

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

**Stanovení glukosaminu metodou kapilární zónové
elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí**

Za pomoc a konzultace při vypracování své diplomové práce velmi děkuji panu doc. RNDr. Miroslavovi Poláškoví, CSc., a panu Mgr. Pavlovi Jáčovi a dalším pracovníkům Katedry analytické chemie za jejich cenné rady a vstřícnost.

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně za použití literatury uvedené v seznamu.

Obsah

OBSAH	3
SEZNAM TABULEK	5
SEZNAM OBRÁZKŮ	6
SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	8
1.1 ÚVOD PRÁCE.....	9
1.2 CÍL PRÁCE.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 TEORIE ELEKTROMIGRAČNÍCH SEPARAČNÍCH METOD.....	12
2.2 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	16
2.3 MOŽNOSTI DETEKCE VYUŽÍVANÉ U CZE	18
2.4 GLUKOSAMIN.....	20
3. PRAKTICKÁ ČÁST	23
3.1 POUŽÍVANÉ PŘÍSTROJE.....	24
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	24
3.3 PROCEDURA ANALÝZY	24
3.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ A ELEKTROLYTŮ	25
3.5 OPTIMALIZACE METODY	25
3.6 OPTIMALIZACE SLOŽENÍ VNITŘNÍHO STANDARDU	26
3.7 STANOVENÍ LINEARITY A OPAKOVATELNOSTI METODY	26
3.8 STANOVENÍ OBSAHU GLUKOSAMINU V PŘÍPRAVCÍCH	27
3.9 MEZIDENNÍ PŘESNOST	28
3.10 URČENÍ LOD A LOQ.....	28
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1 OPTIMALIZACE METODY	30
4.2 STANOVENÍ LINEARITY A OPAKOVATELNOSTI.....	34
4.3 STANOVENÍ OBSAHU GLUKOSAMINU V PŘÍPRAVCÍCH.....	37
4.4 MEZIDENNÍ PŘESNOST	42

4.5 STANOVENÍ A OVĚŘENÍ LOD A LOQ.....	43
4.6 OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY REFERENČNÍ HPLC METODOU	44
5. ZÁVĚR	45
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
7. PŘÍLOHY	49
7.1 ELEKTROFOREOGRAMY	50
7.1 ABSTRAKTY	53

Seznam tabulek

Tabulka 1.:	Ředění zásobních roztoků pro stanovení linearitu	25
Tabulka 2.:	Závislost migračních časů na koncentraci BGE	30
Tabulka 3.:	Závislost migračních časů na pH BGE	31
Tabulka 4.:	Závislost migračních časů na napětí	32
Tabulka 5.:	Přesné koncentrace vzorků pro stanovení linearitu	35
Tabulka 6.:	Opakovatelnost metody pro 100 μ g/ml glukosamin a 15 μ g/ml K ⁺	36
Tabulka 7.:	Opakovatelnost metody pro 200 μ g/ml glukosamin a 45 μ g/ml K ⁺	37
Tabulka 8.:	Stanovení obsahu v přípravku A.....	38
Tabulka 9.:	Stanovení správnosti u přípravku A.....	38
Tabulka 10.:	Stanovení obsahu v přípravku B.....	39
Tabulka 11.:	Stanovení správnosti u přípravku B.....	39
Tabulka 12.:	Stanovení obsahu v přípravku C.....	40
Tabulka 13.:	Stanovení správnosti u přípravku C.....	40
Tabulka 14.:	Stanovení obsahu v přípravku D	41
Tabulka 15.:	Stanovení správnosti u přípravku D.....	41
Tabulka 16.:	Obsahy glukosaminu ve všech přípravcích	42
Tabulka 17.:	Mezidenní přesnost	43
Tabulka 18.:	RSD obsahu glukosaminu mezidenní přesnosti	43
Tabulka 19.:	LOD a LOQ.....	43

Seznam obrázků

Obr. 1.:	Schematické znázornění separace	12
Obr. 2.:	Znázornění stěny kapiláry, fixní a mobilní vrstvy	13
Obr. 3.:	Uspořádání elektroforetického systému	17
Obr. 4.:	Strukturní vzorec glukosaminu	20
Obr. 5.:	Závislost migračních časů na koncentraci BGE.....	31
Obr. 6.:	Závislost migračních časů na pH BGE.....	32
Obr. 7.:	Závislost migračních časů na napětí.....	33
Obr. 8.:	Závislost plochy píku na koncentraci glukosaminu	35
Obr. 9.:	Závislost plochy píku u na koncentraci K ⁺ iontů	36
Obr. 10.:	Elektroforeogram standardu za optimálních podmínek	50
Obr. 11.:	Elektroforeogram slepého vzorku za optimálních podmínek.....	50
Obr. 12.:	Elektroforeogram přípravku B.....	51
Obr. 13.:	Elektroforeogram přípravku C.....	51
Obr. 14.:	Elektroforeogram přípravku D.....	52

