

Štúdium lokálnych anestetík Časť: 187 Extrakcia 1-metyl-2-piperidínoetylosterov alkoxyfenylkarbámových kyselín z ľudskej plazmy polymérmi s odtlačkami molekúl a porovnanie s klasickou extrakciou tuhou fázou*

ČIŽMÁRIK J.², LACHOVÁ M.¹, LEHOTAY J.¹, SKAČÁNI I.¹

¹STU v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie

²Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej chémie

Došlo 23. března 2009/ Přijato 8. dubna 2009

SÚHRN

Štúdium lokálnych anestetík

Časť: 187 Extrakcia 1-metyl-2-piperidínoetylosterov alkoxyfenylkarbámových kyselín z ľudskej plazmy polymérmi s odtlačkami molekul a porovnanie s klasickou extrakciou tuhou fázou

Zosyntetizovali sa polyméry s odtlačkami molekul na extrakciu 1-metyl-2-piperidínoetylosterov 2-metoxifenylkarbámovej kyseliny, ktorá sa použila ako templát. Pri syntéze sa použili funkčné monoméry akrylamid a kyselina metakrylová. Pripravené polyméry sa testovali ako sorbenty na extrakciu tuhú fázou (MISPE). Študovala sa ich kapacita a selektivita k derivátom 1-metyl-2-piperidínoetylosterov alkoxyfenylkarbámových kyselín, ktoré sú lokálne anestetiká. Zároveň rovnakou metódou sa pripravili polyméry bez použitia templátu, čím sa mohli zistiť nešpecifické interakcie medzi sorbentom a skúmanými látkami. Polymér pripravený pomocou metakrylovej kyseliny sa použil na predkoncentráciu 1-metyl-2-piperidínoetylosteru 2-metoxifenylkarbámovej kyseliny z ľudskej plazmy, do ktorej sa pridala uvedená látka (1 µg v 1 ml plazmy).

Kľúčové slová: estery alkoxyfenylkarbámových kyselín – HPLC – sorbenty s odtlačkami molekul – extrakcia tuhú fázou

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 78–82

SUMMARY

Studies of local anesthetics

Part: 187 Extraction of 1-methyl-2-piperidinoethylesters of alkoxyphenylcarbamic acids from human plasma by imprinted polymers and its comparison with classic solid phase extraction

Molecularly imprinted polymers for 1-methyl-2-piperidinoethylester of 2-methoxyphenylcarbamic acid (template) have been synthesised. Acrylamide and methacrylic acids, respectively, were used as the functional monomers. Imprinted polymers were used as the sorbents for solid-phase extraction (MISPE). The capacity and selectivity of prepared imprinted polymers were investigated with the use of some derivatives of 1-methyl-2-piperidinoethylesters of alkoxyphenylcarbamic acids. The non-imprinted (blank) polymers were prepared by the same way without a template to study the non-specific interactions. The molecularly imprinted polymer prepared from methacrylic acid

*Časť: 186: Farm. Obzor 2009; 78.

Adresa pre korešpondenciu:

prof. RNDr. Jozef Čižmarík, PhD.
Katedra farmaceutickej chémie FaF UK
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: cizmarik@fpharm.uniba.sk

was used to preconcentrate 1-methyl-2-piperidinoethylester of 2-methoxyphenylcarbamic acid and its analogues from spiked human plasma (1 µg in 1 ml of plasma).

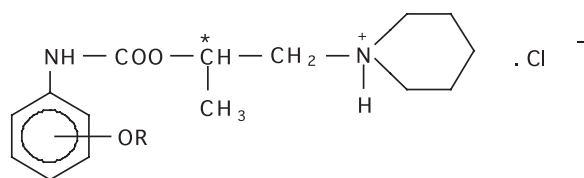
Key words: esters of alkoxyphenylcarbamic acids – HPLC – imprinted polymers – solid phase extraction

