů, ionexů) se využívá pro extrakci analytů nesoucích v roztoku náboj. Jedná se o vysoce energetickou iontovou interakci, a proto mohou být polární analyty extrahovány i z polárních roztoků, např. z vody. Anionty lze extrahovat pomocí SAX (*strong anion exchanger*, silné anexy) nebo WAX (*weak anion exchanger*, slabé anexy), kationty pomocí SCX (*strong cation exchanger*, silné katexy) nebo WCX (*weak cation exchanger*, slabé katexy). [8] [14]

Primárně se jedná o působení elektrostatických interakcí mezi chemickou funkční skupinou analytu nesoucí náboj a opačně nabitou funkční skupinou (iontoměničem), nejčastěji vázanou na silikagelu, viz Obrázek 8. Sílu interakce určují funkční skupiny analytu a pevné fáze svým počtem a velikostí. Roztok vzorku musí splňovat takové podmínky, aby obě funkční skupiny analytu a sorbentu měly opačný náboj, a zároveň byl potlačen výskyt balastních látek se stejným nábojem jako analyt. K eluci se používá takové rozpouštědlo, které zneutralizuje buď analyt, nebo funkční skupinu iontoměniče. Neutralizace naruší elektrostatické síly mezi funkčními skupinami a dojde k uvolnění analytu. Jako alternativa se dá použít i rozpouštědlo, které disponuje silnějším nábojem než analyt a nahradí jej ve vazbě na sorbent. [8] [14]



Obrázek 8. Mechanismus iontově výměnné extrakce pro a) kationtově výměnnou extrakci, b) aniontově výměnnou extrakci – převzato a upraveno [1]

### Aniontově výměnná SPE

Ionexy pro aniontově výměnnou SPE se nazývají anexy. Jedná se o nerozpustné polymerní polyvalentní báze, uvolňující a vyměňující anionty. Lze rozlišit anexy na slabé (WAX) a silné (SAX). Silné anexy jsou zcela disociované při pH v rozmezí 0 - 12 (iontoměníče na bázi silikagelu jsou však stále jen při pH 2 – 8), slabé anexy jsou ionizovatelné pomocí změny pH. SAX se skládá z alifatických kvarterních amoniových skupin upevněných na povrch silikagelu. Kvarterní amoniové skupiny nesou vysoce pozitivní náboj, jejich pKa převyšuje hodnotu 14, ve vodných roztocích jsou proto vždy kladně nabitý. Musí být dodrženy podmínky, při kterých nese analyt náboj, většinou postačuje pH o 2 větší než hodnota pKa analytu. Analytem jsou zpravidla slabé kyseliny. Extrakce silných aniontů se na SAX provádí, pouze pokud plánujeme silné anionty odstranit, nevyžadujeme vysokou výtěžnost či jejich eluci, protože vazby analytu na sorbent jsou velmi pevné. V případě, že požadujeme eluci silně anionického analytu, lze využít silikagel modifikovaný funkčními skupinami LC-NH<sub>2</sub>. Slabé anionty lze ze SAX eluovat buď neutralizací, nebo nahrazením jiným aniontem. WAX se skládá ze silikagelu, na jehož povrch jsou navázány primární nebo sekundární alifatické aminy. Příkladem je LC-NH<sub>2</sub>. Pomocí WAX lze extrahovat i eluovat jak silné, tak slabé anionty. Eluce se v případě silných aniontů provádí neutralizací sorbentu roztokem s pH o 2 vyšším než pKa pevné fáze, v případě slabých aniontů lze využít i vytěsnění jiným aniontem či neutralizaci aniontu roztokem s pH o 2 nižším než pKa analytu. [1] [8] [12]

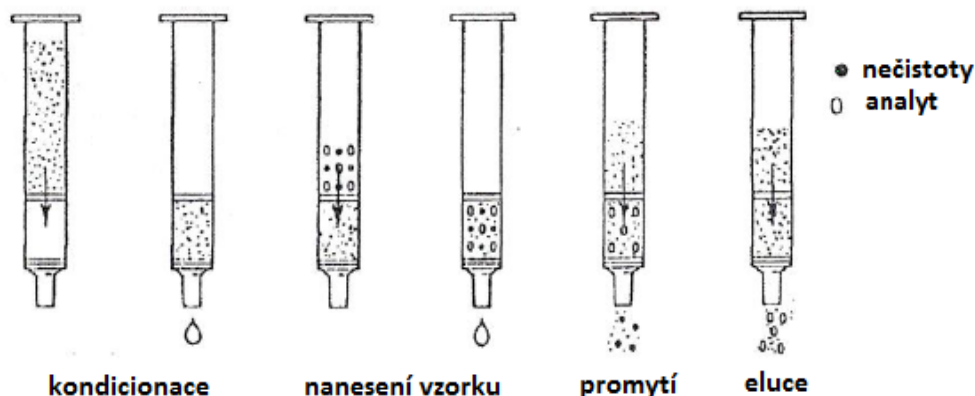
## Kationtově výměnná SPE

Katexy neboli iontoměniče pro kationtově výměnnou SPE jsou nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny, uvolňující a vyměňující kationty. Obdobě jsou děleny na slabé (WCX) a silné (SCX). SCX obsahují alifatické sulfonové, propylsulfonové nebo benzensulfonové funkční skupiny nebo skupiny kyseliny trifluoroctové navázané na povrch silikagelu. Tyto funkční skupiny jsou vysoce kyselé s  $pK_a < 1$  a přitahují či vyměňují kationty ve vzorku. Nacházejí se v disociovaném stavu prakticky při jakémkoli pH (1 – 14), a proto lze SCX využít k extrakci jak silných (velmi vysoké  $pK_a, > 14$ ), tak slabých kationtů (středně vysoké  $pK_a, < 12$ ), obdobně jako při aniontově výměnné extrakci však musí být dodrženy takové hodnoty pH vzorku, aby měl analyt náboj. Pro kladně nabitou extrahovanou látku to znamená pH o 2 menší než  $pK_a$  analytu při disociovaném stavu. Analytem jsou obvykle slabé nebo silné baze. Obdobně, jako je tomu u aniontů a SAX, platí i u SCX, že zatímco slabé analyty kationtové povahy lze extrahovat i eluovat (ať už neutralizací roztokem s pH o 2 vyšším než  $pK_a$  analytu, nebo vytěsněním pomocí jiného, silnějšího kationtu), u silných kationtů dochází k pevným vazbám mezi sorbentem a analytem a eluce i výtěžnost jsou pouze omezené. Pro separaci silných kationtů lze využít WCX. WCX sorbenty jsou nejčastěji tvořeny alifatickými karboxylovými nebo fosfonovými funkčními skupinami navázanými na silikagelový povrch. Karboxylová funkční skupina, používaná jako WCX, má  $pK_a$  4,8. Aby byla disociována, musí být pH alespoň o 2 jednotky vyšší, zároveň však dostatečně nízké pro disociaci analytu. WCX se používá pro extrakci a eluci silných i slabých kationtů. Eluce se dá provést neutralizací pevné fáze roztokem s pH o 2 nižší než  $pK_a$  sorbentu. Slabé kationty mohou být navíc eluovány neutralizací adsorbovaného kationtu roztokem s pH o 2 vyšším než  $pK_a$  analytu, nebo vytěsněním jiným kationtem. Eluce probíhá většinou pomocí vodných roztoků. Pokud je zapotřebí mít extrahovaný analyt v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou, provede se nejdříve eluce kyselým nebo bazickým methanolem v závislosti na  $pK_a$  analytu (viz Henderson-Hasselbalchova rovnice), který se následně odpaří a analyt je pak možné znovu rozpustit v požadovaném organickém rozpouštědle. K okyselení methanolu se používá kyselina octová nebo chlorovodíková, jako bazická složka amoniak. [8] [12]

## **Obecný postup SPE**

Pro samotnou extrakci je nejprve nutné převod vzorku do kapalného stavu a úprava kapalné fáze na podmínky vyhovující stacionární fázi (již popsané pH,

koncentrace organické složky, iontová síla). Poté následuje samotný proces v pěti krocích, viz Obrázek 9. [3]



Obrázek 9. Obecný postup SPE - převzato a upraveno [17]

### 1. Výběr vhodné extrakční kolonky

Volba vhodné extrakční kolonky a především stacionární fáze je základem celého procesu. Výběr byl popsán již v předchozím textu. Pokud jsme již na základě všech kritérií vybrali vhodnou extrakční kolonku s vhodným sorbentem, můžeme přejít k samotné extrakci. [8]

### 2. Kondicionace pevné fáze

Kondicionace, někdy též označovaná jako aktivace sorbentu, slouží k aktivaci funkčních skupin sorbentu a tím k jejich přípravě na extrakci. Často se skládá ze dvou kroků: iniciační solvatace povrchu a ekvilibrace. V prvním kroku, při solvataci, se obvykle využívá methanol, acetonitril, isopropanol nebo jiné středně polární organické rozpouštědlo a dochází kromě smočení a aktivace funkčních skupin i k odstranění vzduchu. Druhý krok, ekvilibrace, se provádí rozpouštědlem, které pokud možno co nejvíc připomíná samotný vzorek nebo matrix, především hodnotou pH, koncentrací organické složky a iontovou silou. To vymyje z kolonky zbytky methanolu a stanoví ideální podmínky pro interakce sorbentu s analytem. Tyto dva kroky obvykle probíhají těsně po sobě, následovány nanesením vzorku, protože je nutné vyhnout se vyschnutí sorbentu. Kromě toho je nutné zajistit dokonalou mísitelnost po sobě jdoucích kapalin. Objem rozpouštědel činí obvykle 1-2 ml na 100 mg sorbentu. Pro jednotlivé extrakční módy se používají typická kondicionační činidla. Pro reverzní fázi (nepolární sorbent) je to organické rozpouštědlo mísitelné s vodou, např. methanol, které je pak následováno vodou či pufrům. V případě normální fáze (polární sorbent) se postup často

zkracuje pouze na kondicionaci rozpouštědlem, ve kterém je analyt rozpuštěn, tzn. uskuteční se pouze ekvilibrace. Používají se např. hexan, dichlormethan, chloroform nebo toluen, obsahující malé procento polárního organického rozpouštědla mísitelného s vodou. U extrakce na bázi iontové výměny se obecně používá roztok, ve kterém je analyt rozpuštěn. [3] [8] [10] [18]

### 3. Nanesení vzorku

Jak již bylo zmíněno, ke správnému naadsorbování analytu je třeba především upravit pH, koncentraci organického rozpouštědla, iontovou sílu rozpouštědla a objem vzorku. Rozpouštědlo musí mít k sorbentu nižší afinitu než analyt. Pro reverzní fáze je vhodné polární rozpouštědlo jako např. voda nebo pufr, pro normální fáze nepolární rozpouštědlo jako např. hexan a pro iontovou výměnu pufr s vhodným pH. Pokud hrozí zacpání frit, je žádoucí vzorek před samotnou extrakcí zcentrifugovat či zfiltrovat. [8] [10]

Důležitým faktorem při nanášení vzorku je rychlost, kterou roztok protéká. Pro extrakci na bázi iontové výměny by rychlost neměla přesáhnout 2 ml/min, pro ostatní sorbenty je to 5 ml/min. Nejvhodnější je průtok „po kapkách“ Rychlost průtoku se dá regulovat silou podtlaku. Objem vzorku se může pohybovat od mikrolitrů až po litry. Při velkých objemech vzorku hrozí nebezpečí odplavení kondicionačního činidla ze sorbentu a tím pádem snížení retence analytu, zvláště u reverzních fází. Proto se doporučuje u vzorků nad 250 ml přidat až 10 % rozpouštědla mísitelného s vodou a zaručit tak správnou kondicionaci sorbentu. [8] [10]

### 4. Promytí

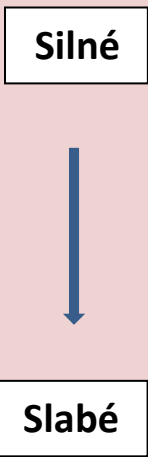
Promytí slouží k odstranění interferujících látek, které zůstaly společně s analytem na sorbentu. Často se provádí postupně vícero rozpouštědly. Používá se přímo rozpouštědlo, v němž byl analyt rozpuštěn, popřípadě jiné rozpouštědlo, které je schopno odstranit nečistoty, aniž by porušilo vazbu analytu na sorbent. Polaritu a vhodnost rozpouštědel znázorňuje Tabulka 2. Obvykle se používá množství o objemu extrakční kolonky (obecně 1 ml/100 mg sorbentu) a je vhodné nechat stacionární fázi 5 až 15 minut „vysušit“ pomocí vakua, aby se zcela odstranila voda použitá k promytí. To usnadní pozdější sušení analytu pod proudem dusíku. Pokud se provádí non-retenční extrakce, kdy se namísto analytu naadsorbují nečistoty, je vhodné sorbent promýt rozpouštědlem, ve kterém byl vzorek rozpuštěn. [3] [8] [10] [17]

## 5. Eluce

Pátý a poslední krok spočívá v zachycení eluátu (analytu) do zkumavky, jeho další úpravě (např. zakoncentrování) a jeho analýze vhodnou analytickou metodou, nejčastěji HPLC. Eluce se provádí rozpouštědlem, které je schopné rozrušit vazby analytu na stacionární fázi. Často se jedná o směs různých rozpouštědel popř. s přídavkem zásad, kyselin, atd. Přehled rozpouštědel znázorňuje Tabulka 2. Je žádoucí zvolit takové rozpouštědlo, které usnadní další úpravy vzorku jako např. odpařování nebo derivatizaci nebo které je kompatibilní s finální analytickou metodou. Vzhledem k vysušení kolonky po promývání není nutné, aby bylo eluční činidlo mísitelné s rozpouštědlem použitým při promývání. [3] [10]

