UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

EXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ V ANALÝZE VYBRANÝCH SYNTETICKÝCH INHIBITORŮ FOSFODIESTERÁZY PDE-5 METODOU HPLC/MS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Lucie Kepová
Studijní obor:	Chemie
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2013

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou vzorků s rostlinnou matricí extrakcí na pevné fázi a následnou separací a detekcí syntetických inhibitorů fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5) spojenými technikami vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Tato problematika je vysoce aktuální v souvislosti s dostupností importovaných rostlinných doplňků stravy určených k léčbě erektilní dysfunkce, které obsahují nedeklarovaný přídavek farmaceutických substancí inhibujících PDE-5 (sildenafil, vardenafil nebo jiné strukturně příbuzné látky s podobnou aktivitou). Cílem práce bylo navrhnout rychlou metodu separace a detekce vybraných inhibitorů PDE-5 a na základě ukazatelů účinnosti analytických metod (limit detekce, návratnost) posoudit vhodnost různých komerčních sorbentů použitelných pro extrakci zmíněných analytů z rostlinných matric.

Teoretická část je rozčleněna do dvou hlavních kapitol, z nichž první podává přehled a stručný popis metod přípravy rostlinných vzorků nejčastěji užívaných ve spojení s chromatografickou a hmotnostně spektrometrickou analýzou. Druhá z kapitol uvádí bližší informace o nejčastěji se vyskytujících syntetických inhibitorech PDE-5, jejich nelegálním přidávání do rostlinných doplňků stravy a o dostupných metodách přípravy a analýzy takových vzorků.

Experimentální část popisuje metodu pro analýzu inhibitorů PDE-5 technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí včetně nalezení vhodných podmínek pro elektrosprejovou ionizaci analytů. Dále jsou uvedeny postupy extrakce pevnou fází s použitím různých typů sorbentů aplikované na modelové vzorky obsahující standardy analytů v rostlinné matrici. Pro různé sorbenty byl vyhodnocen dosažitelný limit detekce, jehož úroveň může obecně souviset s vlivem zbytkových složek matrice přítomných v extraktu na proces ionizace. Experimentální část je zakončena studií návratnosti extrakce na sorbentu, který se na základě předchozích experimentů jevil pro daný účel jako nejvhodnější.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne ……

……

Vlastnoruční podpis

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedení při řešení této problematiky, cenné rady, trpělivost, připomínky a čas, které mi během psaní bakalářské práce poskytl.

Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD 1

2. TEORETICKÁ ČÁST 2

2.1 PŘÍPRAVA VZORKU S ROSTLINNOU MATRICÍ PRO LC/MS ANALÝZU 2

2.1.1 SOXHLETOVA EXTRAKCE 3

2.1.2 ULTRAZVUKOVÁ EXTRAKCE 3

2.1.3 EXTRAKCE KAPALINA-KAPALINA 4

2.1.4 EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI 4

2.1.4.1 Reverzní fáze 5

2.1.4.2 Normální fáze 7

2.1.4.3 Iontově výměnná fáze 9

2.1.4.4 Fáze se smíšeným mechanismem retence 10

2.1.5 MIKROEXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI 11

2.1.6 EXTRAKCE NADKRITICKOU TEKUTINOU 12

2.1.7 ZRYCHLENÁ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM 13

2.1.8 MIKROVLNNÁ EXTRAKCE 14

2.1.9 QuEChERS EXTRAKCE 15

2.2 ANALÝZA VZORKŮ S ROSTLINNOU MATRICÍ S PŘÍSADOU SYNTETICKÝCH INHIBITORŮ PDE-5 17

2.2.1 PDE-5 INHIBITORY 17

2.2.2 BYLINNÉ DOPLŇKY STRAVY S NEDEKLAROVANÝM PŘÍDAVKEM LÉČIV 18

2.2.3 PŘÍPRAVA VZORKU S PŘÍSADOU PDE-5 INHIBITORŮ 19

2.2.4 TECHNIKY K SEPARACI A DETEKCI PDE-5 INHIBITORŮ 20

2.2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie 20

2.2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 20

2.2.4.3 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií 21
2.2.4.4 Ultrafialová spektroskopie 21
2.2.4.5 Blízká infračervená spektroskopie 21
2.2.4.6 Ramanova spektroskopie 21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 22
3.1 CHEMIKÁLIE A LABORATORNÍ VYBAVENÍ 22
3.2 PRACOVNÍ POSTUP A METODY 22
3.3.1 Příprava standardů 22
3.3.2 Příprava rostlinné matrice pro extrakci na pevné fázi 22
3.3.3 Použité laboratorní přístoje k separaci a detekci 22
3.3.4 Optimalizace parametrů iontového zdroje 23
3.3.5 Úprava vzorku extrakcí na pevné fázi a analýza HPLC/MS 23
4. VÝSLEDKY A DISKUZE 26
5. ZÁVĚR 37
6. LITERATURA 38
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 42
SEZNAM OBRÁZKŮ 45
SEZNAM TABULEK 46

1. ÚVOD

PDE-5 inhibitory nebo také inhibitory fosfodiesterázy typu 5 představují třídu léčiv používaných k léčbě erektilní dysfunkce u mužů. Mezi tyto inhibitory se řadí sildenafil a vardenafil, které jsou obsažené v komerčně dostupných lékových formách. Legálně jsou tyto syntetické prostředky dostupné pouze na lékařský předpis. Dále existuje velká skupina jejich strukturních analogů neschválených jako léčivé přípravky pro humánní medicínu.

Tyto sloučeniny se často vyskytují nelegálně v přírodních doplňcích stravy, které jsou celosvětově rozšířené a užívané lidmi z hlediska představy, že přírodní produkty jsou bezpečné a bez vedlejších účinků. Takovéto adulterované přípravky, objevující se nespočetně na webových stránkách, pocházejí zejména z jihovýchodní Asie za účelem zisku. Běžný uživatel nemá šanci přítomnost nedeklarovaných syntetických farmaceutických substancí před požitím přípravku zjistit, následně se však kromě požadovaného efektu mohou projevit jejich negativní účinky. Nejen že jsou vyrobeny bez kontroly kvality, ale PDE-5 inhibitory mohou způsobit závažné zdravotní komplikace v kombinaci s některými léky (např. s léky k léčbě hypertenze a ischemie myokardu). U osob užívajících tyto léky může vést požití inhibitorů PDE-5 v krajním případě až k úmrtí. Požadavek kontroly podezřelých importovaných bylinných potravních doplňků s sebou přináší potřebu studovat metody přípravy vzorku a analýzy PDE-5 inhibitorů.

V experimentální části jsme se zabývali analýzou modelových vzorků bylinných přípravků s přídavkem sildenafilu a vardenafilu. Tyto látky byly zvoleny jako snadno dostupní zástupci skupiny syntetických inhibitorů PDE-5 v souvislosti s aktuálním problémem výskytu nelegálních přípravků k léčbě erektilní dysfunkce na internetu. Studována byla příprava vzorku extrakcí na pevné fázi, vliv matrice na limit detekce, na ionizaci elektrosprejem a návratnost extrakce. Analýzy extraktů byly prováděny na vysokoúčiném kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 PŘÍPRAVA VZORKU S ROSTLINNOU MATRICÍ PRO LC/MS ANALÝZU

Užívání léčivých rostlin má dlouhou historii po celém světě. Bylinné přípravky a extrakty můžeme najít v lékopisech mnoha zemí. V moderní medicíně neexistuje lék, který by působil pozitivně proti všem lidským onemocněním. Přítomnost vedlejších nežádoucích účinku je téměř nevyhnutelná, a proto v posledních letech stoupá zájem o přírodní a bylinné léky po celém světě. Na rozdíl od moderních léků, které se většinou skládají z jedné aktivní složky, obsahují bylinné extrakty více aktivních složek. Zajímavé je, že přírodní látky obsažené v těchto „bylinných koktejlech" mohou v lidském těle působit synergicky, a mohou poskytnout jedinečné léčebné vlastnosti s minimálními nebo žádnými vedlejšími nežádoucími účinky.[1]

Příprava vzorku s rostlinnou matricí je velmi důležitým a klíčovým krokem v analytickém procesu, neboť je nutné extrahovat požadované chemické složky z rostlinných materiálů pro další separaci a charakterizaci. Vhodné techniky přípravy vzorku pro extrakci, vyčištění a zakoncentrování analytů z rostlinných materiálů mohou efektivně snížit působení matrice, která má podstatný vliv na přesnost a správnost měření, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) atd.[2] Mezi tyto techniky patří Soxhletova extrakce (SE), ultrazvuková extrakce (UE), extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevnou fázi (SPME), nadkritická fluidní extrakce (SFE), zrychlená extrakce rozpouštědlem (PLE), mikrovlnná extrakce (MAE), QuEChERS metoda.[1, 2]

Před samotnou plynovou nebo kapalinovou chromatografickou analýzou je někdy nedostačující pouze jedna extrakce, ale jsou vyžadovány další čistící postupy, což je častou nevýhodou klasických a moderních extrakčních metod v přípravě vzorku složitých matric. To má často za následek neselektivní extrakci relativně velkého množství nežádoucích složek (např. lipidy, steroly, chlorofyly, atd.), které mohou u následujících GC nebo HPLC analýz vážně ovlivnit separaci a detekci. Z tohoto důvodu je potřeba podrobně studovat způsob přípravy vzorku a vyvíjet nové extrakční techniky, aby extrakce byla co nejselektivnější.[1]

2.1.1 SOXHLETOVA EXTRAKCE

Soxhletova metoda byla vyvinuta von Soxhletem v roce 1879 a je považována za standardní extrakční metodu pro extrakci cenných látek z různých rostlinných zdrojů. Její časová náročnost, pracnost a velká spotřeba organického rozpouštědla je značnou nevýhodou. Vzhledem k tomu, že je tento proces velmi pomalý a degradace cílených látek je běžná, rozmohly se extrakční techniky jako ultrazvuková extrakce a další, kde je možno uplatnit využití různých sloučenin z různých zdrojů.[3]

Ve většině případů se jako rozpouštědlo používá vodný metanol, acetonitril nebo směs hexan-aceton se složením pohybujícím se mezi 25–75 % acetonu.[3, 4]

2.1.2 ULTRAZVUKOVÁ EXTRAKCE

Tato technika je atraktivní díky své jednoduchosti, rychlosti a nízkým pořizovacím nákladům v porovnání s jinými metodami jako je SFE a MAE. Vzorek se v ultrazvukové lázni intenzivně pohybuje, a tím dochází k rozpadu shluků částic, přičemž tepelný rozklad je redukován.[3, 4] Zvýšená účinnost ultrazvukové extrakce je vysvětlována narušením buněčných stěn, snížením velikosti částic a zvýšením účinnosti přenosu hmoty buněčného obsahu při tvorbě a zániku kavitačních dutin.[3]

Působení ultrazvuku na buněčné stěny rostlin můžeme popsat dvěma způsoby:

- Ultrazvuk může usnadnit botnání a hydrataci rostlinných materiálů, což způsobuje rozšíření pórů buněčné stěny. To zvyšuje rychlost přenosu hmoty, a může dojít i k narušení buněčných stěn, což má za následek zvýšenou účinnost extrakce a nižší extrakční čas.[1]

- Některé rostlinné buňky jsou součástí žláz (vnějších nebo vnitřních) zaplněných esenciálním olejem. Vnější žlázy jsou charakterizovány velmi tenký povrchem, který může být ultrazvukem lehce rozrušen. Tím dojde k uvolnění esenciálního oleje do extrakčního rozpouštědla.[1] Esenciální oleje jsou těkavé, přírodní, komplexní směsi sloučenin charakterizovány silným aroma a jsou produkovány aromatickými rostlinami jako sekundární metabolity. Chemicky jsou esenciální oleje velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat desítky složek ve zcela odlišných koncentracích. Jsou

ale charakterizovány 2–3 hlavními složkami v poměrně vysokých koncentracích (20–70 %). Tyto složky zahrnují dvě skupiny, kde hlavní skupina se skládá z terpenů a další z aromatických a alifatických složek, které jsou charakterizovány nízkou molekulovou hmotností.[5]

Optimalizace experimentálních podmínek jako je výkon ultrazvuku, teplota a čas jsou klíčovým krokem k účinné extrakci. [3] V ultrazvukové extrakci je možné použít jako extrakční rozpouštědlo vodný roztok obsahující neiontový surfaktant. Tento roztok poskytuje rychlejší extrakční kinetiku a vyšší návratnost ve srovnání s methanolem a vodou.[1]

2.1.3 EXTRAKCE KAPALINA-KAPALINA

Extrakce kapalina-kapalina je založena na ustavení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Většinou se jedná o vodný roztok a organické rozpouštědlo, kdy analyt přechází do organického rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustný. K extrakci se používá dělící nálevka, kde nemísitelná rozpouštědla protřepáváme. Rozpouštědlo volíme tak, aby byl analyt v něm co nejvíce rozpustný (obvykle ethylacetát nebo diethyleter).[6, 7]

Kapalné vzorky jako např. vodné extrakty pevného rostlinného materiálu jsou obvykle nejdříve filtrovány a odstřeďovány, a poté je vzorek přímo vstřikován do separačního systému, nebo častěji jsou analyty nejprve izolovány pomocí LLE nebo SPE.[6]