Seznam zkratk

BGE	základní elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
IS	vnitřní standard
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
RSD	relativní směrodatná odchylka

1. Úvod a cíl práce

1.1 Úvod práce

Vývojem farmaceutického průmyslu a značným nárůstem množství léčivých látek roste potřeba je analyzovat rychle, co nejpřesněji, co nejefektivněji, co nejlevněji.

Cílem správné výrobní praxe a farmaceutické péče je zajištění kvalitních účinných a bezpečných léčiv. K tomu je potřeba mít analytické metody, které budou schopny přesně stanovit kvantitu i kvalitu látek obsažených v analytu.

Kapilární elektroforéza je jedna z takových metod. V porovnání s HPLC má mnohem nižší spotřebu chemikálií a vzorku, bohužel za cenu nižší reprodukovatelnosti a při použití klasického UV detektoru i nižší citlivosti. Na druhou stranu je tato metoda velice efektivní pro chirální separace a stanovení drobných iontů.

1.2 Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout spolehlivou a rychlou metodu ke stanovení glukosaminu v různých lékových formách pomocí kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí.

Po optimalizaci a validaci metody bylo cílem určit obsah glukosaminu ve čtyřech různých přípravcích, z toho 3 registrované léčivé přípravky (tobolky a dělený prášek pro přípravu perorálního roztoku) a jeden potravní doplněk (potahované tablety).

2. Teoretická část

2.1 Teorie elektromigračních separačních metod

2.1.1 Úvod

Kapilární elektroforéza je elektromigrační metoda, která je založena na rozdílné rychlosti pohybu nabitých částic v kapalném elektrolytu (dále BGE) při působení elektrického proudu.

Již koncem 19. století byl popsán pohyb anorganických částic působením elektrického pole. První významný krok, který se podílel na vzniku elektroforézy jako metody učinil ve 30. letech 20. století švédský chemik Arne Tiselius, který elektroforeticky separoval proteiny kravího séra. Jeho technika je s malými změnami využívána dodnes.

V 60. letech byla objevena izotachoforéza, určená pro analýzu anorganických iontů.

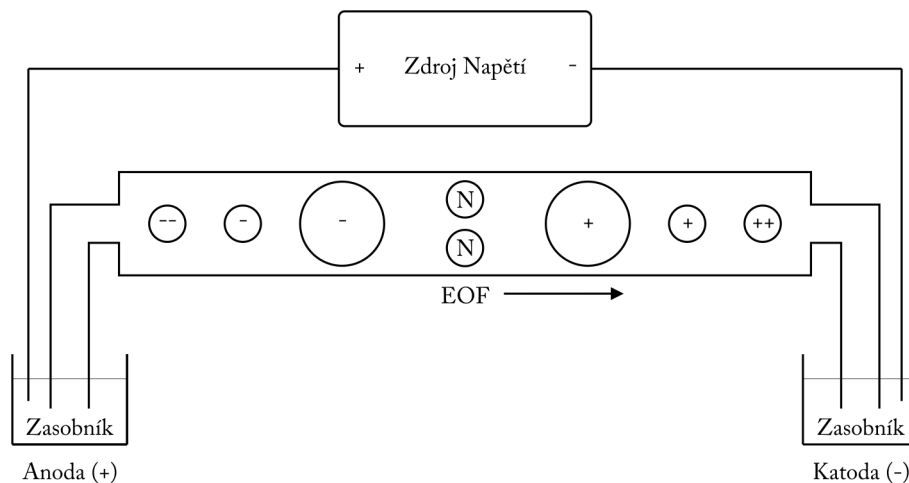
Kapilární zónová elektroforéza jako taková byla poprvé provedena v roce 1981 J.W.Jorgensonem a K.D.Lucascovou ve skleněné kapiláře o průměru $75\mu\text{m}^1$.

Nyní se slovem elektroforéza obecně označuje pohyb nabitých látek v nosiči působením elektrického pole. Základními typy elektroforézy jsou:

- Kapilární zónová elektroforéza
- Micelární elektrokinetická chromatografie
- Izotachoforéza
- Gelová elektroforéza

2.1.2 Rychlost elektroforetického pohybu

Působením elektrického pole v elektrolytu budou kationy budou migrovat směrem ke katodě, aniony směrem k anodě, přičemž rychlost jejich pohybu bude záviset na poměru náboj/hmotnost. Větší částice budou putovat pomaleji než malé stejného náboje, více nabitě částice budou migrovat rychleji než méně nabitě částice stejné velikosti.