Eluční činidlo se nanáší v objemu od 200  $\mu$ l až po 2 ml v závislosti na velikosti extrakční kolonky. Obecně platí, že výhodnější je nanést eluční činidlo ve dvou menších dílčích dávkách než v celém objemu najednou, protože první nános často slouží ke „smočení“ sorbentu. Eluční činidlo by mělo být v kontaktu se sorbentem 20 s až 1 min, pomalá eluce „po kapkách“ zvyšuje výtěžnost extrakce. [8]

**Tabulka 2. Rozpouštědla pro SPE podle eluční síly - převzato a upraveno [17]**

Normální fáze	Eluční síla rozpouštědla	Reverzní fáze
Hexan		Voda
Isooktan		Methanol
Toluen		Isopropanol
Chloroform		Acetonitril
Dichlormethyl		Aceton
Tetrahydrofuran		Ethylacetát
Ethylether		Ethylether
Ethylacetát		Tetrahydrofuran
Aceton		Dichlormethyl
Acetonitril		Chloroform
Isopropanol		Toluen
Methanol		Isooktan
		Hexan

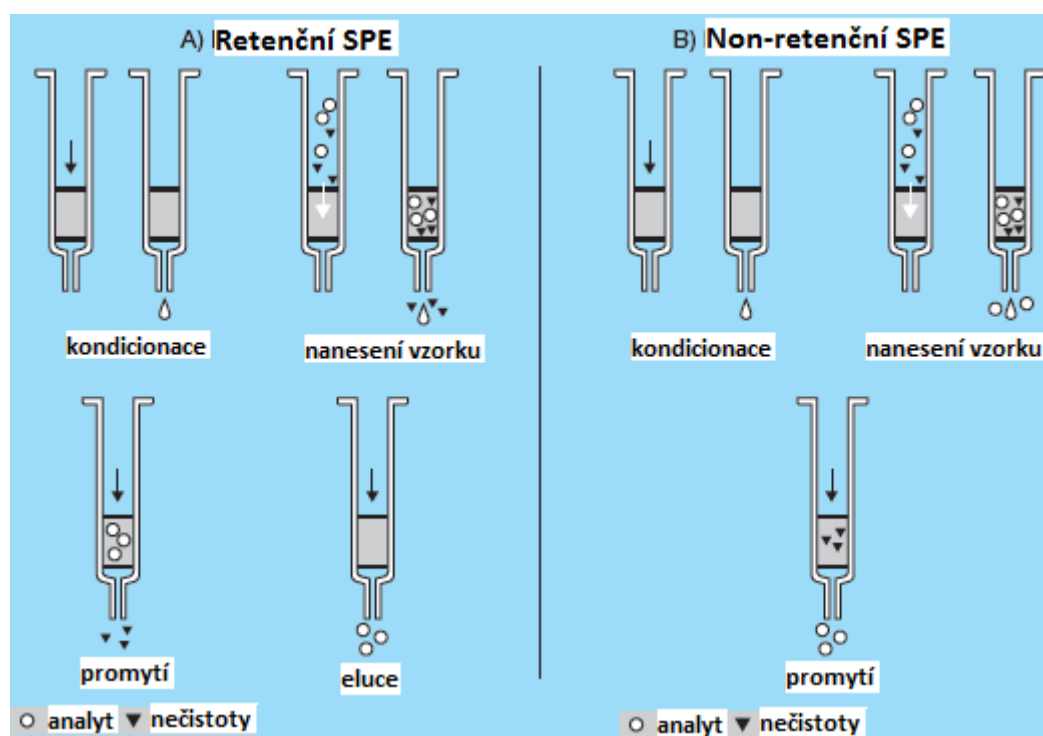
### Možnosti využití SPE

Extrakci na pevné fázi lze využít k získání požadované látky ze vzorku třemi způsoby: selektivní extrakcí, selektivním promytím nebo selektivní elucí. Výběr metody závisí na povaze vzorku a analytu. [8]



## Selektivní extrakce

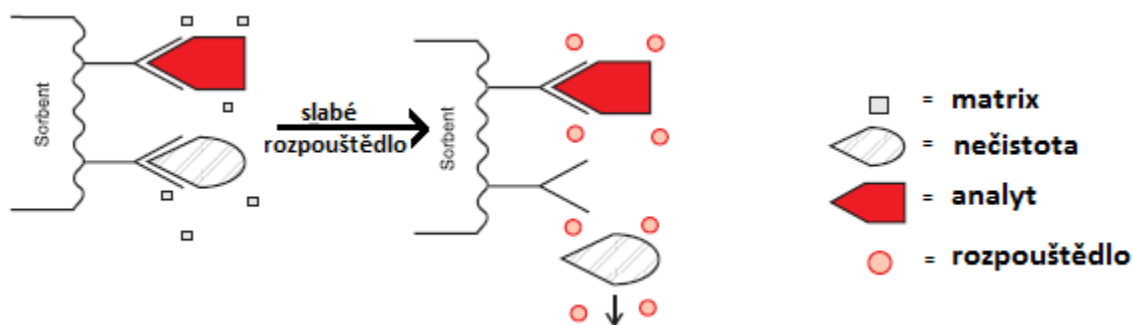
Selektivní extrakce spočívá v navázání vybrané látky na sorbent, zatímco zbytek vzorku projde extrakční kolonkou. Pokud došlo k naadsorbování analytu (tzv. retenční extrakce), lze jej získat jednoduše elucí. Pokud byly naadsorbovány nečistoty (non-retenční extrakce), analyt se uvolní při promývání a samotné kolonky s naadsorbovanými nečistotami se můžeme zbavit (Obrázek 10). [8]



**Obrázek 10. Selektivní extrakce: Retenční a non-retenční SPE – převzato a upraveno [10]**

## Selektivní promytí

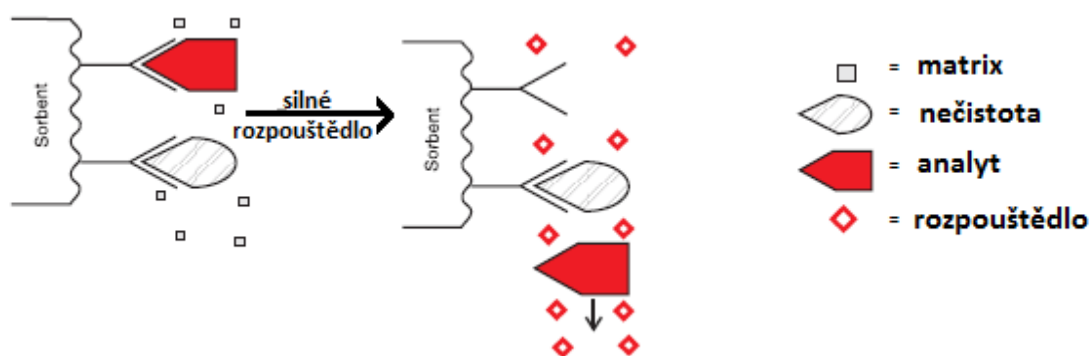
Tato metoda se používá, jsou-li jak analyt, tak nečistoty zadržovány na pevné fázi a zároveň platí, že lze promýt kolonku takovým rozpouštědlem, které je dostatečně silné, aby přerušilo vazby mezi sorbentem a nečistotami, a zároveň tak slabé, aby vazby sorbentu a analytu zůstaly netknuté. Tím dojde k vymytí nečistoty a analyt pak získáme elucí (Obrázek 11). [8]



Obrázek 11. Selektivní promytí - převzato a upraveno [8]

### Selektivní eluce

V případě selektivní eluce je situace opačná – nečistoty i analyt se naváží na pevnou fázi, nečistoty však silněji než analyt. Eluce se provede takovým činidlem, které dokáže uvolnit analyt, zatímco nečistoty zůstanou navázané na pevné fázi (Obrázek 12). [8]



Obrázek 12. Selektivní eluce - převzato a upraveno [8]

## Moderní techniky odvozené od SPE

Poměrně rozšířené jsou mikroextrakce na tuhou fázi. Lze sem zařadit mikroextrakci plněným pevným sorbentem s využitím stříkačky (*microextraction by packed sorbent*, MEPS), extrakci pomocí naplněných špiček pipet (*disposable pipette tip extraction*, DPX), mikroextrakce tuhým vláknem (*solid-phase microextraction*, SPME), sorpční extrakce míchadlem (*stir bar sorptive microextraction*, SBSE) a další. Mezi on-line techniky patří kapilární SPME a extrakce pomocí RAM kolonek (materiály s omezeným přístupem, *restricted access materials*). Technikou s vysokou selektivitou je využití modifikovaných SPE sorbentů, molekulárně vtištěných polymerů (MIPs). MIPs mají sférickou a chemickou paměť pro templát, podle kterého byly vyrobeny. [3] [5]

## **Pevné fáze na základě oxidů kovů**

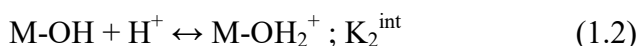
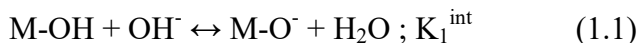
Ačkoliv zlatým standardem v pevných fázích pro SPE jsou stále sorbenty na základě silikagelu, v dnešní době vzrůstá zájem i o pevné fáze na základě oxidů kovů a rozvíjí se jejich výzkum. Stacionární fáze na základě oxidů kovů patří mezi polární anorganické sorbenty. Patří sem oxid zirkoničitý, který je nejstudovanější a nejpoužívanější, oxid titaničitý a oxid hlinitý. Interakce na povrchu těchto sorbentů jsou složitější než u silikagelu, což umožňuje odlišnou selektivitu a nabízí širší pole působnosti pro modifikaci separačních podmínek. [12] [16] [19]

### **Mechanismus interakce oxidů kovů**

Typickým znakem sorbentů na bázi oxidů kovů je schopnost nejen iontové, ale i ligandové výměny. Schopnost tvorby komplexů je umožněna vysokých koordinačním číslem kovů. Složitější povrchové interakce mohou být výhodou i nevýhodou. [16] [20]

#### Interakce na základě iontové výměny

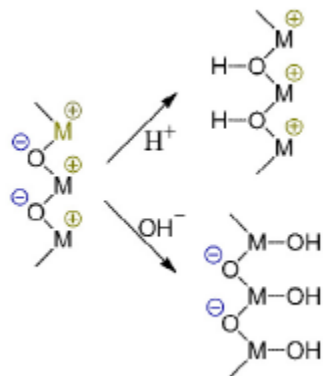
Oxidy kovu se chovají jako amfoterní iontoměniče – mohou vykazovat charakter katexů i anexů v závislosti na hodnotě pH. Iontová výměna je umožněna díky hydroxylovým skupinám, které mohou disociovat (1.1) nebo být protonizovány (1.2).  $K_1^{int}$  a  $K_2^{int}$  jsou vnitřní ionizační konstanty.



Množství protonizovaných ( $M-OH_2^+$ ) a disociovaných ( $M-O^-$ ) částic je vyrovnáno při  $pH_{pzc}$  (*pH of the point of zero charge*, bod nulového náboje), závislém na vnitřních konstantách:

$$pH_{pzc} = 0,5(pK_1^{int} + pK_2^{int}) \quad (1.3)$$

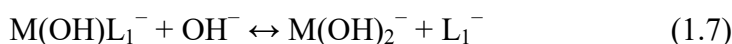
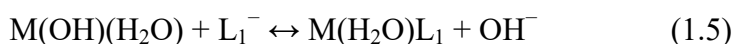
Právě vysoké  $pH_{pzc}$  umožňuje amfoterní charakter sorbentů. Při pH nad hodnotou  $pH_{pzc}$  se budou chovat jako katexy, při pH pod hodnotou  $pH_{pzc}$  jako anexy (Obrázek 13). Při pH rovnému  $pH_{pzc}$  nenesou sorbent žádný celkový náboj. [16] [20]



**Obrázek 13. Chování oxidů kovů v kyselém a bazickém médiu - převzato [20]**

### Ligandová výměna

Ligandová výměna je podmíněna přítomností Lewisových kyselin na povrchu sorbentu, konkrétně atomů  $Ti^{4+}$ ,  $Al^{3+}$  a  $Zr^{4+}$ , a navázanými molekulami vody. Lewisova kyselina je taková látka, která poskytuje vakantní orbital a zároveň přijímá volný elektronový pár. Lewisova base poskytuje volný elektronový pár. Interakce se dají znázornit následujícími rovnicemi, kde M značí oxid kovu,  $L_1$  analyt a  $L_2$  rozpouštědlo, oboje Lewisovy báze. [17] [20] [21]



Studie ligandové výměny byly provedeny na stacionární fázi  $ZrO_2$  bez modifikovaného povrchu. Nutno však podotknout, že žádnou úpravou nelze zcela zablokovat všechna centra Lewisových kyselin, proto tyto vlastnosti do jisté míry vykazují i modifikované sorbenty. [16] [21]

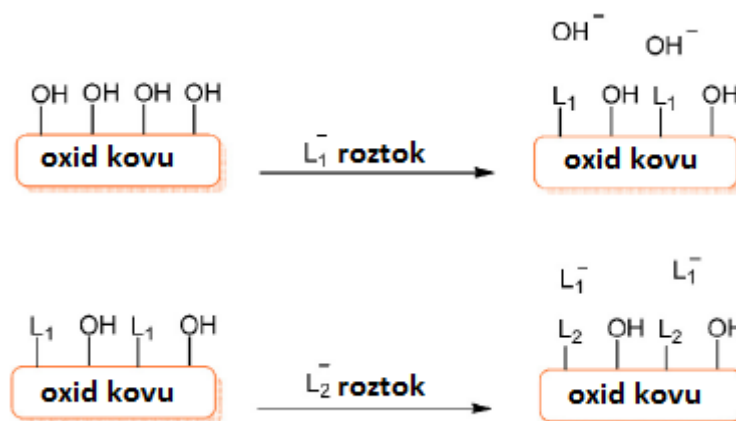
Jak ukazuje rovnice (1.4), přítomnost molekul vody jakožto Lewisových bází je pro ligandovou výměnu nezbytná, protože mohou být vyměněny za jinou Lewisovu bazi. Reakce proběhne tím snadněji a rychleji, čím silnější Lewisova base je. Síla Lewisovy baze je dána její elektronovou hustotou a polarizovatelností. [16] [21]

Srovnání síly některých Lewisových bází:

fosfát > fluorid > citrát > sulfát > acetát > mravenčan > nitrát > chlorid

Možná je i výměna za hydroxylovou skupinu  $\text{OH}^-$ , viz (1.5), ta je však jednou z nejsilnějších monovalentních Lewisových bází a je tedy vázána silněji než molekula vody, proto obecně platí, že proces (1.4) je důležitější. Rozhodující vliv na to, která reakce proběhne, má hodnota pH. Proces (1.5) probíhá prakticky pouze za nižšího pH. [16] [20] [21]

Celý proces schematicky znázorňuje Obrázek 14.