2.1.4 EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI

SPE je nejrozšířenější technikou, především z důvodu jejího snadného použití a široké aplikovatelnosti.[3] Výhodou je, že mohou být redukovány mnohé z problémů související s extrakcí kapalina-kapalina (např. použití křehkého speciálního skla, likvidace velkého množství organických rozpouštědel atd.). SPE je navíc účinnější oproti LLE, rychlá, extrakce jsou snadno proveditelné a může být automatizována. Také extrakční čas a množství rozpouštědla jsou výrazně nižší.[9] Principem této metody je zachycení molekul látky, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na pevném sorbentu, přes který vzorek protéká.[7]

Nejčastěji se tato technika používá k přípravě kapalných vzorků obsahujících netěkavé analyty. Pokud se jedná o pevný vzorek (např. sušené rostliny), je předem extrahován do rozpouštědla. SPE produkty lze s výhodou použít pro extrakci analytů a zakoncentrování a vyčištění vzorku. Dostupné jsou v široké škále chemických složení, adsorbentů a velikostí. Velmi důležitý je také výběr nejvhodnějšího produktu pro každou aplikaci a vzorek.[9] Široká škála chemicky modifikovaných adsorpčních materiálů (silikagel nebo syntetické pryskyřice) umožňuje skupinově selektivní separaci na základě různých typů fyzikálně-chemických interakcí, jmenovitě separaci s použitím reverzní fáze, iontově výměnné fáze (katex a anex) a normální fáze.[1]

2.1.4.1 Reverzní fáze

Separace na reverzní fázi zahrnuje polární (obvykle vodné) nebo mírně polární matrice vzorku (mobilní fáze) a nepolární stacionární fáze. Analyt je obvykle středně polární až nepolární. Hydrofilní silanolové skupiny na povrchu silikagelu jsou chemicky modifikovány hydrofobními alkylovými nebo arylovými funkčními skupinami reakcí s příslušnými silany.[9]

Provedení SPE extrakce na reverzní fázi je zahájeno nanesením nejčastěji methanolu, který smáčí povrch sorbentu a proniká vázanou alkylovou fází, čímž připraví fázi k nanesení vzorku.[9] Poté následuje nanesení ekvilibračního rozpouštědla, které by mělo být podobné matrici vzorku.[10] Retence organických analytů z polárních roztoků (např. vodných) na těchto SPE materiálech je důsledkem přitažlivých sil mezi vazbami uhlík-vodík v analytu a nepolárními řetězci na povrchu sorbentu. Tyto přitažlivé síly nazýváme van der Waalsovy síly nebo také disperzní síly. K eluci adsorbované sloučeniny z reverzní fáze SPE kolonky se používá nepolární rozpouštědlo, díky kterému jsou narušeny síly, jimiž se sloučenina váže.[9]

Reverzní fáze se dělí do třech skupin podle druhu sorbentu:

- **Pokrytý silikagel**

Povrch částic silikagelu je pokryt chemicky vázanými alifatickými řetězci určité délky (sorbenty se podle délky řetězce značí např. C-4, C-8 atd.). C-4 sorbent s velkými póry a monomerně vázaným butyldimethylem je méně hydrofobní než C-8 nebo C-18 a je vhodný

pro extrakci peptidů a proteinů. Oproti tomu C-8 (oktyl obsahující 7 % C) a C-18 (oktadecyl obsahující 10 % C) jsou vhodné pro extrakci nepolárních až mírně polárních sloučenin jako jsou antibiotika, barbituráty, benzodiazepiny, kofein, léčiva, barviva, esenciální oleje, v tuku rozpustné vitamíny, fungicidy, herbicidy, pesticidy, uhlovodíky, parabeny, fenoly, steroidy, tenzidy, teofylin, a vitamíny rozpustné ve vodě.[9, 11]

Fáze s monomerně vázaným fenylovým jádrem (obsahující 5,5 % C) vykazuje poněkud nižší retenci než materiál C-8 nebo C-18. Používá se pro extrakci nepolárních až mírně polárních sloučenin, zvláště aromatických sloučenin.[9, 11]

Fáze s monomerně vázaným kyanopropylem (obsahující 7,5 % C) je vhodná pro extrakci mírně polárních sloučenin (reverzní fáze) a polárních sloučenin (normální fáze) jako jsou aflatoxiny, antibiotika, barviva, herbicidy, pesticidy, fenoly, steroidy. Pro sacharidy a kationové sloučeniny je slabým katexem.[9, 11]

Dále do této skupiny patří materiály založené na rozdílné velikosti řetězce (8, 18) vázané na sorbent polymerně. Silikagel s polymerně vázaným C-8 řetězcem má vyšší fázi pokrytí a obsah uhlíku (obsahuje 14 % C) než C-8 vázaný monomerně, větší odolnost vůči extrémnímu pH a nepatrně vyšší kapacitou pro nepolární sloučeniny. Používá se pro extrakci nepolárních až mírně polárních sloučenin (viz. C-8). Silikagel s polymerně vázaným C-18 řetězcem má vyšší fázi pokrytí a obsah uhlíku (obsahuje 17 % C) než C-18 vázaný monomerně, a taktéž větší odolnost vůči extrémnímu pH a nepatrně vyšší kapacitou pro nepolární sloučeniny. Používá se pro extrakci nepolárních až mírně polárních sloučenin (viz. C-18).[9, 11]

Hydrofobní silikagely potažené hydrofilním polymerem, kdy porézní polymerní vrstva zamezuje adsorpci velkých nežádoucích molekul na povrchu silikagelu. Póry v polymeru umožňují malým hydrofobním organickým sloučeninám, jako jsou léčiva, dosáhnout povrchu silikagelu, zatímco velké interferující sloučeniny (např. proteiny) jsou chráněny od silikagelu polymerem a jsou vymývány skrz SPE kolonku. Tento materiál se používá pro vyloučení proteinů v biologických vzorcích.[9, 11]

- **Polymerní sorbent**

Styren/divinylbenzenový kopolymer se používá pro zadržení hydrofobních sloučenin, které obsahují hydrofilní funkční skupiny, především aromáty. Např. zadržení fenolů na C-18 je obtížné vzhledem k jejich vysoké rozpustnosti ve vodě. Eluci můžeme provádět s mírně polárními až nepolárními rozpouštědly.[9, 11]

- **Grafitický uhlík**

Grafit je složen z vrstev uhlíkových atomů propojených v hexagonálním uspořádání. Grafitický sorbent je neporézní a vykazuje přitažlivé interakce s organickými polárními i nepolárními sloučeninami v polárních i nepolárních matricích. Retence analytů je založena zejména na struktuře analytu (velikosti a tvaru), spíše než na interakci funkčních skupin analytu s povrchem sorbentu. Eluce se provádí mírně polárními až nepolárními rozpouštědly.[9,11]

2.1.4.2 Normální fáze

Separace na normální fázi zahrnuje polární analyt, mírně polární až nepolární matrici (např. aceton, chlorovaná rozpouštědla a hexan), a polární stacionární fázi. Retence analytu je důsledkem interakce mezi polárními funkčními skupinami analytů a polárními skupinami na povrchu sorbentu. Tyto interakce zahrnují vodíkovou vazbu, π-π a dipól-dipólové interakce. Sloučenina adsorbována těmito mechanismy je eluována procházejícím rozpouštědlem, které narušuje vazebný mechanismus. Obvykle se jedná o rozpouštědlo, které je více polární než původní matrice vzorku.[9]

U materiálů založených na normální fázi je druhem sorbentu:

- **Silikagel**

Silikagel je extrémně hydrofilní a musí být udržován v suchu. Všechny vzorky používané s tímto materiálem musí být relativně bezvodé. Funkční skupiny podílející se na adsorpci látek z nepolárních matric jsou volné hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu. Ten se muže používat k adsorpci polárních látek z nepolárních matric s následnou elucí sloučenin v organickém rozpouštědle, které je více polární než původní vzorek matrice.

Ve většině případů je tento materiál používán k přečištění extraktů, kdy analyt prochází sorbentem a interferující sloučeniny jsou zachyceny na silikagelu.[9, 11]

Diol je monomerně vázaný 2,3-dihydroxypropoxypropyl (obsahuje 7 % C), vhodný pro extrakci polárních sloučenin.

Fáze s monomerně vázaným kyanopropylem – viz reverzní fáze.

Fáze s alifatickou aminopropylovou skupinou monomerně vázanou na povrchu silikagelu (obsahuje 5 % C). Používá se k izolaci aniontů silných a slabých kyselin, protože aminová funkční skupina na povrchu silikagelu může být neutralizována tak, aby došlo k jejich eluci. Je slabým anexem, který se používá k extrakci sacharidů, organických kyselin a dalších látek.[9, 11]

Diol, monomerně vázaný kyanopropyl a aminopropyl jsou materiály mající krátké alkylové řetězce s polárními funkčními skupinami vázanými na povrchu. Tyto silikagelové fáze jsou mnohem hydrofilnější oproti reverzní fázi, a mohou být užívány k adsorpci polárních sloučenin z nepolárních matric. Tyto sorbenty jsou používány k adsorpci a selektivní eluci sloučenin velmi podobné struktury, např. izomery, složité směsi nebo léčiva a lipidy.[9]

- **Florisil**

Florisil je křemičitan hořečnatý, který je používán obvykle pro čištění organických extraktů. Tento vysoce polární materiál silně adsorbuje polární sloučeniny z nepolárních matric.[9]

- **Alumina**

Alumina (oxid hlinitý) je používána v adsorpčních/čistících postupech. Materiály oxidu hlinitého mohou být připraveny jako kyselé (Alumina-A, pH~5), zásadité (Alumina-B, pH~8,5) nebo neutrální (Alumina-N, pH~6,5).[9]

2.1.4.3 Iontově výměnná fáze

Iontově výměnná SPE může být použita pro sloučeniny, které jsou nabité v roztoku (obvykle ve vodném, ale někdy i v organickém). Iontově výměnná fáze se dále dělí na měniče aniontů a kationtů, kdy aniontové sloučeniny můžeme obecně izolovat pomocí silných anexů (SAX – strong anion exchanger) nebo slabých anexů (WAX – weak anion exchanger) a kationtové sloučeniny použitím silných katexů (SCX – strong cation exchanger) nebo slabých katexů (WCX – weak cation exchanger). Hlavní retenční mechanismus látky je založen na elektrostatické přitažlivosti nabité funkční skupiny na sloučenině se skupinou, která je vázána na povrchu silikagelu. Aby byla látka iontovou výměnou zachycena z vodného roztoku, musí být nabitá, přičemž interferující sloučeniny by měly být pokud možno neutrální. K eluci se používá roztok o hodnotě pH, které neutralizuje funkční skupinu sloučeniny nebo funkční skupinu na povrchu sorbentu. Pokud je jedna z těchto funkčních skupin neutralizována, dojde k narušení elektrostatické síly a k eluci sloučeniny. Eventuálně se k eluci analytů používá roztok, který má vysokou iontovou sílu nebo obsahuje ionty, které vytlačují adsorbovanou sloučeninu.[9]

V mnoha případech je analyt eluován ve vodném roztoku. Pokud musíme k eluci analytu použít kyselý nebo bazický roztok, ale přitom musí být extrahovaný vzorek analyzován v organickém rozpouštědle, které není mísitelné s vodou, je dobré vyzkoušet eluci látek okyseleným metanolem (98 % methanol/2 % koncentrovaná HCl) nebo metanolem za přídavku amoniaku (98 % methanol/2 % NH_4OH). Methanol je po eluci možné relativně snadno odpařit a vzorek může být znovu rozpuštěn v jiném rozpouštědle. Pokud potřebujeme k eluci analytu silnější, nepolární rozpouštědlo, přídáme k okyselenému nebo zalkalizovanému methanolu metylenchlorid, hexan nebo ethylacetát.[9]

Iontově výměnná fáze se dělí do dvou skupin podle druhu sorbentu:

- **Silikagel**

Fáze s monomerně vázaným aminopropylem – viz normální fáze.

SAX je tvořena z alifatické kvartérní aminové skupiny vázané na povrchu silikagelu. Kvartérní amin je silný anex a existuje jako pozitivně nabitý kation, který mění nebo přitahuje anionty v roztoku. Používá se k izolaci aniontů silných kyselin (velmi nízké pK_a, <1) nebo

aniontů slabých kyselin (pK_a, >2), např. organických a nukleových kyselin, nukleotidů a tenzidů.[9]

SCX je oxid křemičitý se skupinami alifatických sulfonových kyselin, které jsou vázány na povrchu. Vázaná funkční skupina je nabitá v celém rozsahu pH, a proto může být použita k izolaci kationtů silných bází (velmi vysoké pK_a, >14) a kationtů slabých bází (mírně vysoké pK_a, <12). Používá se k extrakci antibiotik, léčiv, organických bází, aminokyselin, katecholaminů, herbicidů, bází nukleových kyselin, nukleosidů a tenzidů.[9]

WCX je silikagel s alifatickou skupinou karboxylové kyseliny vázanou na povrchu. WCX může být použita k izolaci kationtů silných a slabých bází, jelikož funkční skupina karboxylové kyseliny může být neutralizována, aby došlo k jejich eluci. Materiál je vhodný k extrakci aminů, antibiotik, léčiv, aminokyselin, katecholaminů, bází nukleových kyselin, nukleosidů a tenzidů.[9]

- **Polymerní sorbent**

  Zde se řadí polymery modifikované např. sulfoskupinami nebo kvartérním aminem.