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 78–82

Má

Úvod

Alkoxysubstituované estery fenylylkarbámovej kyseliny patria do skupiny potenciálnych liečiv s lokálnymi anestetickými vlastnosťami ¹⁾. Niektoré z nich sa extrahovali z ľudskej plazmy, pričom na extrakciu sa použili polyméry s odtlačkami molekúl (MIP). Polyméry s odtlačkami molekúl patria medzi selektívne sorbenty, keďže na svojom povrchu obsahujú kavítu s totožnými rozmermi molekúl templátu ²⁾. Polyméry s odtlačkami molekúl sa môžu pripraviť rôznymi spôsobmi napríklad polymerizáciou ^{3,4)}, polymerizáciou v suspenzii ^{5,6)}, precipitačnou polymerizáciou ^{7,8)}, viac krokovou polymerizáciou ⁹⁾ atď. Polyméry s odtlačkami molekúl sú stabilné v rôznych rozpúšťadlách, sú termostabilné, môžu sa použiť v širokom rozsahu teplôt ¹⁰⁾. Môžu sa uskladiť v suchom stave pri laboratórnej teplote bez straty svojich špecifických vlastností.



Obr. 1. Štruktúra študovaných látok

Templát: R = -CH₃ v polohe 2 (2-MPCA). Ďalšie študované látky: R = -CH₃ v polohe 4 (4-MPCA), R = -C₁₀H₂₁ v polohe 2 (2-DPCA) a R = -C₁₀H₂₁ v polohe 4 (4-DPCA)

V predkladanej práci sa opisuje príprava polymérov s odtlačkami molekúl polymerizačnou metódou, výsledný monolit sa rozdrvil na definované mikročastice, ktoré sa použili ako sorbenty v kolónovom systéme.

Polyméry bez odtlačkov molekúl (NIP) sa pripravili rovnakým spôsobom, bez použitia templátu a použili sa na porovnanie vlastností s polymérmi s odtlačkami molekúl. Rozdiel medzi sorpčnými vlastnosťami MIP a NIP (napríklad v sorpčných kapacitách) potom indikujú vplyv kavit, ktoré boli spôsobené templátom, ktorý sa pridal do polymerizačnej zmesi pri príprave MIP. Ak MIP bola pripravená správne, kavítu majú požadované rozmery, potom interakcia medzi MIP a molekulami látky, ktorá sa použila ako templát bude väčšia, nakoľko bude k dispozícii viac sorpčných centier a sterických interakcií, ako v prípade NIP ¹¹⁾.

Prezentovaná skupina derivátov alkoxyfenylkarbámovej kyseliny zahŕňa 30 derivátov s rôznymi alkoxy skupinami od metoxy do decyloxy skupinu v rozdielnych polohách na benzénovom jadre. Teoretické štúdie fyzikálnych, chemických, farmakologických a chromatogra-

fických vlastností a biologické aktivity uvedených derivátov sa uvádzajú vo viacerých prácach ^{1, 12, 13)}.

Cieľom predkladanej práce je zistiť sorpčné vlastnosti polymérov s odtlačkami molekúl, keď sa použije templát s krátkou alkoxy skupinou (obr. 1). Vyhodnotí sa sorpčná kapacita a selektivita pripravených sorbentov MIP, ako templát sa použije 1-metyl-2-piperidinoethyl ester 2-metoxifenylkarbámovej kyseliny. Na základe sorpčnej kapacity látok s podobou chemickou štruktúrou (rozdielna dĺžka a poloha alkoxy skupiny in 1-metyl-2-piperidinoethyl esteru alkoxyfenylkarbámovej kyseliny) sa zistí selektivita pripravených polymérov. Polyméry s odtlačkami molekúl sa potom použijú na extrakciu a predkoncentráciu niektorých derivátov fenylylkarbámovej kyseliny z ľudskeho séra. Na porovnanie selektivity extrakcie na polyméroch s odtlačkami molekúl sa použije klasická extrakcia tuhú fázou typu C18.

POKUSNÁ ČASŤ

Chemikálie

1-metyl-2-piperidinoethyl estery alkoxyfenylkarbámovej kyseliny sa zosyntetizovali na Katedre farmaceutickej chémie, Farmaceutickej fakulty, UK v Bratislave podľa vypracovaného postupu ¹⁾. Acetonitril, metanol, metakrylová kyselina a dietylamin boli dodané fy. Merck, akrylamid, azobisisobutyronitril (AIBN) a etylenglykoldimetakrylát (EGDMA) sa získala od fy. Fluka, a kyselina octová sa získala od firmy Lachema. SPE kolónky Sep-Pak C18 boli dodané firmy Waters.