Obr. 1.: Schematické znázornění separace

Rychlost elektroforetického pohybu je přímo úměrná elektroforetické pohyblivosti a intenzitě elektrického pole. Elektroforetická pohyblivost je závislá na náboji látky, viskozitě elektrolytu a velikosti molekuly. Tyto vztahy se dají popsat vzorcem

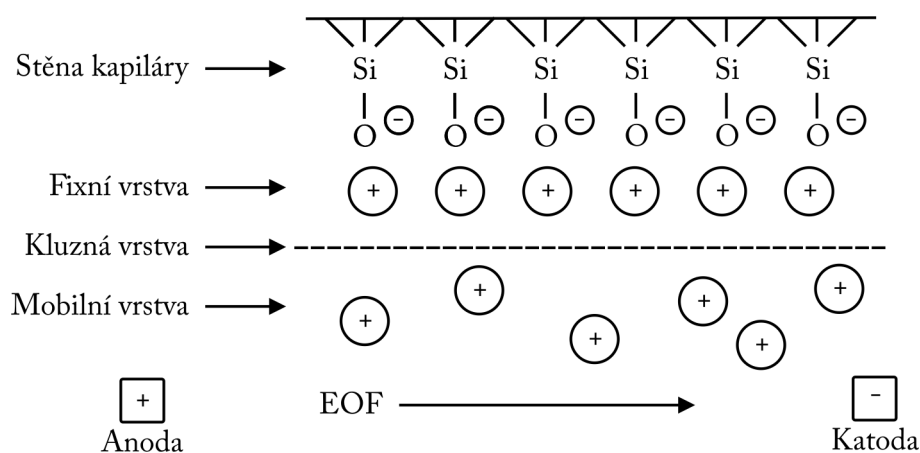
$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \cdot \left(\frac{V}{L} \right),$$

kde v_{ep} je rychlost elektroforetického pohybu, μ_{ep} elektroforetická pohyblivost, E intenzita elektrického pole, q efektivní náboj rozpuštěné látky, η viskozita roztoku elektrolytu, r veličina charakterizující velikost molekuly, V vložené napětí a L celková délka kapiláry².

2.1.3 Elektroosmotický tok

Stěna kapiláry je pokryta záporným nábojem, přesněji skupinami Si-O^- . Tahle ionizace se dá zesílit promytím kapiláry roztokem hydroxidu a až poté roztokem elektrolytu. Tyto skupiny přitahují kladně nabitě částice z elektrolytu a vytvoří tzv. fixní vrstvu. Druhá vrstva kationů, protože je od záporných nábojů vzdálenější, už není pevně vázána a vytváří mobilní vrstvu.

Po aplikaci elektrického pole je mobilní vrstva unášena směrem ke katodě a protože je solvatována elektrolytem, celý elektrolyt je takto unášen směrem ke katodě.



Obr. 2.: Znárodnění stěny kapiláry, fixní a mobilní vrstvy

Mezi těmito vrstvami vzniká nerovnováha vyjádřená zeta potenciálem ζ . Rychlost EOF je na základě ζ vyjádřena jako

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta}$$

kde ε je dielektrická konstanta elektrolytu, ζ zeta potenciál, η viskozita elektrolytu a E intenzita elektrického pole.³

Rychlost elektroosmotického toku je obvykle vyšší než rychlost pohybu negativně nabitých částic, což jinými slovy znamená, že i tyto částice budou unášeny směrem k detektoru. Neutrální částice mají elektrodoroforetickou rychlost nulovou, budou mít tedy rychlost EOF, kationy budou tokem urychlovány.

Názorně se tento jev dá přirovnat k řece se silným proudem a třem lodím. Anion bude loď, která se snaží plout proti proudu, ale její motor nestačí a bude proto unášena po proudu. Neutrální látka bude loď, která má vypnutý motor – rychlost jejího pohybu bude stejná jako rychlost toku řeky. Kationy představují třetí možnost – loď je unášena proudem řeky a ještě je poháněna motorem ve stejném směru, její rychlost bude tedy součtem těchto dvou rychlostí.

Základní výhodou existence EOF, která vyplývá z výše uvedeného, je současná možná analýza kationů, anionů a neutrálních látek. Neutrální látky sice nebudou separovány, nicméně tento problém řeší micelární elektrokinetická chromatografie.