**Obrázek 14. Ligandová výměna: nanesení vzorku (nahore) a eluce (dole) - převzato a upraveno [20]**

#### Interakce analytu a modifikovaných sorbentů

Typ modifikace rozhoduje, jestli bude sorbent použit jako reverzní fáze, nebo jako iontově výměnná fáze. Povrchové úpravy se často využívá pro získání pevné fáze s extrakčními schopnostmi podobnými silikagelu, ale zároveň stabilní při extrémních podmínkách. Modifikace pevných fází na základě oxidů kovů umožňují hydroxylové skupiny na povrchu nebo může modifikace proběhnout interakcí Lewisova báze – Lewisova kyselina. Povrchová aktivita upravených stacionárních fází vykazuje iontovou a ligandovou výměnu, adsorpci, hydrofobní či hydrofilní interakce a vznik vodíkových můstků. Modifikaci sorbentu lze provést čtyřmi způsoby: dynamickou, permanentní kovalentní, polymerním pokrytím a uhlíkovým pokrytím. Cílem modifikace je blokáce center Lewisových kyselin. Dynamická modifikace spočívá v zastínění Lewisových kyselin přidáním vysoce reaktivních sloučenin do rozpouštědla. Jedná se o silné Lewisovy báze (fluoridy, fosfáty, EDTA). Permanentní kovalentní modifikace byla zkoušena silanizací, reakcí s fosfáty, EDTA fosfonátovými analogy či fluoridy. Modifikace polymerem je jednou z nejčastějších úprav. Pokrytí polystyrenem (PS) dodává sorbentu vlastnosti podobné fenylovaným sorbentům na bázi silikagelu,

polybutadien (PBD) zase přibližuje vlastnosti silikagelu modifikovaného C8 či C18 a polyethylenimin zaručuje aniontovou výměnu. Modifikaci uhlíkem lze provést pouze u zirkonia za vysoké teploty (700 °C). Mechanismus extrakce spočívá pouze v adsorpci na rigidní povrch uhlíku, roli hrají  $\pi$ - $\pi$  interakce. Sorbent je selektivnější pro polární i nepolární geometrické izomery. [16] [19] [20]

Příklady ukazuje Obrázek 15.



**Obrázek 15. Interakce mezi analyty a některými modifikovanými sorbenty na bázi oxidů kovů - převzato a upraveno [20]**

### Eluce analytu

Eluci analytu popisují rovnice (1.6) a (1.7). Jak z rovnic vyplývá, eluce může být ovlivněna koncentrací a silou Lewisovy báze v rozpouštědle. Dalším faktorem je teplota. Ve studii provedené na  $ZrO_2$  byla zjištěna lineární korelace mezi  $\log k$  (kapacitní faktor) a  $pK_a$  analytů (derivátů benzoových kyselin). Extrakce nejlépe probíhala při  $pK_a$  elučního činidla  $\sim$  pH analytu. [22]

## **Oxid zirkoničitý**

### Fyzikální vlastnosti

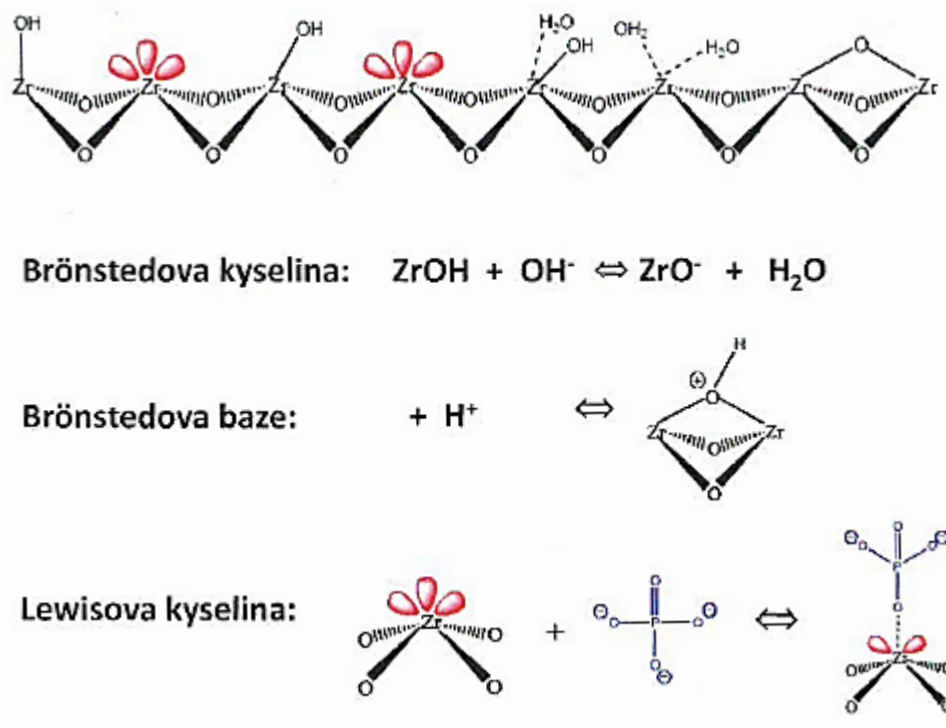
Oxid zirkoničitý ( $ZrO_2$ ) se může vyskytovat v řadě krystalických forem i jako amorfni látka. Typ krystalické soustavy závisí na teplotě: jednoklonná (při laboratorní teplotě), čtverečná (teplota nad 1175 °C) a krychlová (teplota nad 2350 °C). Jedna soustava přechází v druhou se zvyšující se teplotou. Prakticky využívaná je zatím pouze jednoklonná soustava ve formě monodisperzních sférických částic. [12] [16] [23]

Největší předností oxidu zirkoničitého oproti silikagelovým sorbentům je jeho unikátní chromatografická selektivita doprovázená extrémní chemickou i tepelnou stabilitou. Na rozdíl od silikagelu je stabilní při vysokém tlaku, v celém rozsahu pH a při teplotách dosahujících 200 °C. Oproti polymerním bazím si při různém složení rozpouštědla zachovává stále stejnou plochu. Navíc se vyznačuje vysokou efektivitou a mechanickou odolností. Průměr částic komerčně dostupného sorbentu se pohybuje od 1,9  $\mu m$  (pro analytické účely) až do 25  $\mu m$  (pro přípravu vzorku). [12] [24]

Oxid zirkoničitý má díky hustotě  $5,8 \text{ g/cm}^3$  vysokou odolnost. Se zvyšující se teplotou se plocha  $\text{ZrO}_2$  snižuje (při  $t > 500 \text{ }^\circ\text{C}$  je menší než  $100 \text{ m}^2/\text{g}$ ), naopak průměr pórů se zvětšuje. Pro analýzu je vhodnější sorbent s minimálním počtem mikropórů, protože v přítomnosti mikropórů se větší molekuly nedostanou k povrchu pórů a zároveň brání přístupu menším molekulám. Na teplotě závisí i tvar pórů. Za nižších teplot jsou částice sférické či kónické, za vyšších více cylindrické, při přiblížení se k bodu tání dochází až k jejich spečení. Nejvýhodnější jsou monodisperzní kulovité částičky, které usnadňují průtok mobilní fáze. [11] [23]

### Chemické vlastnosti

Selektivita oxidu zirkoničitého se od silikagelu zásadně liší. Je to amfoterní iontoměnič. Obdobně jako silikagel obsahuje na povrchu hydroxylové skupiny, navíc se zde však vyskytují i adsorpční centra na bázi Lewisových kyselin. Na oxid zirkoničitý se lze dívat ze tří důležitých úhlů: a) Brønstedova kyselina, b) Brønstedova báze, c) Lewisova kyselina (Obrázek 16). Kyslík sousedící s atomy zirkonia zastupuje Lewisovu bázi (donor elektronů). Brønstedovy kyseliny jsou zastoupeny hydroxylovými skupinami, v tomto případě méně kyselými než u silikagelu. [12] [24]



Obrázek 16. Interakce na povrchu  $\text{ZrO}_2$  - převzato [12]

Dominantní jsou vzhledem k největšímu zastoupení na povrchu místa charakteru Lewisovy kyseliny, tvořené vakantními orbitaly zirkonia, které dávají vznik kladně nabitému  $Zr^{4+}$ . Protože je  $Zr^{4+}$  multivalentní, může být na jednom atomu navázáno více ligandů. Aby tato adsorpční centra netvořila s např. karboxylovými, hydroxylovými či fosfátovými skupinami rozpouštědel ireversibilní komplexy, je nutné přidávat do kapalně fáze pufr obsahující Lewisovy baze (např. fosforečnan). Na interakce zajišťující extrakci mají tedy vliv vlastnosti analytu, pH a typ pufru, celková iontová síla a koncentrace organické složky. Oxid zirkoničitý lze díky rozmanitosti interakcí analyt-sorbent používat v různých separačních módech,  $pH_{pzc}$  má hodnotu 8. Při nižším pH je povrch sorbentu nabit kladně, při vyšším záporně. Nemodifikovaný se používá v normálním módu, jako modifikovaný v reverzním. [12] [24] [25]

#### Komerčně dostupné stacionární fáze na základě $ZrO_2$

Komerčně dostupné sorbenty na bázi zirkonia dodávají firmy ZirChrom a Sigma-Aldrich. [25] [26]

Tabulka 3 znázorňuje příklady fází od společnosti ZirChrom a jejich módy. [25] [26]

**Tabulka 3. Komerčně dostupné zirkoniové stacionární fáze - převzato a upraveno [16]**

Název	Separací mód	Název	Separací mód
DiamonBond C18	reverzní	ZirChrom® SAX	silný anex
ZirChrom® Carb	reverzní	ZirChrom® SHAX	silný anex
ZirChrom® PS	reverzní	ZirChrom® WAX	slabý anex
ZirChrom® EZ	reverzní	ZirChrom® WCX	slabý katex
ZirChrom®-PBD	reverzní	ZirChrom® PEZ	katex
ZirChrom® Phase	normální		

WCX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný 1,4-butandioldiglycidyletherem;  
WAX: s navázaným polyethyleniminem; SAX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný 1,4-butandioldiglycidyletherem a kvaternizovaný methyljodidem; SHAX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný diiododekanem a kvaternizovaný methyljodidem.,  
PBD: polybutadien; PEZ: P-EDTA; PS: polystyren; EZ: P-EZ modifikovaný pomocí P-EDTA

#### Použití $ZrO_2$

Obecné uplatnění práškového  $ZrO_2$  je široké. Využívá se jako substrát pro fluorescentní a fotosensitivní sloučeniny, keramické, nanokeramické a biokeramické materiály. V krychlové krystalické soustavě je využíván jako pevný



elektrolyt a jako povlakový materiál pro ocel proti rzi. Čtverečná a jednoklonná krystalická forma se využívají jako katalyzátory nebo jejich nosiče. Pro nás je zásadní jeho využití jako sorbentu. Oxid zirkoničitý vykazuje vysokou afinitu k polyoxylovým aniontům (fosfáty, boráty, karboxyláty a sulfáty), je tedy schopný separovat látky s těmito funkčními skupinami, a to i jako modifikovaný pomocí kovů ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZrO}_2$ ,  $\text{CeO}_2\text{-ZrO}_2$ ) či jako mezoporózní silikagel obalený  $\text{ZrO}_2$  (separace fosfátů, glykopeptidů, sfingolipidů). Samotný  $\text{ZrO}_2$  se ukázal jako vhodný pro separaci látek s *cis*-diol funkční skupinou. Modifikované sorbenty (Z-Sep a Z-Sep+) lze využít k úpravě vzorků pro analýzu pesticidů s vysokým obsahem tuků, jako jsou oleje, Zr-MOF (*metal-organic frameworks*, ionty kovu s organickými ligandy v rigidní trojrozměrné struktuře) byl zase použit k extrakci rtuti z rybích vzorků. [21] [27] [29] [30] [31]

## Oxid titaničitý

### Fyzikální vlastnosti

Oxid titaničitý existuje ve třech krystalických soustavách – anatas, rutil a brookit. Brookit je nestabilní, anatas je stabilní do 800 °C, pak přechází v rutil. Atom titanu má koordinační číslo 6. Obdobně jako u oxidu zirkoničitého s teplotou klesá velikost povrchu částic a velikost pórů. Průmyslově vyráběné kolony Sachtapore®-NP obsahují částice o velikosti 3, 5, 10, 20, 40 nebo 80  $\mu\text{m}$  s velikostí pórů 60, 100, 300, 1000 nebo 2000 Å, což umožňuje jejich využití jak v analýze, tak v přípravě vzorku. Částice jsou sférické, stabilní při pH 1 až 14 a při teplotách do 100 °C. [16] [32]