HPLC analýza

V práci sa použil HP 1100 systém (Hewlett-Packard, Germany), ktorý obsahoval vysokotlakové čerpadlo s odplynovačom, spektrofotometrický detektor s diódovým poľom (DAD), trojcestný dávkovací ventil na 50 µl a HP počítač vybavený softvérom "ChemStation" na vyhodnotenie analýz. Použila sa analytická kolóna Separon SGX C18 (125 × 4 mm, 7 µm) (Watex, USA), chromatografická separácia sa uskutočnila pri laboratórnej teplote. Mobilnou fázou bola zmes metanolu, acetonitrilu, kyseliny octovej a dietylaminu v objemových pomeroch 80 : 20 : 0.1 : 0.1, v/v/v/v, prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml/min. Detekcia sa robila v rozsahu vlnových dĺžok od 190 do 400 nm a chromatografické záznamy sa vyhodnocovali pri vlnovej dĺžke 240 nm.

Príprava polymérov

Polyméry s odtlačkami molekúl sa pripravili metódou podľa Zhanga a spolupracovníkov¹⁴⁾. Zosyntetizovali sa dva polyméry na báze akrylamidu (MIP1) a metakrylovej kyseliny (MIP2), ktoré sa použili pri syntéze ako funkčné monoméry. Do reakčnej banky sa pridal monomér (1,8 mmol), templát 1-metyl-2-piperidinoylester 2-metoxifynylkarbámovej kyseliny (0,3 mmol) a porogén acetonitril (3 ml). Potom sa pridal EGDMA (9 mmol) a iniciátor polymerácie AIBN (9 mg). Polymerácia sa uskutočnila pri 60 °C na vodnom kúpeli počas 24 hodín. Po vysušení a rozomletí polyméru sa polymér preosial cez sito s otvormi 40 µm, veľmi malé častice sa odstránili flotáciou v acetóne a konečný produkt sa vysušil vo vákuu pri teplote 60 °C, čas sušenia bol 1 hodina. Templát z povrchu častíc polyméru sa odstránil Soxhletovým extrakčným zariadením, extrakcia sa uskutočnila zmesou metanolu a kyseliny octovej (9:1, v/v) objemom 70 ml až dovtedy, kým v extrakte sa už nenachádzal templát. Rovnaký postup sa použil aj na prípravu kontrolného polyméru bez odtlačkou molekúl templátu (NIP) s tým rozdielom, že pri polymerácii sa nepridával templát do polymerizačnej zmesi.

Zhodnotenie sorpčných vlastností MIP a NIP

Na naplnenie malej kolónky (objem 3 ml) z polypropylénu sa použilo 100 mg polyméru. Sorpčná kapacita kolónky sa merala v metanole, acetonitrile a vo vode. Pred nadávkovaním roztoku esteru 4-metoxifynylkarbámovej kyseliny (2-MPCA), ktorý sa použil ako templát pri príprave polyméru, sa polymér v kolóne premyl 5 ml metanolu a potom sa nadávkoval roztok 2-MPCA (alebo inej látky, pre ktorú sa zisťovala kapacita kolónky).

Pracovný postup pri extrakcii

Do polypropylénovej kolóny sa dalo 100 mg polymérov MIP2 alebo NIP2. Na porovnanie selektivity extrakcie sa použila C18 kolónka pre extrakciu tuhú fázou (SPE). Kolónky sa najprv premyli 5 ml metanolu potom 5 ml acetonitrilu a nakoniec 5 ml vody. Potom sa do každej kolónky nadávkovalo 5 ml ľudskej plazmy s prídavkom štandardu. Koncentrácia študovaných analytov (2-MPCA, 4-MPCA, 2-DPCA a 4-DPCA) v plazme bola 1 µg/ml. Potom sa kolónky premyli 2 ml vody a vysušili sa. Suchý sorbent v kolónke sa premyl 1 ml acetonitrilu a a opäť sa vysušil. Analyty sa desorbovali z kolónky 2 ml zmesi metanol-kyselina octová (95 : 5, v/v). Eluát sa vákuovo odparil do sucha a rozpustil sa v 0,5 ml metanolu. Týmto postupom pridané analyty do séra sa môžu skoncentrovať 10×, čím sa zníži hodnota medze stanovenia tiež 10×. Extrakty sa prefiltrovali nylónovým mikrofiltrom (0,45 µm) a dávkovali sa do chromatografickej kolóny.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Sorpčná kapacita pripravených polymérov