2.1.4 Ovlivnění rychlosti EOF

Jak vyplývá ze vzorce uvedeného výše, rychlost EOF je možné ovlivnit několika různými způsoby – změnou velikosti aplikovaného napětí, pH elektrolytu, koncentrace elektrolytu a teploty.

Aplikované napětí

Jelikož intenzita elektrického pole E je definována jako podíl napětí/celková délka kapiláry, je velikost aplikovaného napětí velmi jednoduchý způsob jak změnit rychlost EOF. Zvýšením napětí se zvyšuje rychlost EOF, tudíž se zvednou i rychlosti migrace analytů a celková doba analýzy se zkrátí. Z tohoto by vyplývalo, že je logické používat co nejvyšší možné napětí. Bohužel, zvýšením napětí se úměrně zvyšuje i proud (z Ohmova zákona $I = U/R$, předpokládám že odpor zůstává konstantní) a tím se zvýší i produkce Joulova tepla.

Joulovo teplo potom způsobuje zahřívání elektrolytu, které způsobuje širší píky, nereprodukovatelnost migračních časů, změnu struktury termolabilních vzorků, v extrémních případech může dojít až k varu elektrolytu a přerušení kontinuity elektrického pole a pádu analytického systému.

pH elektrolytu

Změnou pH lze docílit významných změn v EOF z důvodu změny zeta potenciálu. U křemenných kapilár, které mají na povrchu Si-OH skupiny, s rostoucím pH EOF roste, protože roste ionizace těchto skupin do stavu Si-O⁻. Naopak při pH okolo hodnoty 2 už v křemenných kapilárách nedochází k EOF, protože všechny Si-O⁻ skupiny jsou protonizovány a nemůže tedy vzniknout fixní a mobilní vrstva, jak bylo popsáno výše.³

pH bude rovněž ovlivňovat ionizaci analytů a jejich elektroforetické mobility.

Koncentrace elektrolytu

S rostoucí koncentrací elektrolytu se bude snižovat zeta potenciál a tudíž rychlost EOF bude klesat. Nižší koncentrace BGE budou snižovat čas analýzy, ale u velmi nízkých koncentrací může dojít k asymetrii a rozšíření píků.

Koncentrace elektrolytu by měla být řádově vyšší než koncentrace analytu, protože z důvodu různé vodivosti analytu a elektrolytu by mohlo u nižších koncentrací elektrolytu docházet k nestabilitám elektrického pole. Taktéž při nižších koncentracích může docházet k adsorpci analytu na stěnu kapiláry.

Teplota

Zvýšením teploty dojde ke zvýšení rychlosti EOF, protože dojde ke snížení viskozity elektrolytu. Zvýšením teploty se taktéž ale sníží dielektrická konstanta a z rovnice určující rychlost EOF vyplývá, že změna viskozity a dielektrické konstanty jsou protichůdné jevy.

Změna viskozity je ale mnohem významnější a proto výsledný efekt zvýšení teploty znamená zvýšení rychlosti EOF.

2.1.5 Parametry separace

Parametry separace jsou migrační čas, účinnost, selektivita a rozlišení.³

Migrační čas

Migrační čas je definován jako čas, za který analyt migruje přes efektivní délku kapiláry l a dá se vyjádřit rovnicí: $t_m = l/v_{an}$, kde v_{an} je definována jako skutečná rychlost analytu, která se skládá z rychlosti EOF a z jeho vlastní rychlosti. Postupnou úpravou této rovnice lze vyjádřit migrační čas pomocí efektivní délky kapiláry l , celkové délky kapiláry L , elektroforetické mobility analytu μ_{an} , elektroosmotické mobility μ_{EOF} a vloženého napětí V jako

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{an} + \mu_{EOF}) \cdot V}$$

Z této rovnice vyplývá, že vyšší napětí, kratší kapilára a vyšší rychlost EOF znamená kratší migrační čas.

Účinnost

Efektivita je vyjádřena jako počet teoretických pater N a vyjadřuje se pomocí migračního času píku t_m a jeho šířky w měřené u základní linie podle rovnice

$$N = 16(t_m / w^2)$$

Jak je zřejmé, čím jsou užší píky a čím vyšší čas, tím je vyšší efektivita.

Selektivita

Selektivita je v CZE je definována jako vzdálenost mezi vrcholy přilehlých píků v elektroforeogramu a matematicky se dá vyjádřit jako

$$\alpha = \frac{t_2 - t_m}{t_1 - t_m}$$

kde α je selektivita, t_2 a t_1 jsou časy dvou píků a t_m je čas neutrálního markeru.