2.1.4.4 Fáze se smíšeným mechanismem retence

Materiály založené na fázi se smíšeným mechanismem retence jsou v posledních letech využívány pro extrakci léčiv v přírodních vzorcích. Tyto polymerní sorbenty jsou všestranné a účinné pro extrakci analytů s širokým rozsahem polarit a hodnot pH. Tyto sorbenty se označují MCX a MAX.[12]

MCX může být stavěná na kopolymerním sorbentu (např. na hydrofilně-lipofilním) s dodatečnou přítomností sulfonových skupin, díky kterým je silným katexem. Proto MCX poskytuje obě retence, jak iontovou výměnu, tak revezrní fázi a může adsorbovat polární, nepolární, neutrální a kationtové sloučeniny současně z vodného prostředí a má širší spektrum retence, lépe reprodukovatelné a stabilnější než sorbent založený na silikagelu. MCX je zdárně využívána k extrakci široké škály léků a syntetických hormonů z vodných matric. Extrakce analytů s MCX vyžaduje kyselé pH roztoku, kvůli ionizaci zásaditých analytů a snížení disociace kyselých analytů. Proto MCX může extrahovat kyselé, bazické a neutrální sloučeniny při nízkých hodnotách pH, jako katex váže bazické sloučeniny, které jsou

v ionizované formě a nepolární část fáze může zachytit kyselé a neutrální sloučeniny. Tyto charakteristiky umožňují větší volnost při volbě experimentálních podmínek. Mnohé z analytů obsahují kyselou nebo bazickou funkční skupinu, která může interagovat s hydrofilní části MCX sorbentu. Analyty nesoucí amino skupiny, které jsou kladně nabité při pH 2, jako např. atenolol, furosemid, hydrochlorthiazide, salbutamol a loratadine interagují se sulfonovou skupinou MCX.[12]

MAX sorbent obdobně obsahuje kvartérní amoniovou skupinu vázanou na polymer přes alifatický uhlík. Je silným anexovým sorbentem.[13]

Všechny popsané polymerní fáze mají povrchovou plochu přibližně 800 m^2/g.[8]

2.1.5 MIKROEXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI

SPME je jednoduchá, rychlá a citlivá metoda k analýze vodných vzorků, která byla vynalezena v roce 1989. Je to účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytu, který nevyžaduje rozpouštědla nebo komplikované aparatury. Principem je expozice malého množství extrakční fáze nadbytku vzorku. Stacionární fází je křemenné vlákno potažené polydimethytsiloxanem, tekutými krystaly polyakrylátu nebo polyimidem. Polydimethylsiloxan je poměrně nepolární a je především vhodný pro extrakci nepolárních látek. Polyakrylát je pro běžné použití vysoce polární, ale je ideální pro extrakci fenolů. Mezi další dostupné vrstvy patří např. uhlíkové molekulární síto/polydimethylsiloxan (pro nestabilní plynné analyty), polyethylen glykol/pryskyřice (pro HPLC aplikace), divinylbenzen/uhlíkové molekulární síto/polydimethylsiloxan (pro širokou škálu polarit) a polyetylen glykol. Vlákno může být použito ke sledování chlorovaných uhlovodíků, polychlorovaných bifenylů a 2-naftolu.[6, 12, 14] Geometrie SPME umožňuje umístění sorbentu (vlákno s povlakem) do vzorku (plynné nebo vodné matrice) nebo headspace prostoru nad vzorkem.[16]

Postup mikroextrakce se skládá ze dvou procesů: rozdělení analytů mezi povlak a vzorek a desorpce koncentrovaných analytů do analytického přístroje. V prvním kroku je potažené vlákno imobilizovaným organickým filmem vystavené vzorku, kde dochází k vytvoření rovnováhy mezi vláknem a vzorkem přičemž cílové analyty jsou extrahovány z matrice vzorku do stacionární fáze. Vlákno s koncentrovanými analyty je poté přeneseno

do injekčního portu plynové chromatografie, kde jsou organické analyty tepelně desorbovány, separovány a kvantifikovány. Křemenné vlákno, které je samo o sobě chemicky inertní a velmi stabilní při vysokých teplotách, dovoluje v injekční stříkačce snadnou manipulaci a zároveň dochází k jeho ochraně během penetrace septa. Mezi adsorbovaným množstvím a koncentrací v roztoku se očekává lineární vztah.[16, 17]

SPME zachovává všechny výhody SPE jako je jednoduchost, nízká cena, snadná automatizace a zároveň redukuje nevýhody jako je použití rozpouštědel.[16, 17] Praktická aplikace jakékoliv metody k rutinní analýze je usnadněna její automatizací. To je důležité zejména v oblasti environmentálních laboratořích, kde propustnost vzorků je vysoká a rychlost analýzy musí být co nejkratší. Automatizace přípravy vzorku je obtížná pro mnohé typy vzorků.[14]

Přestože byla SPME původně aplikovaná pouze pro extrakce organických sloučenin z čistých vzorků (vzduch, voda), nyní se stále více používá v bioanalýze pro stanovení proteinů, polárních alkaloidů, léků a povrchově aktivních látek. Tato technika bývá obvykle spojena s analytickou koncovkou jako je kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza a hmotnostní spektrometrie. SPME je vynikající alternativou klasických metod pro separaci léčiv a biomolekul z biologických vzorků, je rychlejší a poskytuje zřetelně čistější extrakty oproti metodám založeným na extrakci kapalina-kapalina nebo extrakci na pevné fázi.[18]

2.1.6 EXTRAKCE NADKRITICKOU TEKUTINOU

Nadkritická fluidní extrakce (SFE) je izolační metoda, která redukuje některé nedostatky kapalinové extrakce kapalin a pevných látek. Byla používána po mnoho let v průmyslovém měřítku pro extrakci těkavých složek, např. éterických olejů a aromatických sloučenin z rostlinných materiálů. V poslední době se aplikace této techniky rozmohla i v analytickém měřítku, kdy začala poutat pozornost pro přípravu vzorku před chromatografickou analýzou.[1]

V SFE extrakci využíváme superkritickou tekutinu nad kritickou teplotou a tlakem. Poměrně rychlá extrakce je důsledkem vyšší difuzivity a nižší viskozity usnadňující transport hmoty (často méně než 30 min), snížení použití nebezpečných rozpouštědel (např. oxid uhličitý je běžně používaný jako extrakční rozpouštědlo, je netoxický, levný a snadno

dostupný), snadný průnik do pórů matrice, který umožňuje nízké povrchové napětí superkritické kapaliny (SF), vysoký stupeň automatizace a zisk čistého a koncentrovaného extraktu jsou výhody této techniky. Další důležitou výhodou SFE extrakce aktivních látek z léčivých rostlin je, že zamezíme degradaci v důsledku dlouhého vystavení zvýšeným teplotám a atmosférickému kyslíku. Oproti tomu zvýšený tlak a tudíž potřeba tlakového zařízení vede k vyšším pořizovacím nákladům a obtížnost extrakce polárních molekul, které se často vyskytují v reálných matricích, jsou značnou nevýhodou. Avšak přídavek organického rozpouštědla k CO_2 (metanol nebo toluen) umožňuje extrakci velkého množství molekul o různé polaritě.[1, 4, 19]

V SFE může být několik experimentálních podmínek (teplota, tlak, čas extrakce, průtok SF a hustota rozpouštědla) upraveno k optimalizaci návratnosti, kinetiky a selektivity extrakce. Např. Ma a spolupracovníci při extrakci účinných látek z *Curcuma zedoaria* zjistili, že hustota CO_2 a objem kapaliny procházející rostlinnou matricí jsou nejdůležitějšími faktory ovlivňující účinnost extrakce, zatímco zvýšená teplota má jen malý účinek.[1, 19]

Nadkritickou fluidní extrakci můžeme provádět dvěma způsoby:

- Off-line způsobem, kdy dochází k zachycení extraktu do rozpouštědla, na sorbent nebo inertní materiál. Tento způsob se používá především při optimalizaci extrakčních podmínek a studiu výtěžnosti.

- On-line provedení, kdy je SFE přímo spojena s analytickou jednotkou (kapalinovou, plynovou nebo superkritickou fluidní chromatografií). Díky tomu nemusíme se vzorkem před provedením analýzy nijak manipulovat.[19]

2.1.7 ZRYCHLENÁ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM

Principem této techniky je extrakce v soustavě pevná látka-kapalina prováděna v krátkém časovém intervalu (5–20 min) za zvýšené teploty (50–200 °C) a tlaku (10–15 MPa).[4]

Pro rychlou a účinnou extrakci analytů z pevných matric jako jsou rostlinné materiály je extrakční teplota důležitým experimentálním faktorem. Zvýšená teplota může vést k významnému zlepšení schopnosti extrakčních rozpouštědel rozpouštět analyty,

k účinnějšímu smáčení vzorku a proniknutí rozpouštědla do matrice. Všechny tyto faktory vedou k celkovému zlepšení extrakce a desorpce analytů z povrchu a aktivních míst pevných matric. Pro dosažení všech těchto výhod je však potřeba udržet extrakční rozpouštědla při vysokých teplotách v kapalném stavu (obvykle nad jejich bodem varu při normálním tlaku), což umožňuje právě aparatura pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem.[1] Vysoká teplota umožňuje narušit interakce mezi analytem a matricí, zvyšuje difúzní rychlost, snižuje viskozitu rozpouštědla a povrchové napětí.[4] Dalším důležitým faktorem je volba rozpouštědla. Vhodný je např. methanol, ve kterém jsou rozpustné mnohé organické sloučeniny.[1]

Z hlediska extrakčního času a spotřeby rozpouštědla poskytuje PLE často lepší výsledky oproti ostatním extrakčním metodám používaných v analýzách surových rostlinných materiálů, přičemž výtěžnost analytů je stejná nebo vyšší.[1]

2.1.8 MIKROVLNNÁ EXTRAKCE

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny patřící do frekvenčního pásma 300 MHz – 300 GHz, což odpovídá vlnové délce 1 m – 1 mm, nejčastěji se ale využívá frekvence okolo 2450 MHz. (λ= 12,24 cm). Během dielektrického ohřevu dochází k přeměně elektrické energie na energii tepelnou působením elektrického pole na polární molekuly materiálu. Dipóly molekul se neustále natáčejí podle okamžitého směru elektromagnetického pole. Využívá se tak mezimolekulárního tření a hystereze, která vzniká mezi působícím polem a indukovanou elektrickou odezvou vlivem setrvačnosti. Ohřev produktu je proto velmi rychlý a probíhá v celém objemu.[4]

Účinek mikrovlnného záření je značně závislý na povaze rozpouštědla a matrice. Často upřednostňujeme rozpouštědla s vysokou dielektrickou konstantou, aby docházelo k silné absorpci záření.[4]

Na rozdíl od klasických extrakčních metod jako je kapalina-pevná látka (např. Soxhletova extrakce), ve které je vyžadován poměrně dlouhý extrakční čas (obvykle 3–48 h) je použití mikrovlnné energie velmi výhodné z hlediska snížení extrakčního času (obvykle méně než 30 min), protože mikrovlny ohřívají rozpouštědlo, či směs rozpouštědel téměř okamžitě. Kromě toho umožňuje výrazně nižší spotřebu organického rozpouštědla (obvykle méně než 40 ml, v porovnání se 100–500 ml požadovaných v Soxhletově extrakci).[1]

Složení rozpouštědla, objem rozpouštědla, extrakční teplota a vlastnosti matrice jsou běžně studované podmínky pro optimalizaci MAE, a zároveň se zdají být pro rostlinné materiály nejdůležitější.[1] Použití čistého rozpouštědla (např. hexan), který je propustný pro mikrovlny umožní absorpci mikrovlnné energie přímo polárními molekulami (voda) přítomnými ve vzorku rostlinného pletiva (ve žlázách a cévním systému), což může vést k rychlejšímu rozrušení rostlinného pletiva a uvolnění esenciálního oleje do organického rozpouštědla.[1, 4]

2.1.9 QuEChERS EXTRAKCE

QuEChERS metoda, jejíž název je odvozen ze slov quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (rychlé, snadné, levné, odolné a bezpečné) umožňuje snadnější a méně nákladnou extrakci chemických látek v potravinách, než jiné extrakční metody.[14] Tato technika je poměrně nová, byla vyvinuta v letech 2000–2002 a představuje revoluční způsob v analýze pesticidů a dalších látek.[21, 22] Mezi hlavní výhody oproti většině tradičních metod patří vysoká návratnost (>85 %), velmi precizní výsledky, minimální spotřeba nechlorovaných rozpouštědel, není zapotřebí velké skleněné aparatury, takže se dá provádět i v malé mobilní laboratoři. K provedení extrakce stačí pouze jedna osoba bez velkého školení nebo technických dovedností.[23]

Postup QuEChERS metody zahrnuje 2 jednoduché kroky. V prvním kroku jsou homogenizované vzorky extrahovány organickým rozpouštědlem (acetonitrilem), po němž následuje extrakce/dělící krok přidáním solné směsi (vodný roztok NaCl) a centrifugace. V dalším kroku je supernatant extrahován a čištěn disperzní extrakcí na pevné fázi (d-SPE). Konečný extrakt v acetonitrilu je přímo určený k analýze založené na LC nebo GC.[22, 24]

dSPE odstřeďovací zkumavka k dostání ve dvou rozměrech (2 ml a 15 ml) obsahuje síran hořečnatý, který slouží k odstranění zbytků vody a sorbent s primárním sekundárním aminem (PSA) k odstranění cukrů a mastných kyselin. Tyto zkumavky jsou k dispozici s nebo bez grafitického uhlíku (k odstranění pigmentů a sterolů) nebo s C-18 materiálem k odstranění nepolárních interferencí jakou jsou lipidy.[24]