Sorpčná kapacita kolón naplnených MIP sa merala v rôznych rozpúšťadlách: v metanole, v acetonitrile a vo vode. Pred použitím sa kolónky prepláchli metanolom a potom sa dávkoval roztok analytu. Rovnaký postup sa použil aj pre kolónky naplnené s NIP. Sorpčné kapacity jednotlivých kolóniek pre templát sú uvedené v tabuľke 1. Špecifická sorpčná kapacita sa vypočítala z rozdielu sorpčných kapacít MIP a príslušného NIP.

Tab 1. Sorpčné kapacity pripravených polymérov pre 2-MPCA (templát) v rôznych rozpúšťadlách (RSD = ± 5–14 %, n = 3)

rozpúšťadlo	Sorpčná kapacita (µg 2-MPCA/100 mg polyméru)					
	MIP1	NIP1	SBC*	MIP2	NIP2	SBC*
acetonitril	0,6	0,6	0	164	11,0	153
metanol	0,5	0,5	0	29,6	8,5	21,1
voda	> 200	> 200		> 200	> 200	

*Špecifická sorpčná kapacita sa vypočítala odčítaním množstva látky sorbovaného na NIP od množstva látky sorbovaného na MIP.

2-MPCA sa postupne dávkoval do kolónky dovtedy, kým v eluáte sa nezistila prítomnosť 2-MPCA, čo indikovalo, že polymér už nie je schopný sorbovať ďalšie množstvo. Eluát sa zachytával vo forme 1 ml frakcií a každá frakcia sa analyzovala metódou HPLC. Koncentrácia 2-MPCA v acetonitrile a metanole bola 20 µg/ml.

Rovnakým spôsobom ako v prípade templátu sa zisťovala sorpčná kapacita kolóny pre štruktúrne podobné látky – ester 2-decyloxyfenylkarbámovej kyseliny (2-DPCA) a 4-metoxifynylkarbámovej kyseliny (4-MPCA). Koncentrácia roztokov 4-MPCA a 2-DPCA bola 20 µg/ml.

Z tabuľky 1 je zrejmé, že najlepšia špecifická sorpčná kapacita pre 2-MPCA (templát) sa dosiahla v prípade MIP2 v acetonitrile, ktorý sa použil ako porogén pri polymerizácii. Kavity v polymére sa vytvárali v prostredí acetonitrilu a ich rozmery súvisia s rozmermi solvatovaných molekúl 2-MPCA práve v tomto prostredí. Možno predpokladať, že z tohto dôvodu sa dosiahla najvyššia špecifická sorpcia v acetonitrile. V prostredí metanolu je hodnota špecifickej sorpcie oveľa menšia, nakoľko solvatacia molekúl v tomto rozpúšťadle je iná a tým i rozmery solvatovaných molekúl budú rozdielne. Vysoká sorpčná kapacita 2-MPCA na MIP2 vo vodnom prostredí indikuje mož-

nosť aj iných sorpčných mechanizmov, ktoré nie sú špecifické. V prípade MIP1 sa nedosiahla žiadna špecifická sorpcia 2-MPCA čo naznačuje, že i zloženie polyméru má podstatný vplyv na sorpčné mechanizmy. Podobne ako v predchádzajúcom prípade sa dosiahla vysoká sorpčná kapacita vo vode (ale nie špecifická), čo umožňuje použiť vodu ako extrakčné médium a následnou sorpciou na uvedených polyméroch zachytiť skúmané analyty, ktoré potom možno vymyť z kolónky metanolom.