Nejúčinnější způsob jak změnit selektivitu je změna pH elektrolytu.

Rozlišení

Rozlišení je definováno pomocí migračních časů dvou píků a jejich šířek při základní čáře jako

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2}$$

a vyjadřuje, jak dobře jsou látky separovány.

2.2 Elektromigrační metody

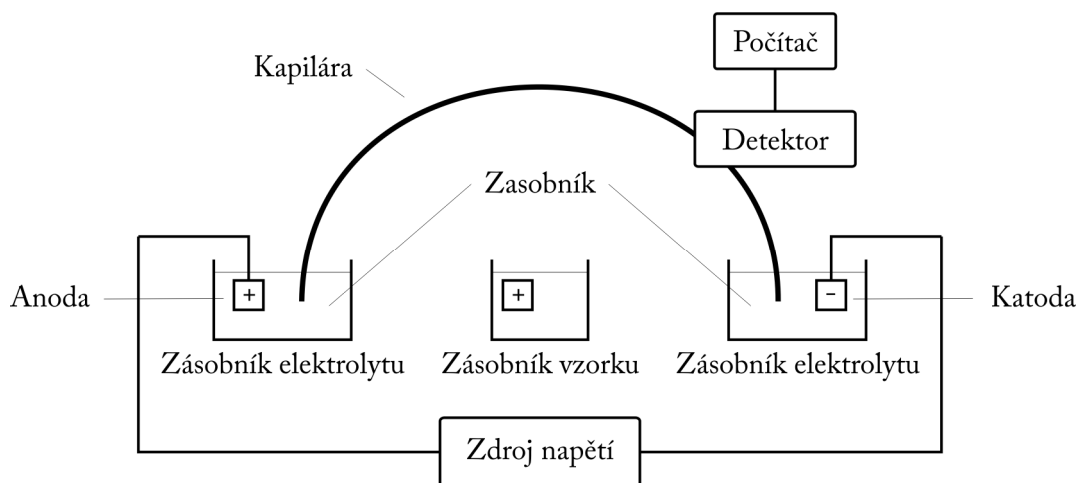
Jak bylo uvedeno výše, mezi základní elektromigrační metody patří kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie a izotachoforéza.

2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Tato metoda je „základní“ bez žádných přídavných fází, k separaci tedy dochází na základě rozdílu elektroforetických mobilit v pořadí kationy, neutrální látky, aniony v případě běžného uspořádání systému.

Analytický systém pro tuto metodu je společný pro micelární elektrokinetickou chromatografii. Skládá se z :

- kapiláry, která je potažena polymerem, který zabezpečuje její pružnost a odolnost
- zdroje stejnosměrného napětí s možností přepínat polaritu
- dvou nádobek pro elektrolyt udržovaných ve stejné výšce (při různých výškách dochází k efektu spojených nádob, čehož se využívá při injekci roztoku, ale při analýze je tento jev nežádoucí, viz dále),
- detektoru (různé způsoby detekce viz dále)
- termostatovaného prostoru schopného udržet konstantní teplotu kapiláry (teplota ovlivňuje viskozitu elektrolytu a tudíž i rychlost EOF a následně kvalitu a reprodukovatelnost separace)
- vhodného zapisovače, kterým dnes bývá nejčastěji počítač.



Obr. 3.: Uspořádání elektroforetického systému

Schematické zařízení analyzátoru je znázorněno obrázku 3.

Způsoby dávkování vzorku

Dávkování roztoku se provádí dvěma způsoby – hydrodynamicky a elektrokineticky (působením elektrického pole), přičemž hydrodynamické dávkování lze provést dvěma způsoby (využitím systému spojených nádob nebo aplikací tlaku na nádobku se vzorkem).³

U běžně používaného tlakového systému dávkování lze množství roztoku, které se vpraví do kapiláry tímto způsobem vyjádřit jako

$$P \cdot t = \frac{x \cdot 3200 \cdot \eta \cdot L}{d^2}$$

kde P je tlak při nástřiku v milibarech, t je doba nástřiku v sekundách, x délka zóny v mm, η je viskozita BGE (přibližně 1), L je celková délka kapiláry v cm a d je vnitřní průměr kapiláry v μm .⁴

Z tohoto vzorce je zřejmé, že je-li konstantí součin *tlak krát čas*, bude množství injektovaného roztoku stejné.

2.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie

Systém pro tuto metodu je stejný a skládá se ze stejných součástí jako systém pro kapilární zónovou elektroforézu.