### Chemické vlastnosti

Obdobně jako  $\text{ZrO}_2$  obsahuje i  $\text{TiO}_2$  na svém povrchu místa Lewisových kyselin, reprezentovaných atomem  $\text{Ti}^{4+}$ . Kromě toho obsahuje hydroxylové skupiny, jejichž disociace závisí na pH prostředí a přítomnosti molekul vody. Hodnota  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  je 5. Čistý oxid titaničitý lze použít k separaci bazických molekul, protože je nejsilnější Brønsted-Lowryho kyselinou ze zmíněných oxidů kovů. [16]

### Použití

Sorbenty s oxidem titaničitým jsou využívány při SPE, MSPE (*magnetic solid-phase extraction*) či SPME. Obdobně jako  $\text{ZrO}_2$  se dá využít k extrakci látek s fosfátovými skupinami, glykopeptidů, iontů kovů, pesticidů, případně v dalších modifikacích byl použit k extrakci patogenních bakterií (magnetický  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pokrytý

TiO<sub>2</sub>), exogenních estrogenů, polycyklických aromatických uhlovodíků, fenolů, alkoholů, aminů a aromatických karboxylových kyselin. [20]

## **Oxid hlinitý**

### Fyzikální vlastnosti

Oxid hlinitý se vyskytuje jako amorfni látka nebo v množství krystalických forem ( $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ - a  $\chi$ -), lišících se množstvím navázané vody.  $\alpha$ -krystalická forma je bezvodá forma. Díky této rozmanitosti je povrch sorbentu heterogenní, zvláště z hlediska navázaných molekul vody. Po odpaření jejích molekul dojde k formaci míst Lewisových kyselin. Sorbent je hygroskopický, a přestože je často používán, nebyla jeho přesná struktura pro HPLC zatím systematicky prozkoumána. V chromatografii je nejčastěji využívána  $\gamma$ -forma, někdy nazývaná „aktivovaná“ díky ploše až několik set m<sup>2</sup>/g. [16] [20]

### Chemické vlastnosti

Chemické vlastnosti závisí, jako u všech sorbentů na základě oxidů kovů, na parciálním náboji na hydroxylových skupinách. Náboj se liší podle typu skupiny, tedy podle krystalické soustavy. Atomy hliníku jsou situovány tetragonálně nebo oktahedrálně, zároveň se zde nachází místa Lewisových kyselin (Al<sup>3+</sup>) a Lewisových bazí (nesaturované atomy kyslíku). [16]

### Použití

Oxid hlinitý se přednostně využívá k separaci nasycených a nenasycených alifatických a polyaromatických uhlovodíků. Adsorpčními vlastnostmi se blíží silikagelu, na jeho povrchu však může docházet k ireverzibilní adsorpci či ke katalitickému štěpení analyzovaných látek, proto je v praxi využíván méně. Mezi další oblasti využití patří analýza v petrolejovém průmyslu, biologických vzorků (zvláště separace látek obsahujících fosfátovou skupinu), potravin a polutantů životního prostředí, a to kromě chromatografie metodami SPE, DSPE (*dispersive SPE*), SPME a MSPDE (*matrix solid phase dispersion extraction*). Po modifikaci Tweenem 8 byl použit k separaci stopových prvků. [20] [33] [34]

## **Kvantitativní vyhodnocení HPLC záznamu**

Při kvantitativním hodnocení určujeme vztah mezi odezvou detektoru – nejčastěji plochou píku – a množstvím eluované látky. Pro získání přesných a správných výsledků je stěžejní správně provést integraci píků. Software přístrojů většinou obsahuje přednastavené způsoby integrace, které se dají upravit dle potřeby. Chybné určení plochy píků je nejčastější chybou při zpracovávání chromatografických dat. Metoda použitá ke zjištění plochy u standardu musí být použita u stanovované látky a naopak, Za předpokladu, že píky jsou úzké a symetrické, lze místo plochy využít výšku píku.

Metody kvantitativního stanovení jsou relativního charakteru, koncentrace látky se tedy zjišťuje porovnáním se standardem. Používají se tyto metody: metoda vnějšího standardu, metoda vnitřního standardu, metoda standardního přídatku a metoda vnitřní normalizace. [3]

### Metoda vnějšího standardu

Tuto metodu lze použít, pokud je možné zanedbat vliv matrice vzorku. Proveďte analýzu série (5 až 7) standardů o různé, ale známé koncentraci a určte kalibrační funkci  $X = f(c)$ , kde  $X$  představuje plochu (popř. výšku) píku a  $c$  koncentraci analyzované látky. Nejspolehlivější výsledky poskytuje lineární funkce, linearita však není podmínkou. Měření se doporučuje dvakrát až třikrát opakovat. Kalibrační přímku lze obecně definovat takto:

$$x_i = a + bc_i$$

kde  $x_i$  je hodnota veličiny  $X$  (plocha píku) pro koncentraci  $c_i$ ,  $b$  je směrnice přímky,  $a$  je úsek na ose  $y$  (pokud přímka prochází počátkem, pak  $a = 0$ ).

### Metoda vnitřního standardu

Principem této metody je přidání vnitřního standardu o stejné známé koncentraci ke standardu i ke vzorku. Díky zachování poměru vnitřního standardu a analyzované látky se eliminují případné chyby při přípravě či jiné změny pracovních podmínek. Vnitřní standard by měl být oddělený od všech složek vzorku, zároveň by však měl být eluován v blízkosti zkoumané látky a mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Metodu lze použít buď sestavením kalibrační křivky, nebo přímým porovnáním. Kalibrační křivka je sestavena obdobně jako v předchozím případě: ke všem roztokům analytu (standardům o různé koncentraci i vzorku) se přidá známé množství vnitřního

standardu. Kalibrační křivka je pak funkcí závislosti poměru ploch analytu a vnitřního standardu na koncentraci analytu. Metoda přímého porovnání spočívá v přidání známého množství vnitřního standardu ke vzorku o neznámé koncentraci. Poté se změří standard o známé koncentraci s přidavkem známého množství vnitřního standardu. Pokud je množství vnitřního standardu v obou případech stejné, lze neznámou koncentraci vypočítat podle rovnice:

$$c_x = \frac{A_i}{A_S} \cdot \frac{A_{IS,S}}{A_{IS,i}} \cdot c_S$$

kde  $c_x$  je neznámá koncentrace,  $A_i$  je plocha analytu ve vzorku,  $A_S$  je plocha analytu ve standardu,  $A_{IS,i}$  a  $A_{IS,S}$  jsou plochy vnitřního standardu ve vzorku a ve standardu a  $c_S$  je koncentrace standardu. [3]

#### Metoda standardního přidavku

Tato metoda se používá u složitějších reálných vzorků. Principem je přidání přesného a známého množství právě té látky, u které je stanovována neznámá koncentrace, k analyzovanému vzorku. Provede se analýza vzorku s přidaným známým množstvím analytu v několika koncentracích a samotného vzorku bez přidavku, sestaví se kalibrační křivka, ze které se následně určí koncentrace vzorku. Musí být zaručena linearita mezi odezvou a koncentrací. [3]

#### Metoda vnitřní normalizace

Koncentrace analytu se vyjádří jako procentuální podíl ze všech píků se zanedbáním píku rozpouštědla a píků pod hranicí zanedbatelnosti. Všechny složky se však musí eluovat, být detekovatelné, dostatečně rozdělené a identifikovatelné. [3]

## **Cíle**

Tato diplomová práce je zaměřena na studium podmínek pro SPE extrakci indometacinu z čípků pomocí oxidu zirkoničitého jako sorbentu. Testovali jsme vliv složení rozpouštědla pro vzorek, kondicionaci, promytí a eluci indometacinu tak, aby byla zajištěna maximální výtěžnost.

# **Experimentální část**

## **Přístrojová technika**

### **Vybavení pro SPE**

SPE Manifold Supelco Visiprep - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

Polypropylenové SPE kolonky 1 ml - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

PE frity pro 1ml SPE kolonky - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

ZirChrom-PHASE 25  $\mu\text{m}/300\text{\AA}$  - ZirChrom (Anoka, USA)

### **Chromatografický systém**

HPLC systém Prominence - Shimadzu (Kyoto, Japonsko):

- degasser DGU-20A<sub>3</sub>
- pumpy LC-20AD
- autosampler SIL-20AC
- řídicí jednotka CBM-20A
- kolonový prostor CTO-20AC
- detektor SPD-20A

### **Podmínky analýzy**

- kolona ZORBAX SB-Aq, 80 $\text{\AA}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm – Agilent (Kalifornie, USA)
- mobilní fáze: MeOH-1% CH<sub>3</sub>COOH (70:30, v/v)
- průtok: 0,6 ml/min
- nástřik 10  $\mu\text{l}$  a 20  $\mu\text{l}$
- teplota kolonového prostoru: 40 °C
- detektor: 220 nm a 240 nm

### **Ostatní laboratorní zařízení**

Acidimetr 333 pH-metr - Druopta Praha (Praha, ČR)

Kraintek K-10 ultrazvuková lázeň - Kraintek s.r.o. (Podhájska, Slovenská republika)

Kern ABT 220-4M analytické váhy - KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo)

Laboratorní sklo, pomůcky a zařízení pro zahuštění dusíkem, míchačka, sušárna

## **Chemikálie**

Dichlormethan, kyselina octová - Lach-Ner - Neratovice, ČR

Ethylether, hydroxid sodný p.a., chloroform, kyselina dusičná, kyselina chlorovodíková, propan-2-ol - Penta - Praha, ČR

Aceton, acetonitril, diklofenak, hexan, ibuprofen, indometacin, methanol - Sigma Aldrich – St.Luis, USA

Adeps solidus - Dr. Kulich Pharma - Hradec Králové, ČR

Čištěná voda (pokud je v diplomové práci zmíněno užití vody, je tím myšlena čištěná voda) - Merck Millipore - Merck-Darmstadt, Německo

1M amoniak v methanolu a 1M amoniak v acetonu byly připraveny zavedením plynného amoniaku do rozpouštědla. Přesná koncentrace látek byla titrací stanovena u 1M amoniaku v methanolu na 1,32 mol/l, u 1M amoniaku v acetonu na 1,16 mol/l.

Indometacin Berlin-Chemie 100MG Čípek - Berlin-Chemie – Praha, ČR

## **Příprava roztoků**

### **Ředění 1M NH<sub>3</sub> v methanolu, popř. acetonu**

NH<sub>3</sub> byl dle konkrétního pokusu ředěn methanolem nebo acetonem na příslušnou koncentraci.

### **Mobilní fáze A**

70% methanol byl připraven smícháním methanolu s vodou v poměru 7:3, v/v.

### **Mobilní fáze B**

1% kyselina octová byla připravena ředěním 1 g kyseliny octové vodou na 100 ml.

### **Zásobní roztok indometacinu (diklofenaku) o koncentraci 1 mg/ml**

10 mg indometacinu (diklofenaku) bylo rozpuštěno v 10ml odměrné baňce a doplněno po rysku methanolem.

### **Zásobní roztok indometacinu o koncentraci 5 mg/ml**

25 mg indometacinu bylo rozpuštěno v 5ml odměrné baňce a doplněno po rysku methanolem.

### **Roztok indometacinu o koncentraci 50 µg/ml**

100 µl ze zásobního roztoku IND v methanolu o koncentraci 5 mg/ml bylo v 10ml odměrné baňce doplněno příslušným rozpouštědlem po rysku.

### **Roztok indometacinu a diklofenaku o koncentraci 25 µl/ml**

125 µl zásobního roztoku diklofenaku o koncentraci 1 mg/ml a 125 µl zásobního roztoku indometacinu o koncentraci 1 g/ml bylo v 5ml odměrné baňce doplněno po rysku příslušným rozpouštědlem.

### **Roztok indometacinu a adeps solidus o koncentraci 25 a 50 µg/ml**

180 mg adeps solidus a vypočítané množství (2,5 nebo 5 mg) IND bylo rozpuštěno doplněno po rysku v 10ml odměrné baňce. 500 µl tohoto roztoku bylo v 5ml odměrné baňce doplněno po rysku příslušným rozpouštědlem.

### **Roztok o koncentraci 25, 50 a 100 µg/ml indometacinu a 10, 20 a 40 µg/ml diklofenaku**

Vypočítané množství zásobního roztoku IND o koncentraci 5 mg/ml (50, 100 nebo 200 µl) a vypočítané množství zásobního roztoku DIC o koncentraci 1 mg/ml (100, 200 nebo 400 µl) bylo v 10ml odměrné baňce doplněno po rysku 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



### **Čípek**

1 čípek vážil 1,9 g, z toho 0,1 g představoval IND. Modelový čípek byl připraven z čistého IND a adeps solidus (AS).

### **Roztok modelového čípku o koncentraci 50 nebo 100 µg/ml indometacinu a 20 nebo 40 µg/ml diklofenaku**

180 mg adeps solidus, vypočítané množství zásobního roztoku IND o koncentraci 1 mg/ml (250 a 500 µl) a vypočítané množství zásobního roztoku DIC o koncentraci 1 mg/ml (100 a 200 µl) bylo v 5ml odměrné baňce doplněno po rysku 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### **Roztok čípku o koncentraci 50 µg/ml indometacinu a 20 µg/ml diklofenaku**

0,0475 g čípku bylo rozpuštěno v 10ml odměrné baňce. K 1 ml tohoto roztoku v 5 ml odměrné baňce bylo přidáno 100 µl zásobního roztoku DIC o koncentraci 1 mg/ml a baňka byla doplněna po rysku příslušným rozpouštědlem.

### **Regenerace sorbentu**

Regenerace byla prováděna po 1 g ZrO<sub>2</sub> v 15 ml plastové zkumavce. Postupně byl ZrO<sub>2</sub> promýván následujícími činidly:

10 ml 0,1M hydroxidu sodného, 10 min v ultrazvukové lázni

2× 10 ml vody

10 ml 0,1M kyseliny dusičné, 10 min v ultrazvukové vaně

10 ml vody, opakovat, dokud není pH neutrální

10 ml MeOH, 10 min v ultrazvukové vaně

10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 min v ultrazvukové vaně

Následně bylo přebytečné rozpouštědlo slito a ZrO<sub>2</sub> se nechal sušit v sušárně při 60 °C.