Selektivita MIP

V ďalšej časti práce sa sledovala len selektivita MIP2, ktorá sa testovala pomocou dvoch štruktúrne podobných látok zo skupiny esterov alkoxyfenylkarbámových kyselín s rozdielnou dĺžkou reťazca a polohou alkoxy skupiny na benzénovom jadre. Vplyv dĺžky alkoxy skupiny na selektivitu MIP2 sa skúmal na základe špecifickej sorpčnej kapacity 1-metyl-2-piperidínoylesteru 2-decyloxyfenylkarbámovej kyseliny (2-DPCA). Vplyv polohy alkoxy skupiny sa sledoval skúmaním sorpčných vlastností 1-metyl-2-piperidínoylesteru 4-metoxifenylkarbámovej kyseliny (4-MPCA). Polymér MIP2 sa najprv premyl metanolom a acetonitrilom a potom sa postupne dávkoval roztok skúmaného analytu do kolónky. Sorpčná kapacita MIP2 sa porovnávala so sorpčnou kapacitou NIP2, aby sa zistila špecifická sorpčná kapacita pre skúmané analyty. Výsledky meraní sa uvádzajú v tabuľke 2.

Výsledky uvedené v tabuľke 2 dokumentujú najväčšiu

Tab. 2. Sorpčné kapacity pripravených polymérov pre dané látky v acetonitrile (RSD = $\pm 4-10\%$, $n = 3$)

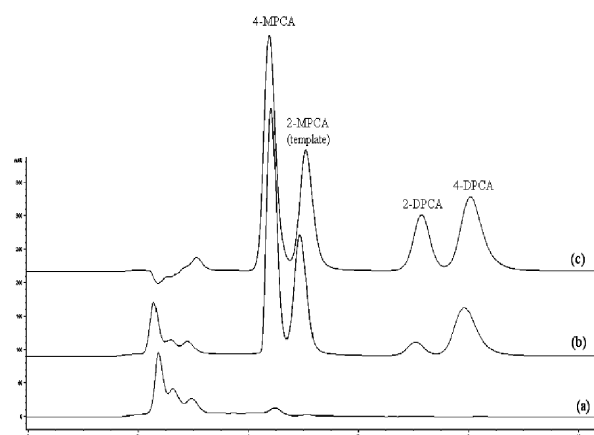
analyt	Sorpčná kapacita (μg analytu/100 mg polyméru)		
	MIP2	NIP2	SBC*
2-MPCA (templát)	164	11,0	153
4-MPCA	158	11,5	146
2-DPCA	121	10,8	110

*Špecifická sorpčná kapacita sa vypočítala odčítaním množstva látky sorbovaného na NIP od množstva látky sorbovaného na MIP.

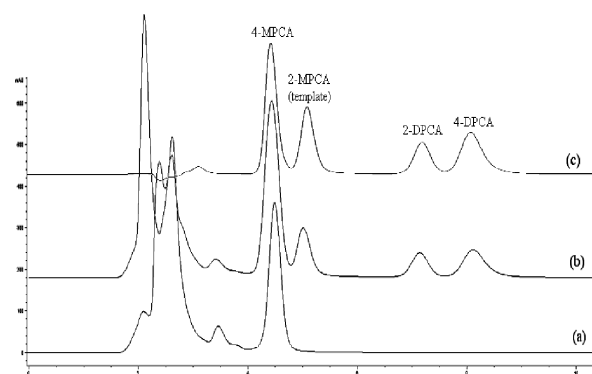
sorpčnú kapacitu pre 2-MPCA, čo sa očakávalo, nakoľko táto látka sa použila ako templát pri príprave MIP2. Hodnota špecifickej sorpčnej kapacity pre 4-MPCA bola približne rovnaká ako pre templát. Tieto látky sú veľmi štruktúrne podobné, rozdiel je len v polohe alkoxy skupiny na benzénovom jadre. Na druhej strane hodnota špecifickej sorpčnej kapacity bola menšia pre 2-DPCA ako pre 2-MPCA, čo je zrejme spôsobené dĺžkou alkoxy skupiny na benzénovom jadre. Z uvedeného vyplýva, že sorpčná kapacita súvisí viacej s rozmermi alkoxy skupiny (metoxy skupina je oveľa kratšia ako decyloxy skupina) ako s jej polohou, čo dokazuje dôležitosť predovšetkým sterických interakcií.