Jediný rozdíl je ve složení elektrolytu. U MEKC je do elektrolytu přidán tenzid v koncentraci vyšší než jeho kritická micelární koncentrace. V elektrolytu vznikne nová pseudostacionární fáze, ve které se látky dělí na základě hydrofilicity a lipofility.

Při klasickém uspořádání, tedy katoda na výstupním konci, jsou micely na povrchu záporně nabitě a jako velmi rozměrné částice s velkým množstvím náboje budou velmi silně přitahovány k anodě, ale budou urychlovány elektroosmotickým tokem směrem k detektoru.

Částice analytu při analýze jsou přitahovány ke katodě či anodě dle svého náboje a zároveň vstupují do micel na základě své lipofility.

Tímto způsobem lze velmi pohodlně stanovit současně nabité i nenabitě částice.

2.2.3 Izotachoforéza

U této metody, na rozdíl od CZE, probíhá separace v nespojitém elektrolytu. Vzorek je umístěn mezi kvalitativně odlišné elektrolyty – vedoucí a koncový.

Mobility elektrolytů musí být zvoleny tak, aby mobilita vedoucího byla větší než mobility všech analytů a tyto musí být větší než mobilita koncového elektrolytu.

Nevýhodou ITP je, že v rámci jedné analýzy může být provedena pouze analýza kationů nebo anionů.

Separace probíhá ve dvou krocích. V prvním dochází k dělení analytu podle mobilit a migrační rychlosti jednotlivých složek jsou různé. V druhém kroku se celý systém posouvá konstantní rychlostí směrem k detektoru.

Velmi výhodnou vlastností ITP je zaostřovací a zakoncovací efekt, který se využívá v kombinaci metod, např. ITP-CZE.

2.3 Možnosti detekce využívané u CZE

2.3.1 UV detekce

UV detekce probíhá na základě Lambert-Beerova zákona o absorpční:

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

kde ε je molární absorpční koeficient, který charakterizuje danou látku, c je koncentrace látky, l délka absorpční vrstvy.

Tento zákon určuje, že absorbance je funkcí koncentrace při použití monochromatického světla.

Zákon platí pouze v případě, je-li přítomna pouze jedna složka absorbující při určité vlnové délce, při přítomnosti více složek je výsledná absorbance rovna sumě absorpčních jednotlivých složek.⁵

U CZE je nevýhodou při UV detekci nedostatečná citlivost způsobená velmi kátkou absorpční dráhou.

Detekci je možno provádět dvěma různými způsoby:

Detekce přímá

Tento způsob je využitelný u analytů, které při průchodu UV světla absorbují. Přístroj kontinuálně snímá po celou dobu analýzy buď jednu nebo více vlnových délek a zapisuje do

elektroforeogramu závislost absorbance na čase. Při snímání více vlnových délek je výstupem pro každou jednotlivou vlnovou délku jeden elektroforeogram.

Detekce nepřímá

Na rozdíl od předchozího způsobu je tento využitelný u látek, které neabsorbují v UV oblasti. Elektrolyt obsahuje látku, která absorbuje a při průchodu analytu detekčním okénkem dojde k naředění elektrolytu a absorbance se sníží.

Tuto metodu využil např. Galceran M. T., Carneiro M. C., Diez M. a Puignou L. pro analýzu herbicidů bez chromoforu v prostředí UV-absorbujícího elektrolytu⁶.

2.3.2 Bezkontaktní vodivostní detekce

Vodivost je definována jako podíl proudu a napětí $G = I/U$, resp. $I = G \times U$. Ze vztahu vyplývá, že bude-li napětí vložené konstantní, tak měřením proudu můžeme zjistit změny vodivosti.

První vodivostní detektory byly úspěšně testovány již v 70. letech jako kontaktní, tzn. že elektrody byly v přímém kontaktu s elektrolytem⁷. Nevýhodou byl fakt, že často docházelo k elektrochemickým interakcím mezi elektrodami a elektrolytem případně analytem, což způsobovalo nereprodukovatelnosti.

Bezkontaktní vodivostní detektor, dále jen CCD, na rozdíl od předchozího typu, nemá elektrody v přímém kontaktu s analyzovaným materiálem. Elektrody byly při vývoji vyrobeny z různých materiálů (chirurgické jehly, cívky měděných drátů, z laku obsahujícího stříbro), ale uspořádání bylo vždy víceméně podobné. Dvě elektrody určité délky, mezi nimiž je meze-
ra, která vytváří detekční celou.