QuEChERS efektivně zahrnuje velmi široký rozsah analytů. Metoda byla úspěšně použita pro extrakci a čištění různých chemikálií, včetně pesticidů, polycyklických

aromatických uhlovodíků, antibiotik a veterinárních léčiv v široké škále matric. Další výhodou je vysoká propustnost vzorků, nízká spotřeba rozpouštědla a malé nároky na požadovaný prostor při práci. QuEChERS metoda je určena pro vzorky s vysokým procentem vlhkosti a ve srovnání se SPE vyžaduje méně času.[20, 22, 25]

2.2 ANALÝZA VZORKŮ S ROSTLINNOU MATRICÍ S PŘÍSADOU SYNTETICKÝCH INHIBITORŮ PDE-5

2.2.1 PDE-5 INHIBITORY

Tyto inhibitory představují třídu léčiv používaných především k léčbě erektilní dysfunkce.[26, 27]

Fyziologický proces erekce představuje uvolnění oxidu dusnatého (NO) v *corpus cavernosum* penisu zprostředkované parasympatickým nervovým systémem. NO se váže na receptory enzymu guanylátcyklázy, který způsobuje vzrůst koncentrace cGMP vedoucí k uvolnění tepen hladkého svalstva, následně ke zvýšenému průtoku krve, a tudíž k erekci. cGMP je odbouráván fosfodiestérázou typu 5 (PDE-5), což vede k ústupu erekce. Sildenafil, tadalafil a vardenafil jsou inhibitory fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5), která je zodpovědná za degradaci cGMP. Molekulární struktury těchto léků jsou podobné jako cGMP, takže slouží jako konkurenční substrát PDE-5 v *corpus cavernosum*, což vede k lepší erekci. Tyto léky nacházejí také využití pro plicní hypertenzi, Raynaudův syndrom, výškovou nemoc a Duchenne/Becker svalovou dystrofii.[29, 31]

Sildenafil je účinný a selektivní inhibitor fosfodiesterázy typu 5 (PDE-5), který byl používán k léčbě pacientů s plícní hypertenzí. V současné době se používá k léčbě erektilní dysfunkce u mužů vedoucí ke zvýšení uvolnění corpus cavernosum. Je široce používán muži ke zlepšení tumescence a uspokojivé sexuální výkonnosti. Obvyklá dávka je 25 mg a maximální hladina v krvi je v řádu 100 ng/ml.[29, 31]

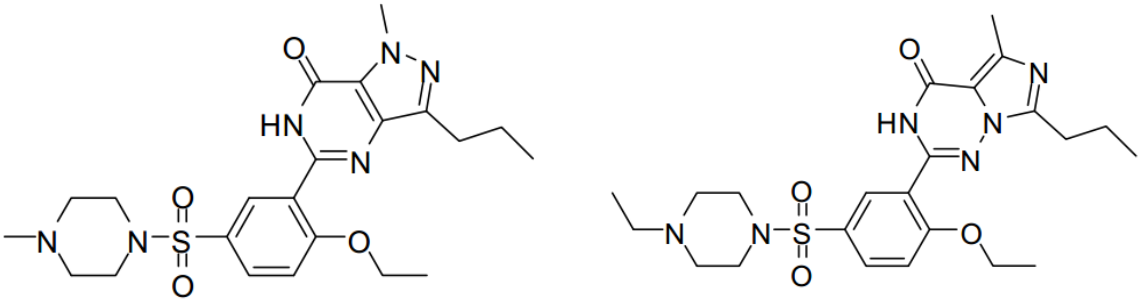
Většina analogů identifikovaných v doplňcích stravy jsou analogy sildenafilu. Mezi tyto známe analogy patří nitrodenafil, chlorodenafil, hydroxychlorodenafil, gendenafil, piperidino acetildenafil, dithio-desmethyl-karbodenafil, karbodenafil, noracetildenafil, normeosildenafil, N-desmethylsildenafil, acetildenafil, 22-dihydro-acetildenafil, dimethylacetildenafil, oxohongdenafil, dioxo-acetildenafil, hydroxy-acetildenafil, aildenafil, homosildenafil, thio-homosildenafil, thiodenafil, hydroxy-homosildenafil, thio-aildenafil, udenafil, hydroxy-thiohomosildenafil, cyklopentynafil, mirodenafil, benzylsildenafil, Nitro-prodenafil, depiperazino-thiosildenafil, atd.[30]

Systematický název sildenafilu je 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1*H*-pyrazolo-[4,3-*d*]pirimidin-5-yl) phenylsulfonyl]-4-methylpiperazin.[33]

Vardenafil je stejně jako sildenafil a tadalafil inhibitorem fosfodiesterázy typu 5 a používá se k léčbě erektilní dysfunkce. Denní dávka je podle potřeby 5, 10 nebo 20 mg.[31, 35]

Ačkoli je výroba analogů vardenafilu podobná jako analogů sildenafilu, nevyskytují se tak často. Nástup účinku je ve srovnání se sildenafilem a tadalafilem rychlejší, ale zároveň má nejkratší dobu působení. Mezi analogy vardenafilu můžeme zařadit norneovardenafil, hydroxyvardenafil, N-desethylvardenafil, acetylvardenafil a piperidino-vardenafil, atd.[30]

Systematický název vardenafilu je 4-[2-ethoxy-5-(4-ethylpiperazin-1-yl)sulfonyl-phenyl]-9-methyl-7-propyl-3,5,6,8-tetrazabicyclo[4.3.0]nona-3,7,9-trien-2-on.[36]



Obr. 1: Struktura sildenafilu (vlevo) a vardenafilu (vpravo).

2.2.2 BYLINNÉ DOPLŇKY STRAVY S NEDEKLAROVANÝM PŘÍDAVKEM LÉČIV

Erektilní dysfunkce se běžně vyskytuje (60–70 %) u pacientů s hypertenzí a ischemií myokardu. Bohužel PDE-5 inhibitory vykazují negativní interakce s některými léky používanými při léčbě těchto onemocnění (např. nitroglycerin, doxazosin a terazosin). Tato negativní stránka syntetických PDE-5 inhibitorů měla vyvolat vývoj přírodních alternativ. Bylinné terapie se tedy úspěšně uchytily na trhu pod dojmem, že jsou bezpečné a bez vedlejších účinků. Avšak u mnoha z bylinných potravinových doplňků (HDS- herbal dietary supplement) bylo následně zjištěno, že obsahují jako příměsi nejen syntetické PDE-5 inhibitory, které jsou schválené, ale i jejich neschválené strukturálně modifikované analogy.[28] Tyto nelegální přípravky pocházejí nejčastěji z jihovýchodní Asie za účelem zisku.[29]

Při průzkumu v Singapuru a Taiwanu bylo zjištěno několik výrobků čínské tradiční medicíny, které obsahovaly nadměrné množství toxických těžkých kovů a nedeklarovaná léčiva. Podobné výsledky poskytl průzkum v USA, kde bylo odhaleno téměř 32 % výrobků s obsahem nedeklarovaných léčiv. Také skoro 10 % těchto testovaných produktů poskytovaly pozitivní výsledky na toxické množství olova, rtuti nebo arzenu.

Počáteční zpráva o detekci a identifikaci analogů léčiv k erektilní dysfunkci poukazuje na homosildenafil, který byl nalezen jako příměs v potravinovém nápoji. Následně byly v bylinných produktech objeveny tři analogy sildenafilu (acetildenafil, hydroxyhomosildenafil a již zmiňovaný homosildenafil). V poslední době byl v HDS identifikován thiosildenafil a thiohomosildenafil, kde je atom kyslíku nahrazen atomem síry v pyrazolopyrimidinovém zbytku a nový analog vardenafilu, kde byla ze struktury odebrána sulfonylová skupina a N-ethylpiperazinový kruh.[28] Momentálně je známo více jak 46 různých analogů. Většina je známa už dlouho a jsou uvedeny v patentované literatuře.[30]

Bylinné doplňky stravy jsou stále více celosvětově používány kvůli přesvědčení, že přírodní produkty jsou bezpečné a bez vedlejších nežádoucích účinků. Nicméně tyto doplňky jsou často nekvalitní a jsou spojovány s různými problémy (např. identifikace autentického rostlinného materiálu, standardizace produktu, znečištění pesticidy a těžkými kovy).[28] Doplněk stravy obsahuje „dietní složky“ určené k obohacení stravy. Tyto „dietní složky“ mohou zahrnovat vitamíny, minerály, byliny nebo jiné rostlinné výtažky, aminokyseliny a látky jako jsou enzymy, tkáně orgánů, žlázy a metabolity. Výrobce doplňků stravy je zodpovědný za to, že na trh bude uvádět jen bezpečný výrobek. Obecně se přírodní doplňky stravy pro podporu mužské sexuální potence skládají z různých bylin a bylinných extraktů jako je např. *Panax ginseng* (kořen ženšenu), *Litchi chinensis* (liči semeno), *Lycium barbarum, Dimocarpus Longan, Cordyceps sinensis* (aweto), *Paeonia lactiflora* (kořen pivoňky), *Schisandra chinensis* (magnolka čínská), *Poria Coca* (indický chléb), *Epimedium brevicornum*, atd.[29]

2.2.3 PŘÍPRAVA VZORKU S PŘÍSADOU PDE-5 INHIBITORŮ

Příprava vzorku je velmi důležitým úkolem v profilování příměsi. Doplňky stravy mohou být obtížnými matricemi při testování analogů. Analogy totiž mohou být přítomny

v nízkých koncentracích mezi velkým množstvím jiných látek. Pro většinu analogů je důležitý výběr extrakčního rozpouštědla. Promývání přes filtr nemusí být dostačující, zatímco intenzivní extrakce mohou rozpouštět až příliš matrice.[28, 30]

Většina metod pro přípravu vzorku zahrnuje extrakci požadované sloučeniny v organickém rozpouštědle a poté techniky uvedené v kapitole 2. 1.

2.2.4 TECHNIKY K SEPARACI A DETEKCI PDE-5 INHIBITORŮ

Pro separaci a detekci známých PDE-5 inhibitorů ve složitých matricích se používají techniky jako tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).[28]

Pro charakterizaci neznámých analogů PDE-5 inhibitorů je vhodná ultrafialová spektroskopie (UV), infračervená spektroskopie (IR), nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) a chemická derivatizace s následnou GC-MS nebo LC-MS.[28]

2.2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie

Pokud jsou k dispozici standardy PDE-5 inhibitorů, může být TLC použita jako informační nástroj pro jejich detekci v přípravku. TLC užívá jako vyvíjející roztok chloroform/metanol/amoniak a Dragendorffovo činidlo pro detekci skvrn PDE-5 inhibitorů.[28]

2.2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC s UV nebo hmotnostním detektorem byla široce používaná pro detekci a kvantifikaci PDE-5 inhibitorů a jejich analogů. Jako stacionární fáze se obecně používá oktadecyl silan (C-18), zatímco jako mobilní fáze kombinace kyselé vodné fáze s acetonitrilem.[28]

2.2.4.3 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

LC-MS je dominantní pro charakterizaci PDE-5 inhibitorů jako příměsí v HDS. Tato technika byla použita k charakterizaci falšovaných léčiv spolu s homosildenafilem, acetildenafilem a hydroxyhomosildenafilem v kapslích, dále acetyldenafilu v tabletách a nápojích, piperidenafilu v kapslích a tabletách a v derivátech sildenafilu obsahující síru (thiosildenafil a thiohomosildenafil).[28]

2.2.4.4 Ultrafialová spektroskopie

UV spektra mohou pomoci jako předběžné vodítko pro rozpoznání různých kategorií PDE-5 inhibitorů. UV spektra příměsi s komerčními léky mohou poskytnout reálnou představu o jejich strukturální podobnosti.[28]

2.2.4.5 Blízká infračervená spektroskopie

NIR spektroskopie byla použita pro kontrolu padělků prostřednictvím kontroly homogenity šarže a testování výrobku na přítomnost farmakologicky aktivních substancí, bez ohledu na pomocné látky.[28]

Tato metoda byla úspěšně aplikována na vzorky obsahující sildenafil citrát s rozdílným vzhledem, chemickým složením a původem. Metoda může správně předpovědět přítomnosti či nepřítomnost sildenafil citrátu v 98 % vzorků.[28]

2.2.4.6 Ramanova spektroskopie

Největší výhodou Ramanovy spektroskopie je její užitečnost v oblasti analýzy padělaných tablet bez potřeby kvalifikovaného pracovníka. Tato technika byla použita pro detekci sildenafilu a tadalafilu v padělaných přípravcích.[28]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHEMIKÁLIE A LABORATORNÍ VYBAVENÍ

Deionizovaná voda (Water for HPLC, Lach:ner), acetonitril (HPLC gradient grade, J.T. Baker), kyselina mravenčí (99,7 %, Sigma-Aldrich), hydroxid amonný (25-29%, Penta), dusík, standard sildenafil, standard vardenafil, standard tadalafil.

Třepačka, Manifold pro SPE extrakce (Supelco visiprep), vyhřívaný blok (EVATERM), odstředivka (Hettich).

3.2 PRACOVNÍ POSTUP A METODY

3.3.1 Příprava standardů

Roztoky standardů byly připraveny rozpuštěním 3 mg standardu v rozpouštědle, tak aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Pro sildenafil a vardenafil bylo použita jako rozpouštědlo voda.

Výchozí standardní roztoky o koncentraci 1 mg/ml byly dále ředěny na koncentrace 100 μg/ml, 10 μg/ml, 0,1 μg/ml, 1 ng/ml a 10 ng/ml.