## **Výsledky a diskuze**

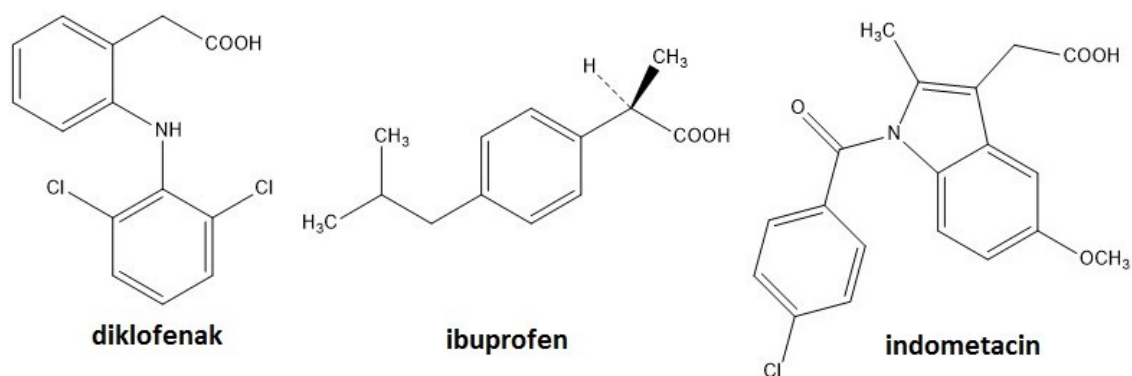
Experimenty navazují na předchozí práci [35], ve které byl testován oxid zirkoničitý jako vhodný materiál pro extrakci ibuprofenu na základě interakce Lewisova kyselina-Lewisova báze. Cílem mojí práce bylo otestovat oxid zirkoničitý jako vhodný materiál pro extrakci jiné Lewisovy báze – indometacinu (IND). Indometacin se nachází také ve formě čípků, jejichž analýza je komplikovaná díky tomu, že čípkový základ je jen velmi málo rozpustný v rozpouštědlech, která se běžně používají pro HPLC. Extrakce pomocí  $ZrO_2$  by mohla značně zjednodušit přípravu vzorku před analýzou, jako tomu bylo v případě ibuprofenu [35].

Pro hodnocení extrakce IND byla optimalizována HPLC metoda na základě literárních zdrojů [36] [37] [38] [39]. Jako stacionární fázi jsme použili kolonu ZORBAX SB-Aq, 80Å, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm a jako mobilní fáze byla použita: MeOH-1%  $CH_3COOH$  (70:30, v/v). Na základě předchozích experimentů byly jako vhodný vnitřní standard testovány dvě strukturálně podobné látky - diklofenak a ibuprofen (Obrázek 17). Díky lepší odezvě a lepšímu rozlišení mezi píky diklofenaku a indometacinu byl jako vhodný vnitřní standard zvolen diklofenak (DIC).

Extrakční kolonky byly připraveny v čase potřeby naplněním 100 mg oxidu zirkoničitého do 1ml extrakční kolonky z propylenu mezi dvě polyethylenové frity. V určitých fázích bylo nutné sorbent regenerovat a byly testovány vlastnosti takto regenerovaného  $ZrO_2$ .

Nejdříve byla zkoumána retence samotného indometacinu, poté extrakční výtěžnost roztoků obsahujících vnitřní standard. Dále byl zkoumán vliv čípkoviny na extrakci – nejdříve formou modelového čípku s *adeps solidus* a poté s průmyslově vyrobeným čípkem.

K eluci IND a DIC byl použit roztok amoniaku o různé koncentraci, který je jednou z nejsilnějších Lewisových bází vůbec.



**Obrázek 17. Diklofenak, ibuprofen a indometacin**

### **Volba kondicionačního činidla**

V prvním kroku bylo třeba nalézt vhodné rozpouštědlo pro indometacin, respektive čípek. Z různých rozpouštědel byly vyzkoušeny směsi methanolu a hexanu v poměru 7:3, v/v, dichlormethanu a chloroformu. Zbylé podmínky byly zvoleny podle předchozího experimentu SPE extrakce ibuprofenu z čípku pomocí oxidu zirkoničitého [35], a to následovně:

Kondicionace 1 ml hexanu, poté bylo nanášeno 0,5 ml vzorku. Dle obecného postupu SPE se k promytí použilo kondicionační činidlo, tzn. 5 ml hexanu, poté 1 ml vody a 1 ml MeOH. Eluce proběhla 3 ml 1M amoniaku v MeOH. Eluát byl vysušen pomocí dusíku, následně rozpuštěn v 0,5 ml 70% MeOH a analyzován pomocí HPLC metody, detekce 240 nm.

Extrakcí za těchto podmínek však nebylo dosaženo dostatečné výtěžnosti. Při zkoušení methanolu jakožto polárnějšího činidla zase naopak došlo k příliš nízkému zadržení analytu na  $ZrO_2$ . Kondicionační činidlo by zároveň mělo sloužit i jako rozpouštědlo pro vzorek, tedy čípek obsahující nepolární čípkový základ – *Adeps solidus*. Kondicionační činidlo tedy musí obsahovat nepolární složku pro rozpuštění čípkoviny, ale zároveň musí zabránit příliš silnému navázání IND na sorbent.

Jako vhodná kondicionační činidla byly vyzkoušeny dichlormethan a chloroform. Byla ověřena rozpustnost čípku i samotného IND v činidlech. Poté byly připraveny roztoky činidel s IND o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a provedena extrakce. Ke kondicionaci byl použit 1 ml příslušného rozpouštědla ( $\text{CHCl}_3$  nebo  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), vzorek byl rozpuštěn v témže rozpouštědle a bylo nanášeno 0,5 ml vzorku. Kolonka byla následně promyta 5 ml příslušného rozpouštědla, 1 ml vody, 1 ml MeOH a eluci byla provedena 3 ml 0,5M  $\text{NH}_3$  v MeOH. Všechny frakce byly zachyceny, odpařeny pomocí

dusíku, rozpuštěny v 0,5 ml 70% MeOH a analyzovány při 240 nm. Standard byl připraven odpařením 0,5 ml vzorku pomocí dusíku a rozpuštěním v 0,5 ml 70% MeOH.

V případě dichlormethanu byla výtěžnost 64 %, v případě chloroformu 57 %. Z ostatních frakcí byl IND detekován pouze v methanolu použitým k promytí, a to v zanedbatelném množství. Lze tedy předpokládat, že část analytu zůstala navázána na sorbentu. Proto byl do kondicionačního činidla přidán podíl polárnější složky, která by zajistila slabší navázání IND na sorbent. Podle lepších výsledků byl jako vhodnější základ kondicionačního činidla zvolen dichlormethan, polárnější složka byla zastoupena methanolem. Obsah methanolu činil 0, 5 nebo 10 % (Tabulka 4). Extrakce byly provedeny stejným způsobem jako předchozí s tím rozdílem, že jak k promytí, tak k rozpuštění vzorku byl použit vždy čistý dichlormethan. Jako nejlepší kondicionační činidlo se ukázal poměr MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5:95, v/v.

**Tabulka 4. Vliv podílu methanolu v kondicionačním činidle na výtěžnost extrakce, vztaženo ke standardu**

Obsah MeOH	0 %	5 %	10 %
IND	64 %	90 %	86 %

Extrakci byla provedena i pomocí oxidu titaničitého jako sorbentu, na rozdíl od oxidu zirkoničitého byla adsorpce IND na oxid titaničitý minimální.

V této fázi byla kvůli nedostatku sorbentu provedena jeho regenerace. Tento proces však ovlivnil vlastnosti sorbentu včetně vhodných podmínek kondicionace. Proto byla provedena další, rozsáhlejší kondicionace dichlormethanem s různým obsahem MeOH, konkrétně 5, 10, 15, 20 a 25 %, v/v, viz Tabulka 5. Zároveň, aby se zabránilo případným ztrátám při odpařování eluátu, byl eluát ihned po extrakci neutralizován kyselinou octovou a v 5ml odměrné baňce doplněn po rysku 70% MeOH. Roztok byl následně analyzován při vlnové délce 240 nm. Tento postup byl aplikován i u následujících extrakcí.

Koncentrace vzorku byla 25 µg/ml, standard byl připraven napipetováním 0,5 ml roztoku IND o koncentraci 50 µg/ml do 5ml odměrné baňky a doplněn po rysku 70% MeOH.

**Tabulka 5. Vliv obsahu MeOH při kondicionace regenerovaného sorbentu, vztaženo ke standardu**

podíl MeOH	IND
5 %	75 %
10 %	73 %
15 %	86 %
20 %	95 %
25 %	84 %

Kondicionace 1 ml 5, 10, 15, 20 nebo 25% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH

Extrakce s nejvyšší výtěžností, tzn. s kondicionací 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, byla třikrát zopakována kvůli reprodukovatelnosti. Výsledky se však ukázaly znatelně nižší než v předchozí extrakci, což mohlo být způsobeno chybou v předchozím měření. Extrakce byla provedena i se vzorkem o stejné koncentraci IND obsahujícím navíc adeps solidus. Přítomnost AS očividně nijak neovlivnila výtěžnost extrakce (Tabulka 6).

**Tabulka 6. Reprodukovatelnost při kondicionaci 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

Kondicionace 20% MeOH v CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	
Čistý IND	IND
1.	74 %
2.	65 %
3.	77 %
<b>průměr</b>	<b>72 %</b>
<b>IND a AS</b>	<b>75 %</b>

Kondicionace 1 ml 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH

### Úprava podmínek pro vnitřní standard

Čistý dichlormethan nebylo možno použít jako rozpouštědlo vzorku, vzhledem ke špatné rozpustnosti DIC. Nicméně rozpustnost DIC byla již dostatečná, pokud se do dichlormethanu přidalo malé množství methanolu. Proto jsme testovali jako vhodné rozpouštědlo vzorku kondicionační činidlo (20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Vzorky byly analyzovány HPLC metodou s využitím detekce při 220 nm místo 240 nm, protože DIC má při této vlnové délce silnější odezvu, zatímco odezva IND byla prakticky stejná. Byla provedena extrakce s totožnými podmínkami jako předchozí, pouze byl přidán vnitřní standard. Pro potvrzení, že se IND při kondicionaci činidlem s 20% podílem

MeOH neuvolňuje již při promytí methanolem, byla extrakce provedena i bez promytí 1 ml MeOH, a po potvrzení tohoto předpokladu následně třikrát zopakována (Tabulka 7).

**Tabulka 7. Extrakce s použitím vnitřního standardu a vliv promytí MeOH, vztaženo ke standardu**

	IND/DIC	% IND/DIC
<b>standard</b>	2,71	
<b>extrakce s proplachem MeOH</b>	2,15	79 %
<b>extrakce bez proplachu MeOH</b>		
<b>1.</b>	2,29	85 %
<b>2.</b>	2,31	85 %
<b>3.</b>	2,05	76 %
<b>4.</b>	2,33	86 %
<b>průměr</b>	<b>2,25</b>	<b>83 %</b>

Kondicionace 1 ml 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH, analýza při 220 nm

Proplach MeOH skutečně snížil výtěžnost extrakce. Extrakce bez proplachu MeOH byla zopakována se vzorkem s dvojnásobnou koncentrací látek: 50 µg/ml IND a 20 µg/ml DIC, s modelovým čípkem (IND, AS, DIC) a s průmyslově vyrobeným čípkem, ke kterému byl přidán DIC jako vnitřní standard. Extrakce s čípkem byla třikrát zopakována (Tabulka 8).

**Tabulka 8. Extrakce bez proplachu MeOH a s vnitřním standardem pro čistý IND, modelový čípek a průmyslový čípek, vztaženo ke standardu**

	IND/DIC	% IND/DIC
<b>st</b>	2,48	
<b>IND</b>	2,13	86 %
<b>model. čípek</b>	2,53	102 %
<b>prům. čípek</b>		
<b>1.</b>	1,81	73 %
<b>2.</b>	1,83	74 %
<b>3.</b>	1,72	69 %
<b>4.</b>	1,78	72 %
<b>průměr</b>	<b>1,78</b>	<b>72 %</b>

Kondicionace 1 ml 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH, analýza při 220 nm

Podle výsledků lze usuzovat, že IND stále buď zůstává v kolonce, nebo se dostatečně neadsorbuje či se vymývá. Zvláště u průmyslově vyrobeného čípku je výtěžnost nižší. Nejpravděpodobnější je, že adsorpce na oxid zirkoničitý je stále příliš silná. Byla tedy provedena extrakce se stejnými podmínkami jako předchozí, ale byl zvýšen objem elučního činidla. Eluce se provedla postupně 1, 2 a 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, celkem tedy 6 ml na jedné kolonce. Jako vzorky byly použity jednak čistý IND s DIC, jednak modelový čípek s DIC. Odebrané frakce byly ihned neutralizovány (postupně 14,3 μl, 28,6 μl a 42,9 μl kyseliny octové), doplněny v 5ml odměrné baňce 70% MeOH a podrobeny analýze. Obě extrakce byly provedeny celkem třikrát.