Princip měření je velmi jednoduchý a vychází z definice uvedené výše. Na excitační elektrodu je připojen střídavý proud, který protéká detekční celou a je snímán na druhé elektrodě. Dále je veden do zesilovače a měřen. Změnou obsahu detekční cely dochází ke změně její vodivosti, což se projeví změnou měřeného proudu⁸.

Mezi hlavní výhody tohoto druhu detekce patří vysoká citlivost v porovnání s UV/VIS detektorem. Příjemná výhoda pro práci je fakt, že není nutné vypalovat detekční okénko.

Aplikace CCD je velmi oblíbená pro látky, které nemají chromofor a mají vodivost odlišnou od elektrolytu. Analýza je možná jak v přímém režimu (tzn. analyt má vyšší vodivost než elektrolyt a změna se projeví pozitivním píkem), nebo nepřímém (přesně obráceně).

O vysoké popularitě svědčí rovněž fakt, že během let 1998 až 2004 bylo publikováno více než 60 prací s využitím bezkontaktní vodivostní detekce.⁸

2.3.3 Jiné způsoby detekce

Dalším způsobem detekce využívaným v CZE je laserem indukovaná fluorescence. Tato detekční metoda patří u CZE k nejcitlivějším způsobům detekce vůbec. Nevýhodou této metody je skutečnost, že ne všechny molekuly mají schopnost fluorescence a proto je nutné je derivatizovat, pokud je to možné.

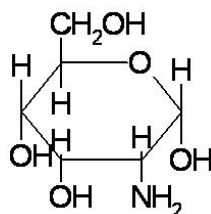
Fluorescenční detekci je možné využít podobně jako UV-detekci v přímém režimu (snímá se intenzita záření, kterou vysílá molekula analytu po ozáření laserem), nebo nepřímém (v elektrolytu je obsažena látka, která vysílá záření a analyt se na elektroforeogramu objeví jako negativní pík).

Tento druh detekce využili např. Ryvolová M. a kolektiv.⁹

2.4 Glukosamin

2.4.1 Úvod

Glukosamin je relativně jednoduchá molekula odvozená od glukosy, 2-amino-2-deoxy-D-glukosa.



Obr. 4.: Strukturální vzorec glukosaminu

Je to tělu vlastní fyziologická látka bazického charakteru, která po zabudování do glukosaminglykanů tvoří základní složku kloubní chrupavky.

Jako standard ve formě soli hydrochloridu nebo sulfátu se vyskytuje ve formě bílého krystalického prášku, který je velmi dobře rozpustný ve vodě za vzniku čirého roztoku.

Je přítomen jako hlavní složka ve formě hydrochloridu v mnoha přípravcích typu léčiv (tzn. mající úhradu zdravotní pojišťovny a kód SÚKLu) ve formě sáčků pro přípravu perorálního roztoku, injekcí, tobolek a rovněž je velmi oblíbeným potravním doplňkem ať už samostatně, tak rovněž v kombinovaných přípravcích, např. s chondroitinem, kreatininem, vitamínovými komplexy apod.

2.4.2 Farmakologické vlastnosti

Glukosaminsulfát dle dělení do ATC skupin patří do skupiny M01AX05, což jsou nesteroidní antiflogistické a antirevmatické látky.¹⁰

Dávkování

Obvyklá denní dávka glukosaminu je 1500mg, která může být rozdělena do více menších dávek. Nástup účinků bývá zpravidla delší, ale přetrvává i po vysazení terapie. U osob mladších než 18 let se nedoporučuje přípravek užívat, protože nebyla sledována účinnost ani toxicita.

Kontraindikace, nežádoucí účinky

Kontraindikace jsou přítomny pouze při precitlivělosti na jiné látky v přípravku. U přípravků se často používá aspartam jako umělé sladidlo, proto není vhodné, aby jej užívali pacienti s fenolketonurií.

Na základě klinických studií byly nežádoucí účinky prokázány u maximálně 15% subjektů, byly přechodného typu a nebyly závažné. Jednalo se především diskomforty trávicího ústrojí, zácpa, nevolnost. U pacientů s alergickou reakcí se objevovala svědivá vyrážka. Velmi zřídka, méně než 0,1%, se objevovaly u pacientů bolesti hlavy, závratě a únava.

Farmakokinetika a farmakodynamika

Po intravenózním podání (testováno na psech a potkanech s radioaktivně značeným glukosaminem) mizí glukosamin velmi rychle z krve a vstřebává se do jater, ledvin a kloubní chrupavky. Po perorálním podání je glukosamin velmi rychle absorbován z trávicího traktu a je distribuován velmi podobně jako v případě i.v. aplikace.