3.3.2 Příprava rostlinné matrice pro extrakci na pevné fázi

K přípravě modelové matrice bylo k dispozici 8 sušených rostlin obsažených v jednom z komerčně dostupných přípravků podporujících erekci, které byly extrahovány v 250 ml vody při 25 ℃ po dobu 7 dní. Jednalo se o rostliny *Dioscorae opposita* (oddenek jamu), *Schisandrae sp.* (plod), *Cinnamomi sp.* (kůra skořice), *Morindae sp.* (kořen), *Angelicae sinensis* (Angelika čínská), *Rehmanniae sp.* (kořen), *Polygonatum sp.* (oddenek kokoříku), *Carthami tinctorius* (květ světlice barvířské) jejichž navážky činily přibližně 3 g.

3.3.3 Použité laboratorní přístoje k separaci a detekci

K separaci a detekci byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatogram (UPLC, Acquity, Waters) s chromatografickou kolonou Kinetex XB–C18 50 x 2.1 mm s 2,6 μm core

shell sorbentem. Mobilní fáze se skládala z 0,1 % HCOOH v H2O (A) a 0,1 % HCOOH v ACN (B) s časově proměnným složením s gradientovou elucí. Gradient byl následující: 98% A po 1 min, na 0% ve 4. min a od 4,5 min 98%. Celkový čas analýzy byl 5 minut s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min.

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf byl ve spojení s hmotnostním spektrometrem (Q-qTof Premier, Waters) s ionizací elektrosprejem s hybridním analyzátorem Q-qTof. Elektrosprejový iontový zdroj pracoval v kladném režimu ionizace.

3.3.4 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Optimalizace parametrů iontového zdroje byla prováděna přímým zaváděním roztoku standardů sildenafilu a vardenafilu při průtoku a přibližném složení rozpouštědla, jaké bylo používáno při HPLC/MS separacích. Technická realizace spočívala ve směšování rozpouštědla dodávaného z chromatografické pumpy (500 µl/min) a proudu roztoku standardu z lineární pumpy (100 µg/ml, 5 µl/min). Výsledná koncentrace standardů v iontovém zdroji činila cca 1 µg/ml. Optimalizováno bylo několik parametrů iontového zdroje: napětí na *sampling cone* (v rozmezí 20–60 V), *extraction cone* (v rozmezí 1–6 V) a *ion guide* (v rozmezí 0–4 V), teplota ve zdroji (v rozmezí 80–120 °C), teplota desolvatačního plynu (v rozmezí 250–450 °C), průtok plynu mezi *sampling* a *extraction cone* (v rozmezí 0–50 l/h) a průtok desolvatačního plynu (v rozmezí 300–800 l/h).

3.3.5 Úprava vzorku extrakcí na pevné fázi a analýza HPLC/MS

Modelové vzorky obsahující standardy analytů v matrici byly před HPLC/MS analýzou podrobeny extrakci na pevné fázi (SPE) za použití kolonek Supelclean LC-Ph (objem 1 ml, 100 mg sorbentu), LC-CN (objem 1 ml, 100 mg sorbentu), LC-SCX (objem 1 ml, 100 mg sorbentu) firmy Sigma-Aldrich a Oasis MCX (objem 3 ml, hmotnost sorbentu 60 mg) firmy Waters (Praha). Na kolonky byl po předchozí kondicionaci a ekvilibraci nanesen roztok standardů (1 µg/ml) a kolonky byly eluovány řadou směsných rozpouštědel s postupně vzrůstající eluční silou. Jednotlivé frakce byly zachytávány odděleně a následně nastříknuty do HPLC/MS. Cílem bylo zjistit vhodné složení elučního rozpouštědla, které

zajišťovalo spolehlivé vymytí analytů ze sorbentu. Celkový postup provádění SPE včetně zvoleného složení elučního rozpouštědla je uveden v Tabulce I.

Tab. I: Postup a použití rozpouštědel u jednotlivých kolonek

Kolonka	Kondicionace	Ekvilibrace	Vzorek	Promytí	Eluce
LC-Ph	1 ml ACN	1 ml H_2O + 0,5 % HCOOH	1 ml vzorek + 0,5 % HCOOH		1 ml ACN:H_2O (75:25) + 0,5 % HCOOH
LC-CN	1 ml ACN	1 ml H_2O + 0,5 % HCOOH	1 ml vzorek + 0,5 % HCOOH		1 ml ACN:H_2O (50:50) + 0,5 % HCOOH
MCX	2 ml ACN	2 ml H_2O + 0,5 % HCOOH	2 ml vzorek + 0,5 % HCOOH	2 ml 2 % HCOOH v H_2O	2 ml ACN : konc. NH_4OH (v poměru 85 : 15)
LC-SCX	1 ml 0,1 % HCl	1 ml H_2O	1 ml vzorek + 0,1 % HCOOH	1 ml 0,1 % HCOOH v H_2O	1 ml 0,2 %NH_4OH v ACN/H_2O (20:80)

Vysoký obsah acetonitrilu v SPE extraktech způsoboval rozmývání píků po nástřiku na chromatografickou kolonu, proto byly extrakty před vlastní HPLC/MS analýzou odpařovány ve vyhřívaném bloku (55 °C) pomocí proudu dusíku a následně rozpuštěny ve směsi ACN/H_2O/ HCOOH (2:98:0,1). Po úpravě byly vzorky centrifugovány 3 minuty při 3000 otáčkách/min.

Ke zjištění limitu detekce sildenafilu a vardenafilu, byla proměřena sada extraktů obsahujících STD o koncentracích 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml a 100 ng/ml. Limit detekce byl přiřazen koncentraci, při níž poměr signálu a šumu v rekonstruovaném iontovém chromatogramu protonizovaného analytu překročil hodnotu 3.

Vliv zbytkových složek matrice přítomných v extraktech na ionizační proces byl zjištěn ze srovnání intenzit standardu sildenafilu přimíchávaného za kolonou (1,5 µg/ml, 12 µl/min; koncentrace sildenafilu po zředění mobilní fází činila 30 ng/ml), a to při nástřiku vody a extraktu po SPE (tímto způsobem je možné oddělit případný vliv ztrát analytu při extrakci na výsledek experimentu).

Dále byly provedeny tři experimenty, které sledovaly vliv matrice na návratnost extrakce, případně kombinovaný vliv na návratnost a elektrosprejovou ionizaci:

1. Byla prováděna analýza vodného extraktu s 50 ng/ml STD, který byl přidán již před SPE a analýza vodných extraktů s přídavkem 50 ng/ml STD až po SPE. Porovnáním výsledků byla zjištěna návratnost extrakce ve vzorcích obsahujících matrici; vliv

zbytkových složek matrice na ionizaci byl kompenzován jejich přítomností v obou vzorcích.

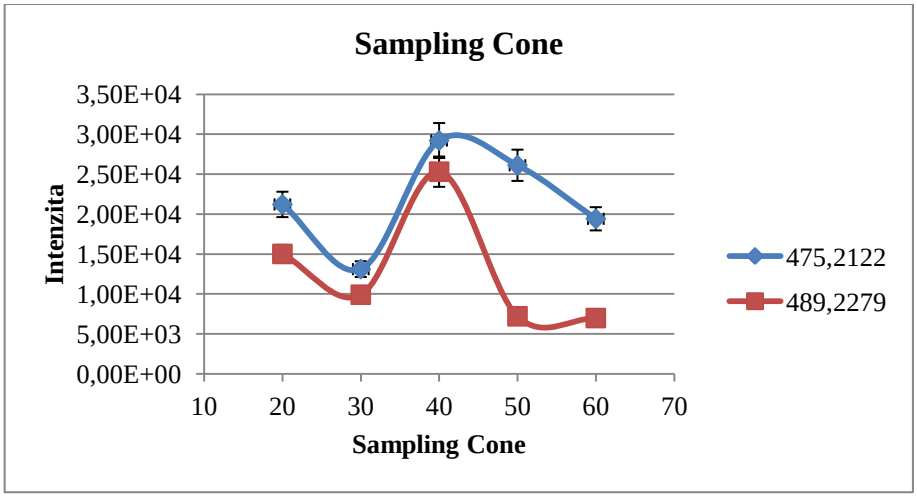
2. Metodou kalibrace na vnější standard byla stanovena a porovnána koncentrace sildenafilu a vardenafilu v SPE extraktech dvou vzorků původně obsahující 1 μg/ml těchto analytů. Jeden ze vzorků byl připraven v čistém rozpouštědle (voda), druhý obsahoval matrici. Ke kalibraci byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 250 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml.

3. Metodou kalibrace na vnitřní standard byla stanovena koncentrace vardenafilu v SPE extraktech vzorků původně obsahující 300 ng/ml tohoto analytu. Jako vnitřním standardem byl použit sildenafil o koncentraci 300 ng/ml. Taktéž byla připravena sada kalibračních roztoků vardenafilu o koncentraci 100 ng/ml, 300 ng/ml a 500 ng/ml připravených v H_2O s vnitřním standardem sildenafilu o koncentraci 300 ng/ml. Kalibrační roztoky i vzorky byly měřeny třikrát během dne.

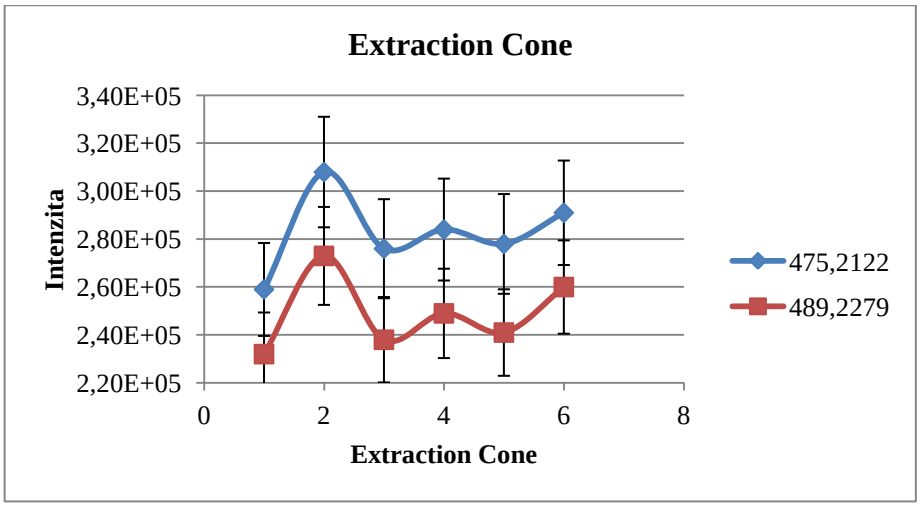
Výsledky experimentů s vnějším i vnitřním standardem podávají informaci o kombinovaném vlivu matrice na návratnost extrakce a účinnost ionizace, protože byly srovnávány vzorky připravené v čistém rozpouštědle a v matrici (metoda vnějšího standardu), resp. matrice nebyla obsažena v kalibračních roztocích (metoda vnitřního standardu).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

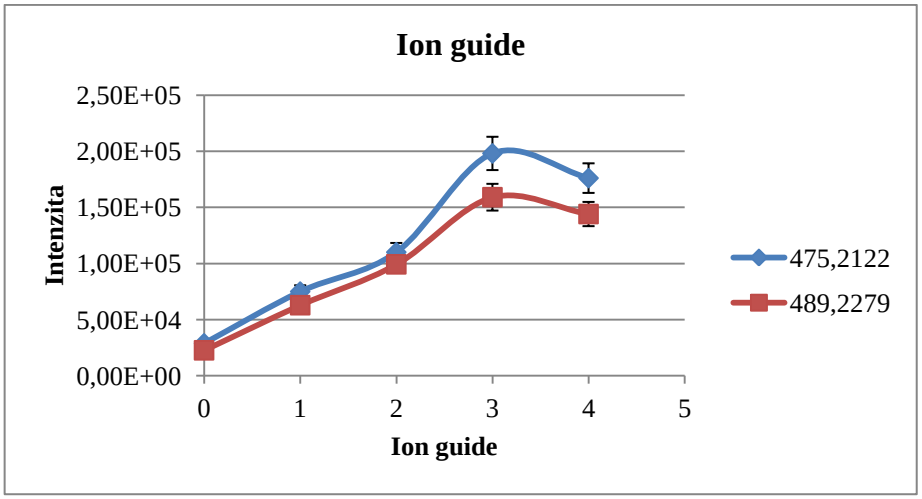
Při hledání vhodných parametrů ionizace byla sledována intenzita píků protonizovaných molekul sildenafilu (m/z 475) a vardenafilu (m/z 489) a její opakovatelnost (RSD = 7,5%). V grafech na obr. 2 až 8 jsou kromě závislostí intenzit na hodnotách sledovaných parametrů vyznačeny i chybové úsečky, které odpovídají hodnotám směrodatných odchylek ze třech meření.