**Tabulka 9. Vliv množství elučního činidla, vztaženo ke standardu**

IND a DIC	IND	IND/DIC	% IND/DIC	Model. čípek	IND	IND/DIC	% IND/DIC
1 ml	71 %			1ml	67 %		
2 ml	6 %			2ml	17 %		
3 ml	1 %			3ml	2 %		
<b>suma</b>	<b>78 %</b>	<b>2,57</b>	<b>102 %</b>	<b>suma</b>	<b>85 %</b>	<b>2,41</b>	<b>95 %</b>
1 ml	73 %			1ml	69 %		
2 ml	7 %			2ml	16 %		
3 ml	2 %			3ml	5 %		
<b>suma</b>	<b>82 %</b>	<b>2,36</b>	<b>93 %</b>	<b>suma</b>	<b>90 %</b>	<b>2,53</b>	<b>100 %</b>
1 ml	71 %			1ml	81 %		
2 ml	8 %			2ml	19 %		
3 ml	2 %			3ml	6 %		
<b>suma</b>	<b>81 %</b>	<b>2,40</b>	<b>95 %</b>	<b>suma</b>	<b>106 %</b>	<b>2,36</b>	<b>93 %</b>
<b>průměr</b>	<b>81 %</b>	<b>2,44</b>	<b>97 %</b>	<b>průměr</b>	<b>94 %</b>	<b>2,43</b>	<b>96 %</b>
<b>standard</b>		<b>2,53</b>					

Kondicionace 1 ml 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 μl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH, analýza při 220 nm

Z Tabulka 9 lze usoudit, že IND zůstává navázaný na sorbentu a je potřeba větší objem elučního činidla k jeho uvolnění. Vzorek s AS, tedy modelový čípek, překvapivě vykazuje vyšší výtěžnost.

Byla vyzkoušena změna kondicionačního činidla: místo 20% methanolu v dichlormethanu byl použit 20% methanol v chloroformu a obě činidla byla porovnána. Vzorek byl rozpuštěn v příslušném činidle. K promytí bylo použito 5 ml příslušného

činidla, tzn. dichlormethanu či chloroformu, poté 1 ml vody. Eluce byla provedena 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, eluát byl okamžitě zneutralizován 42,9 µl kyseliny octové a v 5ml odměrné baňce doplněn po rysku 70% MeOH. Poté byl analyzován při 220 nm.

Výtěžnost samotného IND byla v obou případech téměř 82 %, avšak extrakce vnitřního standardu byla příliš nízká. Methanol byl nahrazen acetonitrilem v dichlormethanu. Extrakce byla provedena celkem třikrát, standard i každý vzorek byly třikrát změřeny (Tabulka 10).

**Tabulka 10. Kondicionace 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, vztaženo ke standardu**

<b>Kondicionace 20% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>					
<b>měření</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>průměr</b>	<b>Směrodatná odchylna</b>
<b>standard</b>					
IND/DIC	2,49	2,65	2,60	<b>2,58</b>	0,0804
<b>vzorek 1</b>					
IND/DIC	2,53	2,50	1,89	<b>2,31</b>	0,3610
% IND/DIC	98 %	97 %	73 %	<b>89 %</b>	
IND	103 %	98 %	97 %	<b>100 %</b>	
<b>vzorek 2</b>					
IND/DIC	2,27	2,43	2,47	<b>2,39</b>	0,1072
% IND/DIC	88 %	94 %	96 %	<b>93 %</b>	
IND	97 %	98 %	96 %	<b>97 %</b>	
<b>vzorek 3</b>					
IND/DIC	2,42	2,41	2,45	<b>2,43</b>	0,0206
% IND/DIC	94 %	94 %	95 %	<b>94 %</b>	
IND	98 %	91 %	97 %	<b>95 %</b>	

Kondicionace 1 ml 20% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH, analýza při 220 nm

I přes lehké kolísání výsledků je jasné, že se výtěžnost zvýšila. Extrakce byla zopakována se vzorkem o koncentraci 100 µg/ml IND a 40 µg/ml DIC ve 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, jednou při kondicionaci týž činidlem, třikrát při kondicionaci 20% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Po neutralizaci byly vzorky doplněny v 5ml odměrné baňce vodou a měřeny jedenkrát při nástřiku 10 µl a třikrát při nástřiku 20 µl, viz Tabulka 11.



Tabulka 11. Kondicionace 20% MeOH či ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> při nástřiku 20 µl, vztaženo ke standardu

		IND/DIC nástřik 10 µl					
vzorek	1.	2.	3.	průměr	% IND	směrodatná odchylka	relativní odchylka
	3,02	2,88	3,06	<b>2,99</b>	94 %	0,0908	3,0404
<b>standard</b>				<b>3,16</b>			
		IND/DIC nástřik 20 µl					
vzorek	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	%	směrodatná odchylka	relativní odchylka
<b>1.</b>	2,93	2,82	2,74	<b>2,83</b>	91 %	0,0966	3,4117
<b>2.</b>	2,95	2,88	2,93	<b>2,92</b>	94 %	0,0353	1,2097
<b>3.</b>	2,88	2,82	2,82	<b>2,84</b>	92 %	0,0357	1,2579
<b>průměr</b>				<b>2,87</b>	<b>92 %</b>	<b>0,0559</b>	<b>1,9597</b>
<b>standard</b>				<b>3,10</b>			

Kondic. 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 10 a 20 µl, analýza při 220 nm

Extrakce za těchto podmínek a následná úprava vzorku se osvědčily, ustálila se vysoká výtěžnost i poměr analytu a vnitřního standardu.

Pro konečnou optimalizaci kondicionačních podmínek byly provedeny extrakce s kondicionací a zároveň proplachem 5%, 10% a 20% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a dále s kondicionací 20% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a proplachem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Všechny vzorky byly měřeny třikrát při nástřiku 20 µl.

Tabulka 12. Vliv podílu acetonitrilu při kondicionaci, vztaženo ke standardu

Kondicionace a proplach různými koncentracemi ACN v CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>					
	IND/DIC				IND
	1.	2.	3.	průměr	
<b>5 %</b>	2,86	2,84	2,82	<b>2,84</b>	<b>92 %</b>
<b>10 %</b>	2,92	2,94	3,01	<b>2,95</b>	<b>95 %</b>
<b>20 %</b>	2,48	2,45	2,45	<b>2,46</b>	<b>79 %</b>
<b>proplach CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a MeOH</b>	2,79	2,75	2,79	<b>2,78</b>	<b>90 %</b>
<b>standard</b>				<b>3,10</b>	

Kondic. 5%, 10% nebo 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 5%, 10% nebo 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nebo čistým CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody, a případně 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20 µl, analýza při 220 nm

Jako nejvhodnější kondicionační a zároveň promývací činidlo se prokázal 10% acetonitril v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Tabulka 12). 5% acetonitril v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se projevil jako nevhodný, nejspíše kvůli příliš silnému navázání IND na sorbent. Opět se ukázalo, že promývání methanolem výtěžnost snižuje. Zajímavé je, že v případě kondicionace 10% či 20% acetonitrilem v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  dochází ke stoprocentní výtěžnosti DIC, zatímco výtěžnost IND se liší – proto extrakce za použití 20% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  vykazuje nižší výsledek než při předchozích extrakcích.

Pro ověření opakovatelnosti byla extrakce s kondicionací 10% acetonitrilem v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pětikrát zopakována, každý vzorek byl měřen třikrát při nástřiku 20  $\mu\text{l}$  (Tabulka 13).

**Tabulka 13. Opakovatelnost při kondicionaci 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , vztaženo ke standardu**

vorek	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	IND
1.	2,40	2,45	2,45	<b>2,43</b>	<b>87 %</b>
2.	2,50	2,45	2,39	<b>2,44</b>	<b>87 %</b>
3.	2,13	2,14	2,13	<b>2,13</b>	<b>76 %</b>
4.	2,16	2,15	2,24	<b>2,18</b>	<b>78 %</b>
5.	2,20	2,18	2,17	<b>2,18</b>	<b>78 %</b>
<b>průměr</b>				<b>2,28</b>	<b>81 %</b>
<b>standard</b>				<b>2,80</b>	

Kondic. 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M  $\text{NH}_3$  v MeOH, neutralizace 42,9  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$ , doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20  $\mu\text{l}$ , analýza při 220 nm

Výtěžnost první dvou extrakcí se nápadně liší od výtěžnosti dalších tří. Po extrakci bylo zjištěno, že na 3., 4. a 5. extrakci byly použity extrakční kolonky s podruhé regenerovaným sorbentem, což vysvětluje náhlý posun ve výtěžnosti. Lze však říci, že extrakce na tomtéž sorbentu vykazují stálou výši výtěžnosti.

Regenerace očividně ovlivňuje vlastnosti sorbentu, proto byly zopakovány extrakce s kondicionací a zároveň proplachem 5%, 10% a 20% acetonitrilem v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  na regenerovaném sorbentu (Tabulka 14).

**Tabulka 14 Vliv podílu acetonitrilu při kondicionaci regenerovaného sorbentu, vztaženo ke standardu**

<b>Kondicionace a proplach různými koncentracemi ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>					
	<b>IND/DIC</b>				
<b>kondicionace</b>	<b>1. měření</b>	<b>2. měření</b>	<b>3. měření</b>	<b>průměr</b>	<b>IND</b>
<b>5 %</b>	2,44	2,38	2,40	<b>2,41</b>	<b>88 %</b>
<b>10 %</b>	2,66	2,62	2,63	<b>2,64</b>	<b>96 %</b>
<b>20 %</b>	2,46	2,47	2,48	<b>2,47</b>	<b>90 %</b>
<b>standard</b>				<b>2,75</b>	

Kondic. 5%, 10% a 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 10% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřík 20 µl, analýza při 220 nm.

Nejvhodnějším kondicionačním činidlem zůstal 10% acetonitril v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a to s prakticky stejnou výtěžností jako před regenerací. Stojí za to podotknout, že podmínky extrakce se opět ukázaly jako výhodnější pro DIC než pro IND. Znovu byl vyzkoušen i vliv proplachu methanolem při kondicionaci činidlem s nejlepšími výsledky – 10% acetonitrilem v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Výtěžnost extrakce bez proplachu byla 83 %, s proplachem 75 %, znovu se tedy potvrdilo, že proplach methanolem výtěžnost snižuje.

### **Kondicionace nového sorbentu**

Byla možnost porovnat regenerovaný sorbent s novým, nepoužitým sorbentem. Byla porovnána výtěžnost extrakce nového a starého, regenerovaného sorbentu při kondicionaci 10% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dále byla vyzkoušena kondicionace nového sorbentu 5%, 20% a 30% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Objem neutralizačního činidla byl zvýšen na 100 µl kyseliny octové. Koncentrace vzorků byla 100 µg/ml IND a 40 µg/ml DIC, viz Tabulka 15.

**Tabulka 15. Srovnání nového a regenerovaného sorbentu a různé podmínky kondicionace nového sorbentu, vztaženo ke standardu**

	IND/DIC	% poměr
<b>regen. sorbent, kondicionace 10% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	2,69	95 %
<b>nový sorbent</b>		
<b>kondicionace ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o koncentraci:</b>		
5 %	2,04	72 %
10 %	2,19	77 %
20 %	2,28	80 %
30 %	2,19	80 %

Kondic. ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o dané konc., 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o dané konc. a 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 100 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20 µl, analýza při 220 nm.

Výtěžnost extrakce na novém sorbentu oproti regenerovanému značně poklesla. Jako nejlepší kondicionační činidlo se ukázal 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, další zvyšování jeho podílu již nevedlo ke zvýšení výtěžnosti. Na novém sorbentu byla ještě provedena kondicionace 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dále kondicionace 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a proplach 1 ml MeOH:ACN 1:1 a nakonec bylo při též kondicionaci vyzkoušeno zvýšení síly elučního činidla na 0,5M NH<sub>3</sub> v MeOH jak ukazuje Tabulka 16.

**Tabulka 16. Nový sorbent při kondicionaci 20% MeOH a 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> při proplachu ACN:MeOH 1:1 a při eluci 0,5M NH<sub>3</sub> v MeOH, vztaženo ke standardu**

Nový sorbent	IND/DIC	% poměr
<b>kondicionace 20% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	2,08	76 %
<b>kondicionace 20%ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, proplach MeOH:ACN 1:1</b>	2,08	81 %
<b>kondicionace 20%ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, eluce 0,5M NH<sub>3</sub> v MeOH</b>	2,18	85 %

Kondic. 20% MeOH nebo ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 20% MeOH nebo ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 1 ml vody, popř. 1 ml ACN:MeOH 1:1, eluce 3 ml 0,25M, popř. 0,5M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 100 µl CH<sub>3</sub>COOH, v případě 0,5M NH<sub>3</sub> 200 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20 µl, analýza při 220 nm.

Kondicionace MeOH se neosvědčila, zatímco 1 ml MeOH:ACN v poměru 1:1 se ukázal jako vhodný pro proplach. Zvýšení objemu elučního činidla lehce zvýšilo i výtěžnost, přesto nedosahuje výtěžnosti sorbentu po regeneraci. Nový sorbent byl tedy zregenerován a podroben srovnání se starým regenerovaným sorbentem při kondicionaci 10% a 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Výtěžnost nového sorbentu po regeneraci se téměř nelišila – v obou případech dosáhla při kondicionaci 10% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

87 %, v případě 20% ACN 85 %. Extrakci při kondicionaci 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na novém neregenerovaném sorbentu byla provedena s modelovým čípkem, kde koncentrace vzorku byla 100 µg/ml IND a 40 µg/ml DIC a obsahoval i AS.

**Tabulka 17. Opakovatelnost extrakce modelového čípku na novém sorbentu, vztaženo ke standardu**

vzorek	IND/DIC	% poměr	Směrodatná odchylka	Relativní odchylka
1.	2,16	85 %		
2.	2,10	82 %		
3.	2,09	82 %		
4.	2,15	85 %		
5.	2,13	84 %		
<b>průměr</b>		<b>84 %</b>	<b>1,2637</b>	<b>1,5132</b>

Kondic. 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 20% ACN v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 1 ml ACN:MeOH 1:1, 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 100 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20 µl, analýza při 220 nm.

U modelového čípku byla prokázána opakovatelnost, viz Tabulka 17. Při provedení extrakce za stejných podmínek, avšak bez neutralizace se výtěžnost snížila na 79 %.