Analýza vzorky ľudskej plazmy

Do vzorky ľudskej plazmy sa pridali 2-MPCA, 4-MPCA, 2-DPCA a 4-DPCA, koncentrácia každej lát-

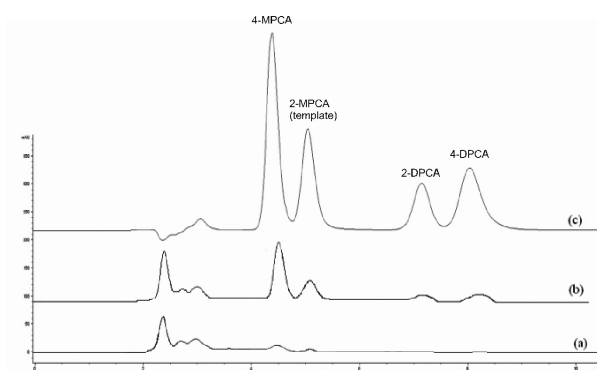


Obr. 2. Chromatografické záznamy vzorky ľudskej plazmy bez pridania študovaných látok po SPE na MIP2 (a), vzorky ľudskej plazmy po pridání študovaných látok ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) po SPE na MIP2 (b), zmes štandardov (metanolickej roztok, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ každého analytu) (c)
Kolóna: Separon SGX C18. Mobilná fáza: metanol / acetonitril / kyselina octová / dietylamin ($80/20/0.1/0.1$, v/v/v/v), izokratická elúcia. Prietok $0,5\text{ ml/min}$. Detekcia DAD, 240 nm . Dávkovaný objem $50\text{ }\mu\text{l}$.



Obr. 3. Chromatografické záznamy vzorky ľudskej plazmy bez pridania študovaných látok po SPE na sorbente typu C18 (a), vzorky ľudskej plazmy po pridání študovaných látok ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) po SPE na MIP2 (b), zmes štandardov (metanolickej roztok, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ každého analytu) (c)
Kolóna: Separon SGX C18. Mobilná fáza: metanol / acetonitril / kyselina octová / dietylamin ($80/20/0.1/0.1$, v/v/v/v), izokratická elúcia. Prietok $0,5\text{ ml/min}$. Detekcia DAD, 240 nm . Dávkovaný objem $50\text{ }\mu\text{l}$.

ky v plazme bola $1\text{ }\mu\text{g/ml}$. Na prípravu vzorky k analýze sa pripravili kolónky C18, MIP2 a NIP2, čo umožnilo porovnanie špecifickej sorpcie uvedených látok v rôznych kolónkach. Kolónka typu C18 patrí medzi najbežnejšie kolónky používané na predkoncentráciu a odstraňovanie možných interferujúcich látok pri chromatografickej separácii, nevýhodou tejto predkolónky je malá selektivita. Kolónky sa najprv premyli metanolom, acetonitrilom a vodou, potom sa nadávkovala vzorka ľudskej plazmy. Po nadávkovaní vzorky sa premyli kolónky deionizovanou vodou, a sorbované látky sa vytiesnili zmesou $0,5\text{ ml}$ metanolu a kyseliny octovej



Obr. 4. Chromatografické záznamy vzorky ľudskej plazmy bez pridania študovaných látok po SPE na NIP2 (a), vzorky ľudskej plazmy po pridani študovaných látok (1 µg/ml) po SPE na MIP2 (b), zmes štandardov (metanolicný roztok, 10 µg/ml každého analytu) (c)

Kolóna: Separon SGX C18. Mobilná fáza: metanol/acetónitril/kyselina octová/dietylamin (80/20/0.1/0.1, v/v/v/v), izokratická elúcia. Prietok 0,5 ml/min. Detekcia DAD, 240 nm. Dávkovaný objem 50 µl.

(95 : 5, v/v). Eluát sa vákuovo odparil do sucha, odparok sa rozpustil v 0,5 ml metanolu a roztok sa dávkoval do chromatografickej kolóny typu C18. Chromatografické záznamy vzoriek ľudskej plazmy bez prídavku a s prídavkom skúmaných látok použitím kolóniek C18, MIP2 a NIP2 sa uvádzajú na obrázkoch 2, 3 a 4. Účinnosť extrakcie uvedených látok zo vzorky ľudskej plazmy pre každú kolónku sa uvádzajú v percentách v tabuľke 3.