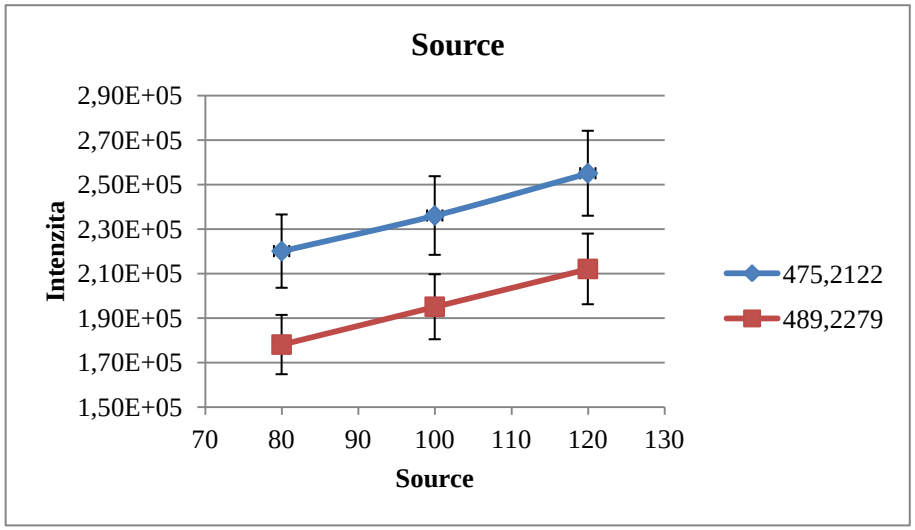
Obr. 2: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *sampling cone*



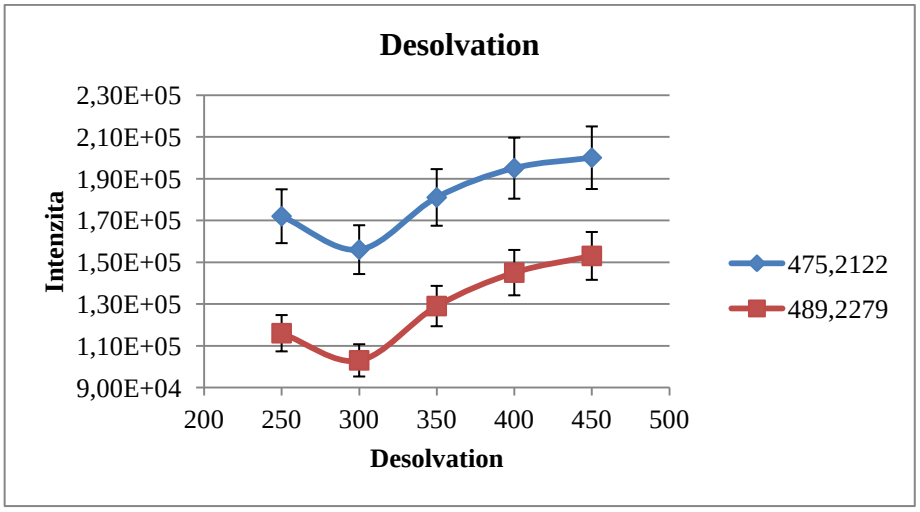
Obr. 3: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *extraction cone*



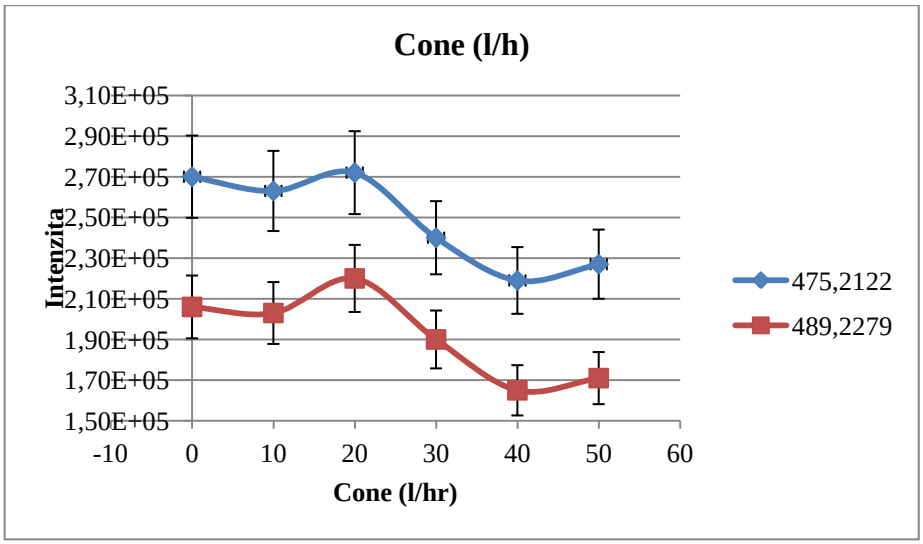
Obr. 4: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *ion guide*



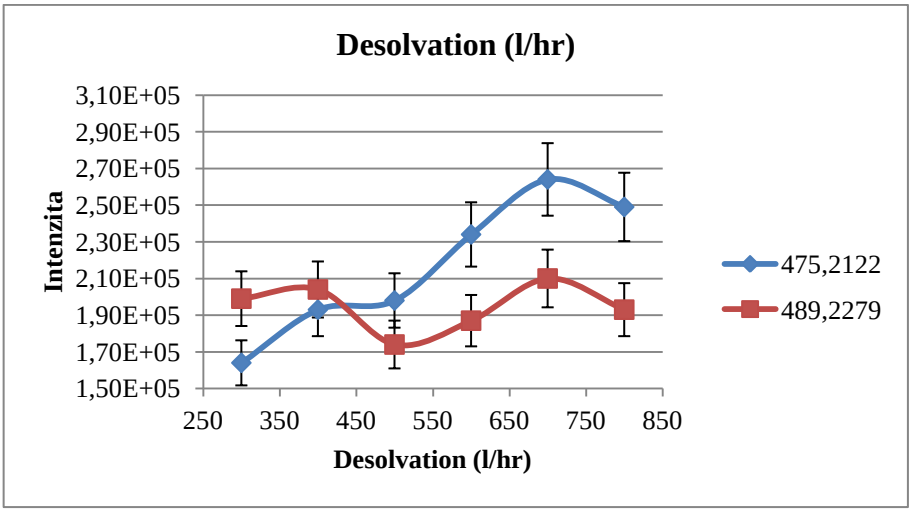
Obr. 5: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnící se teplotě ve zdroji



Obr. 6: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnící se teplotě desolvatačního plynu



Obr. 7: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se průtoku plynu mezi *sampling* a *extraction cone*



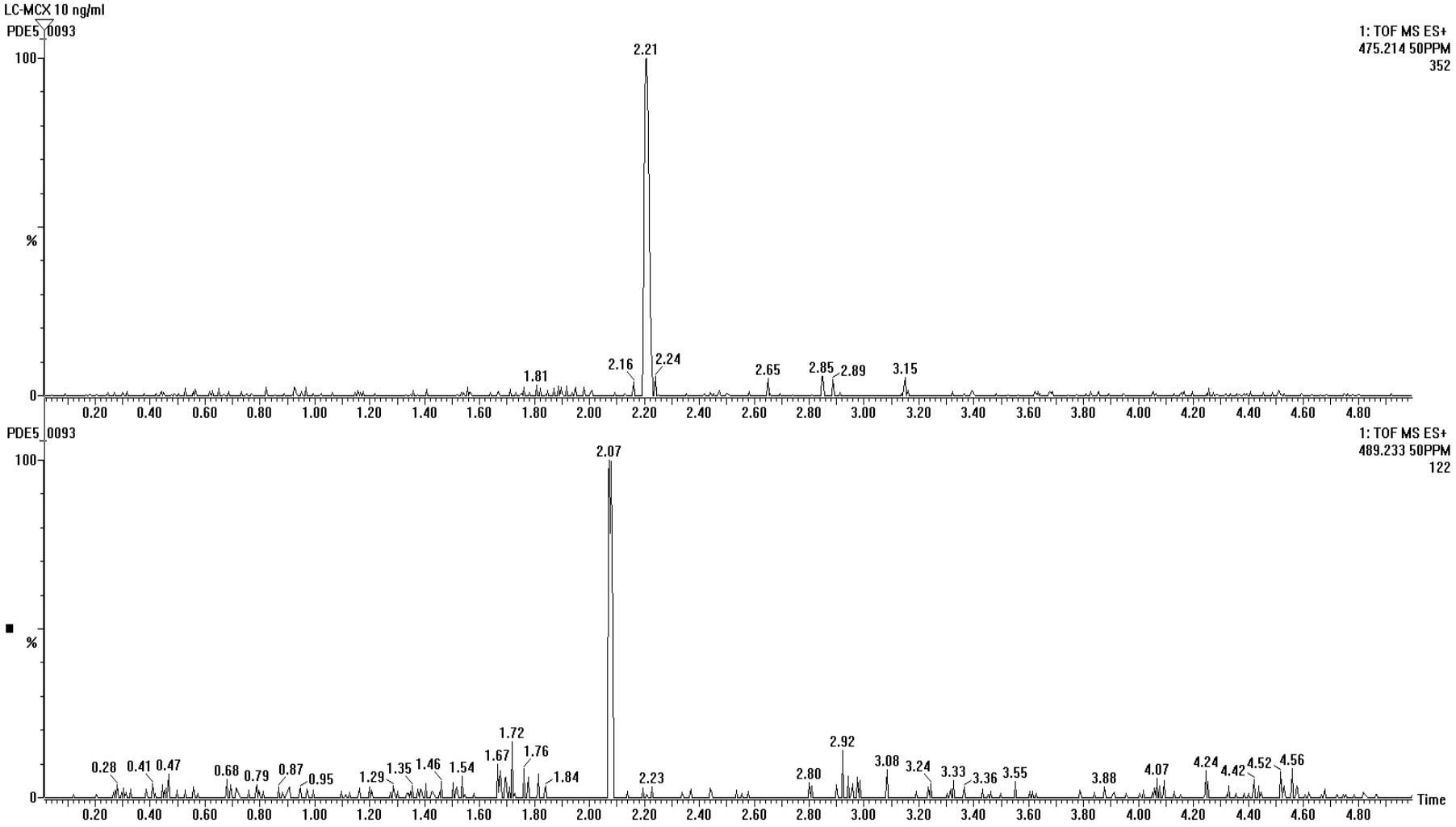
Obr. 8: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se průtoku desolvatačního plynu

Na základě závislostí zobrazených v grafech byly vybrány tyto optimální parametry iontového zdroje:

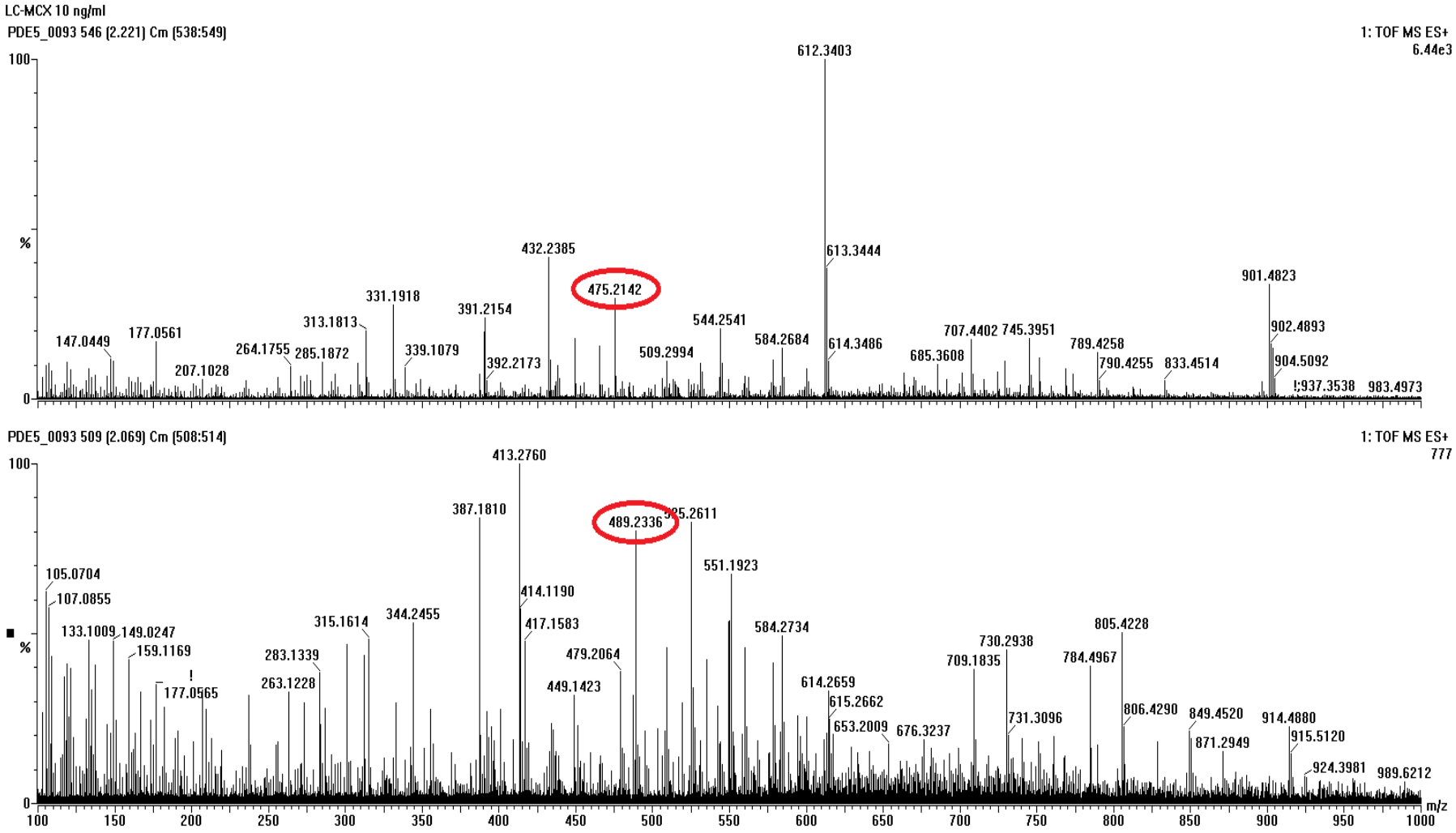
Tab. II: Optimální parametry iontového zdroje