### **Rozklad indometacinu v elučním činidle**

Po vyhodnocení výsledků prvních pokusů vznikly obavy, zda nedochází před vysušením k rozkladu indometacinu, protože výtěžnost byla nízká a objevily se píky nepatřící IND. Proto byl proveden pokus stálosti IND v amoniaku o různé koncentraci v závislosti na čase, konkrétně v koncentracích 1M NH<sub>3</sub> v MeOH a 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH.

5 mg IND bylo rozpuštěno příslušným činidlem (1M NH<sub>3</sub> nebo 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH) v 10ml baňce a bylo doplněno po rysku. 100 µl tohoto roztoku bylo okamžitě odebráno a odpařeno pomocí dusíku, poté rozpuštěno v 1 ml 70% MeOH a analyzováno. V intervalu 15 min bylo odebíráno analogicky vždy dalších 100 µl, upraveno a měřeno při vlnové délce 240 nm. Byl sledován obsah IND a rozkladného produktu.

**Tabulka 18. Rozklad IND v amoniaku v MeOH o různé koncentraci, koncentrace IND 50 µg/ml, vztaženo k analytu v čase 0 min**

čas	1M NH <sub>3</sub> v MeOH		0,25M NH <sub>3</sub> v MeOH	
	Rozkl. produkt	IND	Rozkl. produkt	IND
0 min	4 %	100 %	0 %	100 %
15 min	9 %	105 %	2 %	96 %
30 min	13 %	87 %	3 %	89 %
45 min	19 %	86 %	4 %	84 %
60 min	27 %	76 %	6 %	84 %
75 min	28 %	67 %		

Jak je z Tabulka 18 patrné, v čase dochází k rozkladu IND v roztoku. Při nižší koncentraci elučního činidla nedochází k tak rychlé degradaci IND. Amoniak je však pro svou sílu jako Lewisova báze klíčovým činidlem pro eluci analytu. Rozklad může být podmíněn prostředím methanolu, proto byla prověřena závislost rozkladu IND na čase v prostředí amoniaku v acetonu. Byl použit 1M roztok NH<sub>3</sub> v acetonu, viz Tabulka 19.

Roztok vzorku byl připraven odpipetováním 250 µl zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml do 5ml odměrné baňky a doplněním po rysku. 0,5 ml tohoto roztoku bylo ihned odebráno a odpařeno pomocí dusíku, poté rozpuštěno v 0,5 ml 70% MeOH a analyzováno při vlnové délce 240 nm.

**Tabulka 19. Rozklad IND v amoniaku v acetonu, koncentrace IND ve vzorku a ve standardu 50 µg/ml, vztaženo k analytu v čase 0 min**

čas	1M NH <sub>3</sub> v acetonu	
	Rozkl. produkt	IND
0 min	0 %	100 %
10 min	1 %	101 %
20 min	1 %	99 %
30 min	1 %	97 %
40 min	1 %	99 %
50 min	1 %	101 %

Z výsledků lze vyvodit, že rozklad IND probíhá v prostředí acetonu zásadně méně než v methanolu. Pro zjištění závislosti výtěžnosti metody na koncentraci amoniaku byla provedena extrakce s roztoky IND v 0,75M, 0,5M a 0,25M NH<sub>3</sub> v acetonu (Tabulka 20).

Roztoky o koncentraci IND 2,5 µg/ml byly připraveny napipetováním 250 µl roztoku IND o koncentraci 50 µg/ml do 5ml odměrné baňky a doplněny acetonem po rysku. 0,5 ml příslušného roztoku bylo ihned odebráno a odpařeno pomocí dusíku, poté rozpuštěno v 0,5 ml 70% MeOH a analyzováno při vlnové délce 240 nm.

**Tabulka 20. Rozklad IND v amoniaku v acetonu o různé koncentraci, koncentrace IND 2,5 µg/ml**

čas	0,75M NH <sub>3</sub> v acetonu	0,5M NH <sub>3</sub> v acetonu	0,25M NH <sub>3</sub> v acetonu
0 min	100 %	100 %	100 %
10 min	96 %	114 %	103 %
20 min	101 %	115 %	92 %
30 min	82 %	109 %	110 %
40 min	83 %	124 %	106 %
50 min	87 %	111 %	104 %

Výsledky rozkladu značně oscilují, zvláště u koncentrace 0,25 M se v případě 10. a 20. minuty jedná o chybu. Lze však říci, že rozklad IND v prostředí amoniaku v acetonu je nižší než v amoniaku v methanolu. S nižší koncentrací amoniaku rozklad opět klesá. Snižováním koncentrace pod 0,5M roztok již nebylo dosaženo výraznějšího zlepšení, při dalším snížení koncentrace by naopak mohlo hrozit, že činidlo nebude mít dostatečnou eluční sílu.

#### **Snížení objemu elučního činidla a neutralizace eluátu**

Rozklad IND v eluátu je závislý na čase. Lze tedy snížit objem elučního činidla a tím i čas, po který je IND v kontaktu se elučním činidlem (eluze, odpařování). Zároveň však může docházet k nedostatečné desorpci IND ze sorbentu způsobené právě nedostatečným množstvím elučního činidla. Další možností, jak zabránit rozkladu IND, je amoniak obsažený v eluátu ihned po extrakci neutralizovat.

Nejdříve bylo sledováno, jak závisí eluce IND na objemu elučního činidla. Kondicionace byla provedena 1 ml 5% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pak bylo nanášeno 0,5 ml roztoku IND a DIC v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o koncentraci 25 µg/ml, kolonka byla promyta 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody, 1 ml MeOH a eluce byla provedena 3 ml 0,25M nebo 1M NH<sub>3</sub> v MeOH. Eluát byl sbírán po 0,5 ml, daná frakce byla odpařena pomocí dusíku, rozpuštěna v 1 ml 70% MeOH a analyzována při vlnové délce 240 nm. Standard byl připraven odpařením 0,5 ml vzorku pomocí dusíku a rozpuštěním v 0,5 ml 70% MeOH.

**Tabulka 21. Eluce po 0,5 ml elučního činidla, vztaženo ke standardu**

ml	0,25M NH <sub>3</sub> v MeOH		1M NH <sub>3</sub> v MeOH	
	IND	DIC	IND	DIC
0,5	53 %	55 %	63 %	66 %
1	32 %	23 %	30 %	21 %
1,5	8 %	3 %	3 %	1 %
2	2 %	1 %	2 %	1 %
2,5	1 %	0 %	1 %	0 %
3	1 %	0 %	0 %	1 %
<b>suma</b>	<b>97 %</b>	<b>83 %</b>	<b>99 %</b>	<b>90 %</b>

Z Tabulka 21 je jasné, že většina analytu je eluována prvním 1,5 ml činidla. Extrakce byla zopakována s tím rozdílem, že objem elučního činidla činil pouze 1,5 ml. Jako eluční činidlo byl použit 0,1M a 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH. Následně byla provedena eluce pomocí 0,1M NH<sub>3</sub> v MeOH, kdy byly jednotlivé frakce eluátu ihned neutralizovány 0,5 ml 0,1M HCl.

**Tabulka 22. Eluce po 0,5 ml elučního činidla a po neutralizaci**

ml	0,25M NH <sub>3</sub> v MeOH		0,1M NH <sub>3</sub> v MeOH		0,1M NH <sub>3</sub> v MeOH po neutralizaci	
	IND	DIC	IND	DIC	IND	DIC
0,5	52 %	64 %	2 %	2 %	19 %	13 %
1	19 %	18 %	1 %	0 %	9 %	4 %
1,5	8 %	6 %	0 %	0 %	5 %	2 %
<b>suma</b>	<b>79 %</b>	<b>88 %</b>	<b>4 %</b>	<b>2 %</b>	<b>33 %</b>	<b>19 %</b>

0,1M NH<sub>3</sub> v MeOH se ukázal jako příliš slabé eluční činidlo (Tabulka 22). Neutralizace analytu ihned po extrakci přinesla znatelně vyšší výtěžnost. Extrakce byla zopakována s použitím rovnou 2 ml elučního činidla najednou (Tabulka 23).

**Tabulka 23. Eluce 2 ml elučního činidla bez a s neutralizací**

	0,25M NH <sub>3</sub> v MeOH	0,1M NH <sub>3</sub> v MeOH	0,1M NH <sub>3</sub> v MeOH po neutralizaci
<b>DIC</b>	93 %	26 %	74 %
<b>IND</b>	85 %	45 %	72 %

Výtěžnost se zvedla, nejspíš díky 0,5 ml elučního činidla navíc. Výhodnější je eluát neutralizovat než snižovat objem elučního činidla. Jako nejvhodnější eluční činidlo byl zvolen 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH s následnou neutralizací ihned po eluci.



## Vliv čípkoviny na extrakci

Bylo potřeba zaručit, že balastní látky, v tomto případě čípkovina, neovlivňují proces extrakce. Místo čípkoviny byl v modelovém čípku použit *adeps solidus* (AS).

Nejprve byl porovnán standard IND o koncentraci 50 µg/ml, který nebyl extrahován, se vzorkem čistého IND, který byl extrahován pomocí ZrO<sub>2</sub>, a modelový čípek. Extrakce byly provedeny v obou případech třikrát. Úprava eluátu byla uzpůsobena tak, aby byla možná eluce 3 ml elučního činidla, tzn. rozkladu IND bylo zabráněno neutralizací. Eluát byl následně zředěn, aby jej bylo možné rovnou analyzovat. Extrakce byly provedeny na regenerovaném sorbentu. Kondicionace byla provedena 1 ml 5% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bylo nanášeno 0,5 ml vzorku, kolonka byla promyta 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody, 1 ml MeOH a eluce byla provedena 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH. Eluát byl okamžitě zneutralizován 42,9 µl kyseliny octové a v 5ml odměrné baňce doplněn po rysku 70% MeOH. Poté byl analyzován při 240 nm. Standard byl připraven napipetováním 0,5 ml roztoku IND o koncentraci 50 µg/ml do 5ml odměrné baňky a doplněn po rysku 70% MeOH.

**Tabulka 24. Extrahovaného vzorku bez čípkoviny a vzorku s čípkovinou, vztaženo ke standardu**

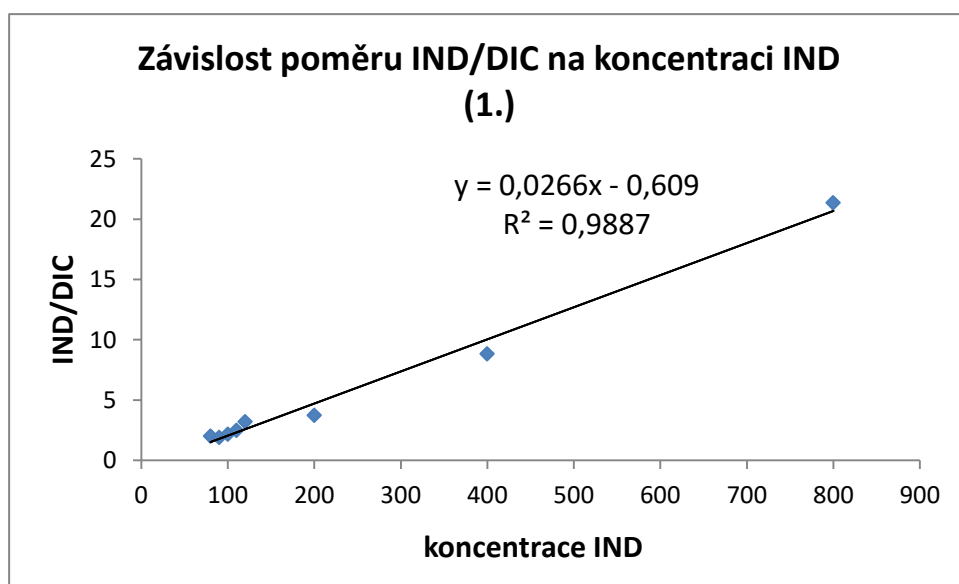
extrakce	IND	IND + AS
1.	63 %	48 %
2.	56 %	56 %
3.	56 %	53 %
<b>průměr</b>	<b>58 %</b>	<b>52 %</b>

Kondicionace 1 ml 5% MeOH v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5 ml vzorku, promytí 5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 ml vody a 1 ml MeOH, eluce 3 ml 0,25M NH<sub>3</sub> v MeOH, neutralizace 42,9 µl CH<sub>3</sub>COOH, doplnění do 5 ml 70% MeOH

Extrakce samotného IND měla vyšší výtěžnost (Tabulka 24). To by mohlo znamenat, že přítomnost AS ovlivňuje extrakci. Extrakce byla zopakována s různými koncentracemi AS, aby bylo zjištěno, zda je výtěžnost závislá na množství čípkoviny. K přípravě roztoku bylo použito 180, 95 a 45 mg AS. Dané množství AS a 250 µl zásobního roztoku IND o koncentraci 1 mg/ml bylo v 5ml odměrné baňce doplněno po rysku. Při použití 180, 95 a 45 mg AS byla výtěžnost extrakcí 56 %, 54 % a 55 %, množství čípkoviny tedy výtěžnost neovlivňuje.