Tab. 3. Účinnosť extrakcie daných látok zo vzorky ľudskej plazmy pomocou pripravených polymérov v % (RSD = ± 5–8 %)

	Analyt			
	2-MPCA (templát)	4-MPCA	2-DPCA	4-DPCA
MIP2	97,1	94,7	27,6	75,4
C18	77,0	*	68,7	71,4
NIP2	17,7	20,9	10,0	10,1

* interferencia s neznámou látkou z plazmy

Z porovnania jednotlivých chromatografických záznamov vyplýva, že najlepšie sú odstránené interferujúce zložky pri použití kolónky MIP2. Na chromatografickom zázname vzorky ľudskej plazmy po použití SPE C18 (obr. 3a) je vidieť interferujúci pík neznámej látky, s rovnakým elučným časom ako 4-MPCA, čo dokumentuje, že táto látka pri použití C18 kolónky nemôže sa stanoviť. V prípade použitia kolónky MIP2 (obr. 2a) nedochádza k interferencii neznámej látky s 4-MPCA nakoľko táto látka je odstránená. Ak sa použije kolónka NIP2, účin-

nosť extrakcie je nižšia ako pri MIP2 i keď nedochádza k interferencii neznámej látky s 4-MPCA (obr. 4).

Účinnosť extrakcie templátu (2-MPCA) u štruktúrne podobnej látky 4-MPCA (rozdiel je len v polohe metoxy skupiny) pomocou MIP2 je viac ako 90 %. Účinnosť extrakcie pre látky s decyloxy skupinou (2-DPCA a 4-DPCA) je nižšia, čo je zrejme spôsobené väčším objemom molekúl. Porovnanie účinnosti extrakcie jednotlivých kolóniek jednoznačne dokumentuje, že najlepšia účinnosť sa dosiahla na sorbente MIP2 (tab. 3).

Imprintované polyméry s odtlačkami molekúl sa môžu úspešne použiť na selektívnu extrakciu tuhú fázou. Selektivita a kapacita závisí od výberu funkčného monoméru, porogénu (rozpušťač, v ktorom sa uskutočňuje polymerácia) a templátu (spravidla analyt, ktorý sa stanovuje vo vzorke). Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že rozhodujúcim interakčným mechanizmom boli sterické efekty, čo sa potvrdilo závislosťou špecifickej sorpčnej kapacity od objemu molekúl. Imprintované polyméry s odtlačkami molekúl možno úspešne použiť na selektívnu extrakciu tuhú fázou látok z biologických vzoriek, čo je v porovnaní s klasickou extrakciou na tuhej fáze typu C18 oveľa výhodnejšie.

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore Grantovej agentúry Slovenskej republiky (grant 1/0058/08), APVV projekt No. 20-035-205 a VEGA projekt č.1/4291/07.

LITERATÚRA

1. Pokorná, M., Čižmárik, J., Sedlárová, E., Račanská, E.: Čes. a slov. Farm., 1999; 45, 80–86.
2. Caro, E., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D. C.: Trac – Trends Anal. Chem, 2006; 25, 143–154.
3. Sun, Z., Schüssler, W., Sengl, M., Niessner, R., Knopp, D.: Anal. Chim. Acta, 2008; 620, 73–81.
4. Yavuz, H., Karakoc, V., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A.: Int. J. Biol. Macromol., 2007; 41, 8–15.
5. Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R., Zhang, D.: J. Chromatogr. B., 2007; 850, 24–30.
6. Pérez-Moral, N., Mayes, A.G.: Biosens. Bioelectron., 2006; 21, 1798–1803.
7. Tasselli, F., Donato, L., Drioli, E. J.: J. Membr. Sci., 2008; 320, 167–172.
8. Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J. L.: J. Chromatogr. A., 2007; 1172, 97–104.
9. Haginaka, J., Tabo, H., Kagawa, C.: J. Pharm. Biomed. Analysis, 2008; 46, 877–881.
10. Fischer, L., Muller, R., Ekberg, B., Mosbach, K.: J. Am. Chem. Soc., 1991; 113, 9358–9360.
11. Pichon, V.: J. Chromatogr. A., 2007; 1152, 41–53.
12. Ďungelová, J., Lehotay, J., Hroboňová, K., Čižmárik, J., Armstrong, D. W.: J. Liq. Chromatogr., 2002; 25, 299–312.
13. Rojkovičová, T., Hroboňová, K., Lehotay, J., Čižmárik, J.: Farmazie, 2003; 58, 108–110.
14. Zhang, T., Liu, F., Chen, W., Wang, J., Li, K.: Anal. Chim. Acta., 2001; 450, 53–61.