Parametry iontového zdroje	Zvolené hodnoty
Sampling cone [V]	40
Extraction cone [kV]	2
Ion guide [kV]	3
Teplota ve zdroji [°C]	120
Teplota desolvatace [°C]	450
Cone [l/h]	20
Průtok desolvatačního plynu [l/h]	700

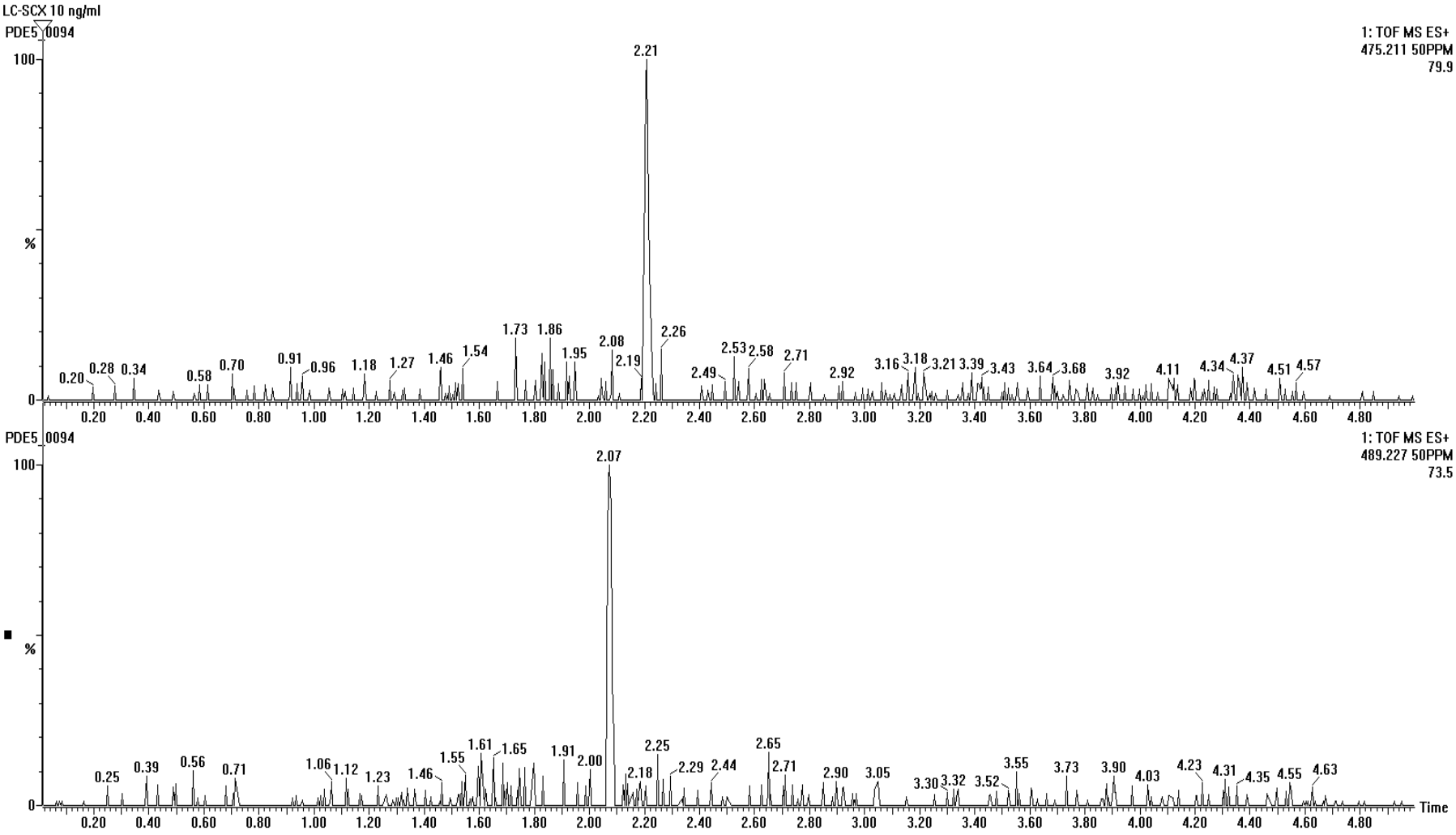
Limit detekce sildenafilu (m/z 475) a vardenafilu (m/z 489) byl určen na základě porovnání poměru signál/šum na 10 ng/ml. Níže jsou uvedeny chromatogramy a spektra pro MCX a LC-SCX kolonky. Retenční čas vardenafilu je 2,07 min, pro sildenafil 2,21 min.



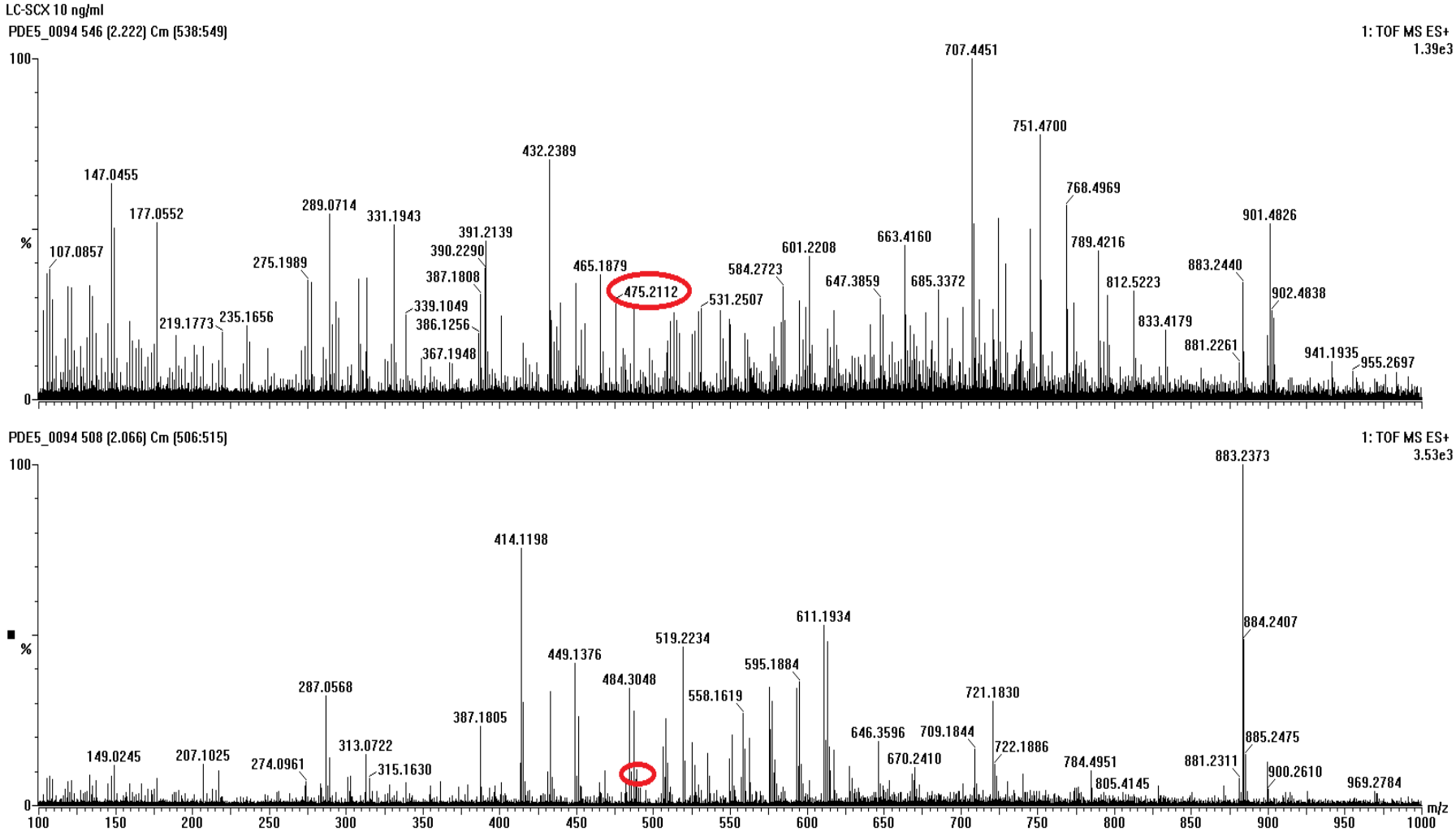
Obr. 9: Rekonstruované iontové chromatogramy pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce MCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm



Obr. 10: Rekonstruované spektra pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na koloncе MCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm



Obr. 11: Rekonstruované iontové chromatogramy pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce LC-SCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm



Obr. 12: Rekonstruované spektra pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na koloncе LC-SCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm

V průběhu všech měření jsme pozorovali, že SPE za použití kolonky MCX poskytovaly téměř vždy nejlepší výsledky (intenzita signálu, návratnost, reprodukovatelnost) a kolonky LC-SCX naopak nejhorší výsledky. Proto jsme další experimenty realizovali již jen se sorbentem MCX.

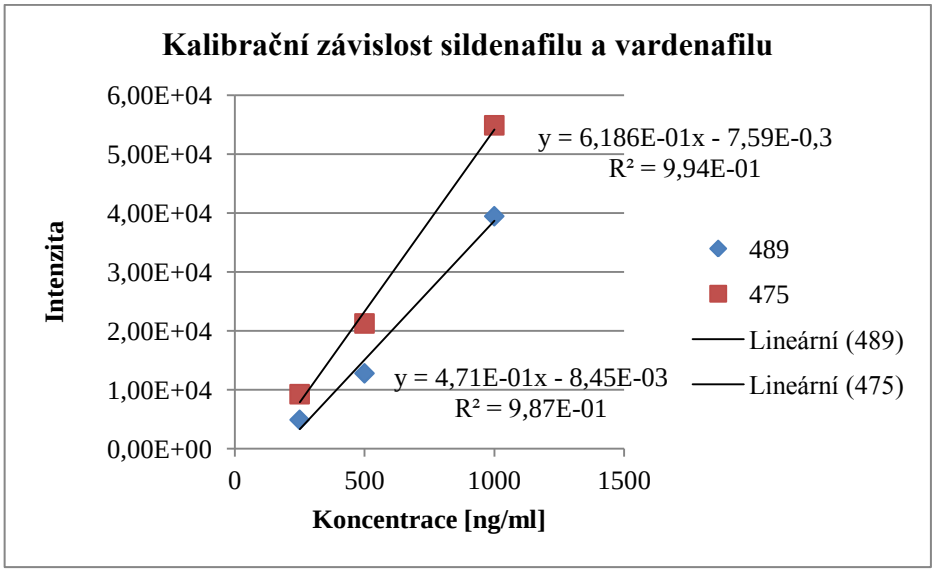
Vyhodnocení vlivu matrice na ionizaci při měření vodných extraktů za vměšování STD za kolonou při výsledné koncentraci analytu 30 ng/ml bylo shrnuto v Tabulce III. Matrice snižovala signál vardenafilu na 97% a sildenafilu na 80% hodnoty signálu pozorovaného bez vlivu matrice.

Tab. III: Vliv extrahovaných složek matrice po extrakci sorbentem MCX na účinnost ionizace

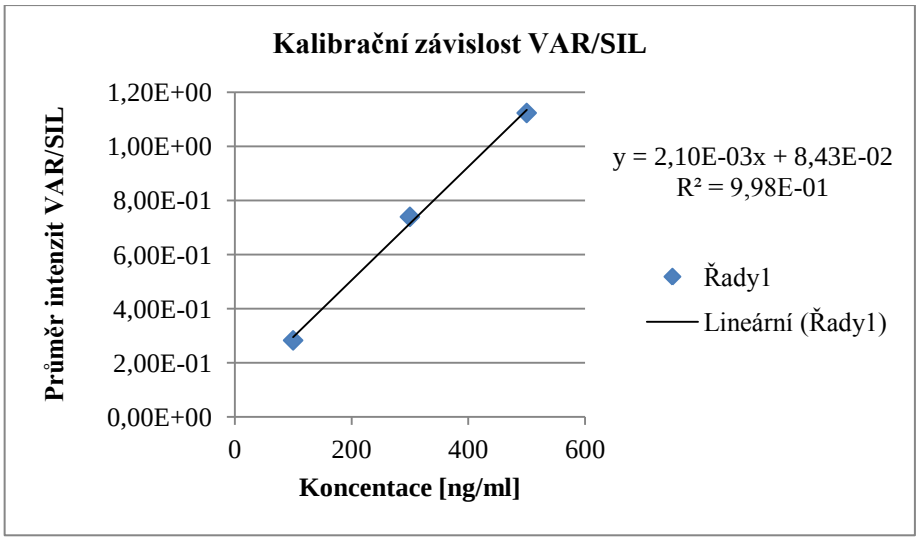
	Matrice/blank	
	Vardenafil	Sildenafil
		0,855
	0,960	0,798
	0,986	0,734
Průměr	0,973	0,796
RSD (%)	1,895	7,601

Analýzou vodného extraktu s 50 ng/ml STD přidaným u jedné sady vzorků před SPE a u druhé sady vzorků až po SPE, byl sledován vliv matrice na návratnost extrakce. Signál byl sledován u standardů m/z 475 a m/z 489. Návratnost byla vypočtena jako poměr intenzit analytu ve vzorcích s přídavkem před SPE a po SPE a činila 80% pro vardenafil a 79% pro sildenafil.