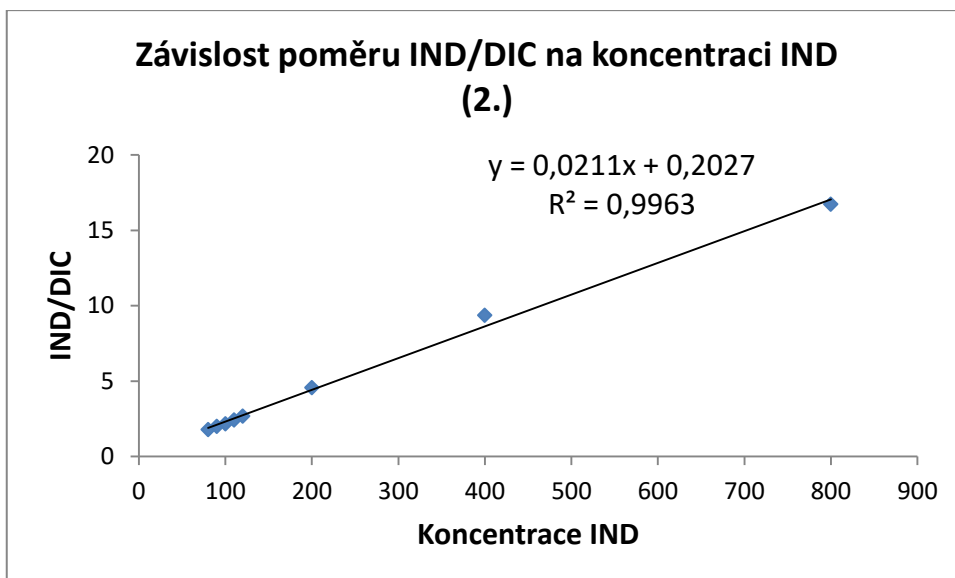
## Linearita

K ověření linearity a kapacity použitého  $ZrO_2$  při extrakcích (100 mg) byla provedena série měření při zvyšující se koncentraci IND a sestavena absorpční křivka. Použité koncentrace IND byly 80, 90, 100, 110, 200, 400 a 800  $\mu\text{g/ml}$  IND a 80  $\mu\text{g/ml}$  DIC. Vzorky byly připraveny napipetováním 160, 180, 200, 220, 240, 400, 800 nebo 1600  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku IND o koncentraci 5  $\text{mg/ml}$  a 80  $\mu\text{l}$  roztoku DIC o koncentraci 5  $\text{mg/ml}$  do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku 20% MeOH v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Kondicionace byla provedena 1 ml 10% acetonitrilem v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , bylo nanášeno 0,5 ml vzorku, kolonka se promyla 5 ml 10% acetonitrilu v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 1 ml vody, eluce byla provedena 3 ml 0,5M  $\text{NH}_3$  v MeOH. Eluát byl ihned neutralizován 42,9  $\mu\text{l}$  kyseliny octové, doplněn v 5ml odměrné baňce po rysku vodou a analyzován při nástřiku 20  $\mu\text{l}$  a vlnové délce 220 nm. Extrakce byly provedeny dvakrát. Graf 1 a Graf 2 zobrazují závislost poměru ploch IND/DIC na koncentraci IND. Vzorky s koncentrací 400  $\mu\text{g/ml}$  IND se ve všech případech poměrně odchýlily, což mělo vliv na koeficient determinace. Celkově lze říci, že ani koncentrace 800  $\mu\text{g/ml}$  IND a 80  $\mu\text{g/ml}$  DIC nepřekračuje kapacitu daného množství sorbentu.



**Graf 1. Závislost poměru IND/DIC na koncentraci IND ve vzorku, 1. extrakce**

Kondic. 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M  $\text{NH}_3$  v MeOH, neutralizace 42,9  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$ , doplnění vodou do 5ml baňky, nástřik 20  $\mu\text{l}$ , analýza při 220 nm.



**Graf 2. Závislost poměru IND/DIC na koncentraci IND ve vzorku, 2. extrakce**

Kondic. 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0,5 ml vzorku, proplach 5 ml 10% ACN v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 1 ml vody, eluce 3 ml 0,25M  $\text{NH}_3$  v MeOH, neutralizace 42,9  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$ , doplnění vodou do 5ml baňky, nástřík 20  $\mu\text{l}$ , analýza při 220 nm.

## **Závěr**

Z dosažených výsledků je patrné, že oxid zirkoničitý lze využít jako sorbent k extrakci indometacinu (IND) jakožto Lewisovy baze z čípku pomocí SPE. Nicméně oproti předchozí studii, kdy byla studována extrakce ibuprofenu z čípku, je jeho extrakce náročnější. Experimentální podmínky na rozdíl od ibuprofenu velmi ovlivňují výsledek extrakce.

Jednak nelze použít 1M roztok amoniaku v methanolu jako eluční činidlo, protože docházelo k rozkladu IND. Proto byly testovány nižší koncentrace amoniaku (0,5, 0,25 a 0,1 M). Eluční síla 0,1M roztoku byla příliš nízká, u vyšších koncentrací stále probíhal rozklad. Částečně se osvědčilo nahradit MeOH acetonem. Při snaze snížit objem elučního činidla bylo též zjištěno, že většina IND se uvolňuje již 1,5 ml činidla. Problém nestability IND byl nakonec vyřešen neutralizací eluátu kyselinou octovou ihned po extrakci. Jako nejvhodnější eluční činidlo byl vzhledem k výše zmíněným okolnostem 0,25M NH<sub>3</sub> v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Samotný hexan, dichlormethan či chloroform se jako kondicionační činidla neosvědčily, docházelo k příliš silné retenci IND na sorbent. Nicméně při použití methanolu k dostatečné interakci mezi IND a ZrO<sub>2</sub> nedošlo. Byla vyzkoušena kondicionace dichlormethanem s obsahem 5 %, 10 %, 15 %, 20 % a 25 % methanolu. Nevyšší výtěžnost u regenerovaného sorbentu vykazovala kondicionace 20% MeOH v dichlormethanu: kolem 72 % při extrakci samotného IND, při extrakci modelového čípku 75 %. Po přidání vnitřního standardu (DIC) bylo dosaženo výtěžnosti 79 % pro samotný IND. Dále bylo zjištěno, že promývání MeOH výtěžnost snižuje. Bez tohoto promytí byla výtěžnost samotného IND 83 % a u průmyslově vyrobeného čípku 72 % s prokázanou opakovatelností. Při zvýšení objemu elučního činidla na 6 ml bylo dosaženo opakovatelné výtěžnosti 97 % u IND a u modelového čípku 96 %. Osvědčilo se i nahradit MeOH v kondicionačním činidle acetonitrilem. Byly provedeny extrakce s obsahem 5 %, 10 % a 20 % ACN v dichlormethanu. Výtěžnost se lišila podle toho, zda byl sorbent jednou či vícekrát regenerován. Nejlepší výsledky jsme získali vždy s 10% ACN (v rozmezí 80 – 96 %).

Jistý problém představoval nedostatek sorbentu a nutnost jeho regenerace – po tomto procesu se vždy pozměnily ideální podmínky kondicionace a tedy i výtěžnost byla tímto procesem ovlivněna.

Regenerace sorbentu ovlivňuje jeho vlastnosti, a sílu interakce mezi IND a oxidem zirkoničitým. Byl prověřen vliv množství čípkoviny na extrakci, výtěžnost při zvyšujícím se množství adeps solidus byla však prakticky stejná. Byla prokázána lineární závislost výtěžnosti extrakce na koncentraci IND ve vzorku. Též bylo prokázáno, že ani 400  $\mu\text{g}$  IND nepřesahuje kapacitu 100 mg sorbentu.

Závěrem je nutno konstatovat, že pro pochopení interakčního procesu mezi oxidem zirkoničitým a analytem charakteru Lewisovy baze je nutno provést další experimenty, protože v případě indometacínu se ukázal proces daleko více komplikovanější, než tomu bylo u ibuprofenu. Zejména se bude nutno zaměřit na kondicionaci, abychom dosáhli reprodukovatelných výsledků v čase.

## Zdroje

1. MITRA, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Vol. 162. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA 2003. ISBN 0-471-32845-6
2. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém materiálu, úprava vzorku. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v HK, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Ak. r. 2016/2017
3. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Europrint a.s., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
4. <https://old.vscht.cz/fch/prikladnik/prikladnik/p.10.7.html> [staženo 30. 3. 2018].
5. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. Trendy v úpravě vzorku. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v HK, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Ak. r. 2016/2017
6. *MN\_SPE\_Katalog* [on-line]. Labicom, 2016, [cit. 2018-01-17]. URL: < [https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/MN\\_SPE\\_Katalog.pdf](https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/MN_SPE_Katalog.pdf) >.
7. SIMPSON, N. J. K. (Ed.) *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. 1<sup>st</sup> Ed. CRC Press, Boca Raton 2000. ISBN 082470021X
8. *Guide to Solid Phase Extraction* [on-line]. Supelco, 1998, [cit. 2018-01-17]. URL: < <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> >.
9. *Manifold Supelco* [on-line]. Labicom, 2016, [cit. 2018-01-18]. URL: < [https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/06/Manifold\\_Supelco\\_SPE.pdf](https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/06/Manifold_Supelco_SPE.pdf) >.
10. *SPE Reference Manual & Users Guide* [on-line]. Phenomenex, Inc., 2011, [cit. 2018-01-18]. URL: < [http://tecnocroma.pt/app/uploads/2015/04/SPE-User-Guide-GU24131210\\_L.pdf](http://tecnocroma.pt/app/uploads/2015/04/SPE-User-Guide-GU24131210_L.pdf) >.
11. Nezvedová, M. Nesilikagelové materiály v analýze léčiv I. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
12. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Europrint a.s., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
13. Kresová, J. Studium možností využití alternativních sorbentů pro úpravu vzorku. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
14. Thurman, E. M.; Mills, M. S. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. 1<sup>st</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc, New York 1998. ISBN 0-471-61422-X
15. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. HPLC – stacionární fáze a separační módy. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v HK, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Ak. r. 2016/2017
16. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A.*, **2004**, *1028*, 1-30.
17. POUSTKA, J. *SPE* [on-line], [cit.2018-01-19]. Dostupné z: < <https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Eng-5%20%203A%20KR%20LSC+SPE+Disks%20JPrev-032014.pdf> >.

18. WELLS, M. J. M. Essential guides to method development in solid-phase extraction. In: Wilson, I. D.; Adlard, E. R.; Cooke, M.; Poole, C. F. (Ed.) *Encyclopedia of Separation Science*. 1<sup>st</sup> Ed., Academic Press, London 2000. ISBN 978-0-12-226770-3
19. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; ZHAO, J.; MCNEFF, C. V.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A.*, **2004**, *1028*, 31-62.
20. XU, J.; WU, P.; YE, E. -C.; YUAN, B. -F.; FENG, Y. -Q. Metal oxides in sample pretreatment. *TrAC*, **2016**, *80*, 41–56.
21. BLACKWELL, J. A.; CARR, P. W. The Role of Lewis Acid-Base Processes in Ligand-Exchange Chromatography of Benzoic Acid Derivatives on Zirconium Oxide. *Anal. Chem.*, **1992**, *64*, 853-862 .
22. BLACKWELL, J. A.; CARR, P. W. Development of an Eluotropic Series for the Chromatography of Lewis Bases on Zirconium Oxide. *Anal. Chem.*, **1992**, *64*, 863-873.
23. GRÜN, M.; KURGANOV, A. A.; SCHACHT, S.; SCHÜTH, F.; UNGER, K. K. Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1996**, *740*, 1-9.
24. *HPLC Column Product Guide* [on-line]. ZirChrom Separations, Inc., 2016, [cit. 2018-01-18].  
URL: < [https://www.bgb-info.com/files/master/ZirChrom/ZirChrom\\_Catalog.pdf](https://www.bgb-info.com/files/master/ZirChrom/ZirChrom_Catalog.pdf) >.
25. LOZANO, A. et al. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2014**, *118*, 68-83.
26. BORGES, E. M. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **2015**, *53*, 580-597.
27. FEDENKO, Y.; DONTSOVA, T.; ASTRELIN, I. Physico-chemical and sorptive properties of nanocomposites based on zirconium(IV) oxide. *Chem. Chem. Technol.*, **2014**, *8*, 51-55.
28. KANIE, Y.; TANIUCHI, M.; KANIE, O. Evaluation of reversed-phase nano liquid chromatography conditions by using reversed-phase thin layer chromatography based on Hansen solubility parameters for the analysis of amphiphilic glycosylsphingolipid transformations. *J. Chromatogr. A*, **2018**, *1534*, 123–129.
29. TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO<sub>2</sub>-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. *Food Chem.*, **2016**, *190*, 71–79.
30. KAHKHA, M. R. R.; DALIRAN, S.; OVEISI, A. R.; KAYKHAI, M.; SEPEHRI, Z. The Mesoporous Porphyrinic Zirconium Metal-Organic Framework for Pipette-Tip Solid-Phase Extraction of Mercury from Fish Samples Followed by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometric Determination. *Food Analytical Methods*, **2017**, *10*, 2175–2184.
31. HE, M. et al. Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, *973*, 1-24.

32. WINKLER, J. et al. *Titanium Dioxide – Properties and Applications In LC* [on-line], [cit.2018-01-19]. Dostupné z: <<http://www.zirchrom.com/pdf/prep1999.pdf>>.
33. <http://www.hplc.cz> [staženo 19. 1. 2018].
34. MOHAMMADI, S. Z.; HAMIDIAN, H.; KARIMZADEH, L.; MOEINADINI, Z. Tween 80 coated alumina: An alternative support for solid phase extraction of copper, nickel, cobalt and cadmium prior to flame atomic absorption spectrometric determination. *Arabian J. Chem.*, **2016**, *9*, 1290-1296.
35. KLIVICKÝ, M.; KLIMEŠ, J.; KUČERA, R. Solid-Phase Extraction of Ibuprofen from Pharmaceuticals via Ligand Exchange Using Zirconium Dioxide. *Curr. Anal. Chem.*, **2016**, *12*, 523-528.
36. NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; HAVLÍKOVÁ, L.; SOLICH, P. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, *37*, 899-905.
37. ABDEL-HAMID, M. E.; NOVOTNY, L.; HAMZA, H. Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, *24*, 587-594.
38. NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; HAVLÍKOVÁ, L.; SOLICH, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography for evaluating the distribution of pharmaceutical substances in suppository base – phosphate buffer system. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, *23*, 955-964.
39. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. *The United States Pharmacopeia 2016 National Formulary, Vol. 2*. 34<sup>th</sup> Ed. United Book Press, Inc., Baltimore 2015. ISBN 978-1-936424-44-3