Vliv matrice byl sledován také pomocí metod kalibrace s vnějším a vnitřním standardem. Kalibrační závislosti jsou uvedeny v grafech na obr. 13 a 14.



Obr. 13: Kalibrační závislost vardenafilu a sildenafilu (metodou vnějšího standardu)



Obr. 14: Kalibrační závislost vardenafilu se sildenafilem jako vnitřním standardem

Při experimentu metodou kalibrace na vnější standard byla stanovena návratnost a vliv matrice na ionizaci pro vardenafil 94±7% a sildenafil 104±7%. Dále koncentrace vardenafilu a sildenafilu, která je uvedena v Tabulce V.

Tab. V: Návratnost vardenafilu a sildenafilu stanovená metodou vnějšího standardu

Prostředí	Koncentrace [ng/ml]	
	Vardenafil	Sildenafil
H_2O	734	1140
Matrice	692	1190
Matrice/H_2O (%)	94	104

Při experimentu metodou kalibrace na vnitřní standard byla stanovena návratnost vardenafilu 59%±7% a jeho koncentrace, která je uvedena v Tabulce VI.

Tab. VI: Návratnost extrakce vardenafilu sorbentem MCX stanovená metodou vnitřního standardu

Prostředí	Koncentrace [ng/ml]
	Vardenafil
H_2O	318
Matrice	189
Matrice/H_2O (%)	59

Přístup k hodnocení návratnosti třemi různými výše uvedenými způsoby vycházel z nedostupnosti izotopově značených standardů analytů, které jsou pro takový experiment nejvhodnější (v ideálním případě mají retenční čas a výtěžek ionizace shodný s analytem). Určitý nesoulad ve zjištěných hodnotách návratnosti tak lze připsat např. variabilitě účinnosti ionizace v čase nebo různému retenčnímu času analytu a vnitřního standardu.

5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na přípravu vzorku obsahujícího syntetické inhibitory PDE-5 v rostlinné matrici technikou extrakce na pevné fázi. Vzhledem k časté adulteraci potravních doplňků údajně založených na čistě přírodní bázi těmito látkami je toto téma velice aktuální a je předmětem pozornosti národních vládních institucí zapojených do kontroly bezpečnosti léčiv příp. potravin.

V teoretické části se poukazuje na výběr vhodné extrakční metody, jejich výhody a nevýhody. Mezi nejčastější extrakční metody patří extrakce tuhou fází a poměrně nedávno se objevila extrakční metoda QuEChERS. Dále jsou zde popsány syntetické PDE-5 inhibitory, jejich účinek na lidský organismus a techniky k jejich separaci a detekci publikované v původní literatuře.

V experimentální části jsou prezentovány výsledky studia extrakce dvou zástupců výše zmíněné skupiny látek na pevné fázi, jejichž separace a detekce byla prováděna metodou HPLC/MS. V SPE extrakci byly použity sorbenty s reverzními fázemi (fenylová, kyanopropylová), s iontoměničem (SCX) a se smíšeným mechanismem retence (reverzní/iontoměničová fáze). K danému účelu extrakce syntetických inhibitorů PDE-5 z rostlinné matrice se jako nejvhodnější jevila fáze LC-MCX. Byly zjištěny uspokojivé hodnoty ukazatelů návratnosti extrakce a ovlivnění ionizační účinnosti extrahovanými složkami matrice. Dosažitelný limit detekce s použitým instrumentálním vybavením (HPLC separace na moderním typu sorbentu založeném na core-shell částicích, detekce hmotnostním spektrometrem s hybridním QqTOF analyzátorem) byl stanoven na 10 ng/ml. S použitím izotopově značených standardů analytů by bylo možné metodu použít ke spolehlivé kvantifikaci syntetických inhibitorů PDE-5 potenciálně přítomných v bylinných přípravcích určených k léčbě erektilní dysfunkce.

6. LITERATURA

1. Carmen W. H.: A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Anal. Bional. Chem.*, **373**, 23–30 (2002).

2. Haifeng W., Jian G., Shilin Ch., Xin L., Yan Z., Xiaopo Z., Xudong X.: Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents their metabolites using liquid chromatography–mass spektrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **72**, 267–291 (2013).

3. Bimark M., Rahman R. A., Taip F. S., Adzahan N. M., Sarker Md. Z. I., Ganjloo A.: Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition, *Molecules*, **17**, 11748–11762 (2012).

4. Bielská L.: *Metody analytické extrakce perzistentních organických polutantů z pevných matric.* Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2006.

5. Abad M. J., Bedoya L. M., Apaza L., Bermejo P.: The *Artemisia* .Genus: A rewiew of bioactive essential oils, *Molecules*, **17**, 2542–2566 (2012).

6. Rijke de E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. Th.: Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr., A*, **1112**, 31–63 (2006).

7. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 1996.

8. Bäuerlein P. S., Mansell J. E., ter Laak T. L., de Voogt P.: Sorption behavior of charged and neutral polar organic compounds on solid phase extraction materials: Which functional group governs sorption?, *Eviron. Sci. Technol.*, **46**, 954–961 (2012).

9. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf, staženo 22. 3. 2013.

10. http://www.weber.hu/PDFs/SPE/Tn110_SPE_modes.pdf, staženo 12. 4. 2013.

11. http://www.instrument.com.cn/Quotation/Manual/71841.pdf, staženo 28. 3. 2013.

12. Al-Odaini N. A., Zakaria M. P., Yaziz M. I., Surif S.: Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spektrometry, *J. Chromatogr., A*, **1217**, 6791–6806 (2010).

13. Fontanals N., Trammell B. C., Galià M., Marcé R. M., Iraneta P. C., Borrull F., Neue U. D.: Comparison of mixed-mode anion-exchange performance of N-vinylimidazole-divinylbenzene sorbent, *J. Sep. Sci.*, **29**, 1622–1629 (2006).

14. Arthur C. L., Killam L. M., Buchholz K. D., Pawliszyn J.: Automation and optimization of solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **64**, 1960–1966 (1992).

15. Risticevic S., Niri V. H., Vuckovic D., Pawliszyn J.: Recent developments in solid-phase microextraction, *Anal. Bional. Chem.*, **393**, 781–795 (2009).

16. Zhang Z., Yang M. J., Pawliszyn J.: Solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **66**, 844A–853A (1994).

17. Arthur C. L., Killam L. M., Motlagh S., Lim M., Potter D. W., Pawliszyn J.:Analysis of substitued benzene compounds in groundwater using solid-phase microextraction, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 979–983 (1992).

18. Musteata F. M., Pawliszyn J.: Bioanalytical applications of solip-phase microextraction, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **26**, 36–45 (2007).

19. Bielská L.: *Využití metody superkritické fluidní extrakce k extrakci organických polutantů.* Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno 2008.

20. Xiaomei S., Fen J., Yuting H., Xinwei D., Chunmei L., Miao W., Hua S., Maojun J., Jing W.: Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by modified quick, , easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 60–65 (2012).

21. Lehotay S. J., Anastassiades M., Majors R. E.: The QuEChERS revolution, *LC GC Europe*, **23**, 418 (2010)**.**

22. Payá P., Anastassiades M., Mack D., Sigalova I., Tasdelen B., Oliva J., Barba A.: Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection, *Anal. Bional. Chem.*, **389**, 1697–1714 (2007).

23. http://www.amchro.de/PDFs/SPE/Quechers-Methode.pdf, staženo 5. 4. 2013.

24. http://www.restek.com/pdfs/805-01-002.pdf, staženo 5. 4. 2013.

25. Llorent-Martínez E. J., Ortega-Barrales P., Fernández-de Córdova M. L., Ruiz-Medina A.: Quantitation of ochratoxin a in cereals and feedstuff using sequential injection analysis with luminiscence detection, *Food control*, **30**, 379–385 (2013).

26. Gratz S. R., Zeller M., Mincey D. W., Flurer Ch. L.: Structural characterization of sulfoaildenafil, an analog of sildenafil, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**, 228–231 (2009).

27. Delpy E., le Monnier de Gouville A. Ch.: Cardiovascular effects of a novel, potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor, DMPPO: *in vitro* and *in vivo* characterization, *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1377–1384 (1996).

28. Singh S., Prasad B., Savaliya A. A., Shah R. P., Gohil V. M., Kaur A.:Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and thein analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs, *Trends Anal. Chem.*, **28**, 13–28 (2009).

29. Zhu X., Xiao S., Chen B., Zhang F., Yao S., Wan Z., Yang D., Han H.: Simultaneous determinativ of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liguid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*, **1066**, 89–95 (2005).

30. Venhuis B. J., de Kaste D.: Toward a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69**, 196–208 (2012).

31. Ormrod D., Easthope S. E., Figgitt D. P.:Vardenafil, *Drugs & Aging*, **19**, 217–227 (2002).

32. Wang Y., Wang J., Cui Y., Fawcett J. P., Gu J.: Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma, *J. Chromatogr., B*, **828**, 118–121 (2005).

33. Pistos C., Papoutsis I., Dona A., Stefanidou M., Athanaselis S., Maravelias C., Spiliopoulou Ch.: Off-line HPLC method combined to LC-MS for the determinativ of sildenafil and its active metabolite in post-mortem human blood according to confirmation criteria, *Forensic. Sci. Int.*, **178**, 192–198 (2008).

34. Zou P., Hou P., Low Min-Yong, Koh Hwee-Ling: Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product, *Food Addit. Contam.*, **23**, 446–451 (2006).

35. Reddy V. V., Rao M. V. N. B., Reddy G. M., Mukkanti K., Reddy G. M.: Synthesis and spectral characterization of related substance sof vardenafil, an erectile dysfunction drug, *Synth. Commun.*, **42**, 3513–3523 (2012).

36. http://www.chemexper.com/chemicals/supplier/cas/224785-90-4.html, staženo 5. 4. 2013.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
SE	Soxhlet extraction
UE	ultrasonic extraction
PPT	protein precipitation
LLE	liquid-liquid extraction
SPE	solid-phase extraction
d-SPE	dispersive solid-phase extraction
SPME	solid-phase microextraction
SFE	supercritical-fluid extraction
SF	supercritical-fluid
PLE	pressurized-liquid extraction
MAE	microwave-assisted extraction
QuEChERS	quick, easy, cheap, effective, rugged, safe
GC	gas chromatogramy
LC	liquid chromatography
HPLC	high-performance liquid chromatogramy
TLC	thin-layer chromatogramy
IR	infrared spectroscopy
NIR	Nera infrared specktoscopy
MS	mass spektrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
UV	ultraviolet, ultrafialové záření
h	hour, hodina
min	minute, minuta
l	litr
ml	mililitr
g	gram
mg	miligram
ng	nanogram
μg	mikrogram

μm	mikrometr
nm	nanometr
MHz	megahertz
GHz	gigahertz
λ	vlnová délka
π	pí
m/z	mass to charge ratio
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity noniových kationtů (potenciál of hydrogen)
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při 25 ℃
^oC	stupeň Celsia
%	procento
např.	například
atd.	a tak dále
tj.	to je
apod.	a podobně
cca	přibližně
příp.	případně
viz	odkaz na jinou stránku apod.
tab.	tabulka
obr.	obrázek
C	uhlík
CO_2	oxid uhličitý
NO	oxid dusnatý
H_2O	voda
HCl	kyselina chlorovodíková
NH_4OH	hydroxid amonný
ACN	acetonitril
HCOOH	kyselina mravenčí
DMSO	dimethylsuloxid
PDE-5	fosfodiesteráza typu 5
cGMP	cyklický guanosin monofosfát

HDS	herbal dietary supplements (bylinné doplňky stravy)
STD	standard
VAR	vardenafil
TAD	tadalafil
SIL	sildenafil
Ph	fenyl
CN	nitrilová skupina (kyano- předpona)
WAX	weak anion exchanger
WCX	weak cation exchanger
SAX	strong anion exchanger
SCX	strong cation exchanger
MAX	mixed-mode anion exchanger
MCX	mixed-mode cation exchanger
ESI	electrospray ionization

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura sildenafilu (vlevo) a vardenafilu (vpravo)

Obr. 2: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *sampling cone*

Obr. 3: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *extraction cone*

Obr. 4: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se napětí na *ion guide*

Obr. 5: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnící se teplotě ve zdroji

Obr. 6: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnící se teplotě desolvatačního plynu

Obr. 7: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se průtoku plynu mezi *sampling* a *extraction cone*

Obr. 8: Intenzity iontu m/z 475 a m/z 489 při měnícím se průtoku desolvatačního plynu

Obr. 9: Rekonstruované iontové chromatogramy pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce MCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm

Obr. 10: Rekonstruované spektra pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce MCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm

Obr. 11: Rekonstruované iontové chromatogramy pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce LC-SCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm

Obr. 12: Rekonstruované spektra pro sildenafil (nahoře) a vardenafil (dole) po extrakci na kolonce LC-SCX, 10 ng/ml, šířka okna m/z 50 ppm

Obr. 13: Kalibrační závislost vardenafilu a sildenafilu (metodou vnějšího standardu)

Obr. 14: Kalibrační závislost vardenafilu se sildenafilem jako vnitřním standardem

SEZNAM TABULEK

Tab. I: Postup a použití rozpouštědel u jednotlivých kolonek

Tab. II: Optimální parametry iontového zdroje

Tab. III: Vliv extrahovaných složek matrice po extrakci sorbentem MCX na účinnost ionizace

Tab. IV: Návratnost extrakce vardenafilu a sildenafilu sorbentem MCX stanovená metodou vnějšího standardu

Tab. V: Návratnost extrakce vardenafilu sorbentem MCX stanovená metodou vnitřního standardu