Výsledky distribuce u lidí na základě prováděných studií byly velmi podobné s distribucí u zvířat. Biologická dostupnost glukosaminu je přibližně 26%, protože v důsledku vysokého first-pass efektu dochází k metabolizaci více než 70% glukosaminu v játrech.

Přímý mechanismus účinku glukosaminu nebyl zatím dostatečně prokázán. Vlivem degenerativních, traumatických a zánětlivých procesů dochází v těle k jeho nedostatku, což má za následek snížení tvorby polysacharidů, které jsou zodpovědné za stavbu kloubní chrupavky.

Studiemi bylo rovněž prokázáno, v porovnání s placebem, zpomalení postupu artrózy kolene.

2.4.3 Možnosti stanovení

Český lékopis² neuvádí glukosamin v seznamu monografií a tudíž neexistuje žádná lékopisná metoda na stanovení glukosaminu. Jediná zmínka je v sekci zkoumadel, protože se využívá jako porovnávací roztok pro analýzu hexosaminu v polysacharidových vakcínách.²

Americký lékopis¹¹ zahrnuje pracovní postup pro stanovení glukosaminu hydrochloridu jako čisté látky nebo v tabletách metodou využívající HPLC. Při této metodě je využita L7

kolona (odpovídá značení C8 reverzní fáze, velikost částic 1,7 až 10 μ m), způsob detekce pomocí UV při 195nm a jako mobilní fáze je použita směs fosfátového pufru o pH = 3 a acetonitrilu v poměru 3:2.

Glukosamin neobsahuje žádný chromofor, je tudíž velmi obtížná detekce pomocí UV přímé detekce. Přímá detekce je možná pouze po vzniku komplexů glukosaminu se silně bazickým borátovým pufrem při 190nm.¹²

Další možností detekce použil Skelley a kol.¹³ Při této metodě byl glukosamin derivatizován fluerescaminem a byly analyzovány oba izomery vznikající při mutarotaci při analýze trvající méně než 2 minuty.

Nepřímou detekci pro detekci aminosacharidů využil Soga a kol¹⁴. Jako BGE byla použita 2,6-pyridindikarboxylová kyselina. pH BGE bylo velmi vysoké, díky tomu byly sacharidy ionizované jako anionty a analýza probíhala při otočeném EOF. Pro plochy píků bylo dosaženo RSD ploch větší než 2,7%.

Mimo elektromigrační metody lze glukosamin stanovit pomocí HPLC. Tuto metodu použil Shao a kol.¹⁵ a na této metodě byla rovněž založena rovněž referenční metoda pro vyhodnocení správnosti navržené CE-CCD metody. Pro analýzu byl použit acetonitril:fosfát 3:1, pH = 7,5.

3. Praktická část

3.1 Používané přístroje

Pro analýzu byl použit elektroforetický systém PrinCE 650 (PrinCE Technologies B.V., Nizozemí), vybavený Lambda 1010 UV-VIS detektorem (Leonberg, Německo) a bezkontaktním vodivostním detektorem TraceDec® (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Rakousko). Analyzátor byl ovládán systémem WinPrinCE, který byl integrován v systému DAx (software pro získávání a analýzu dat). pH elektrolytů bylo měřeno pH-metrem PHM 220 (Radiometer, Francie) s kombinovanou skleněnou elektrodou PHC2401-8 kalibrovanou na standardní pufrů.

3.2 Použité chemikálie

D-(+)-glukosamin hydrochlorid a ethanolamin byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), kyselina octová od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko), KCl byl od firmy Balex (Pardubice, ČR), NaOH od firmy Penta (Chrudim, ČR).

Ultračistá voda byla produkována systémem Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA).

Léčivé přípravky s obsahem glukosaminu byly zakoupeny v místní lékárně.

3.3 Procedura analýzy

Pro analýzu byla použita kapilára o vnitřním průměru 50 μ m, celkové délky 75 cm, efektivní délky 27cm.

Před prvním použitím byla kapilára promyta 5 minut metanolem, 3 minuty vodou, 20 minut 0,1M roztokem HCl, vodou 3minuty, 30 minut 1M roztokem NaOH a nakonec 30 minut vodou, všechny kroky při tlaku 750mbar.

Denně byla kapilára udržována před první a po poslední analýze 10 minut 0,1M NaOH a 10 minut vodou při tlaku 1000 mbar.

Před každou analýzou byla kapilára kondiciována při tlaku 1000 mbar roztokem 0,1M NaOH po dobu dvou minut, následně 4 minuty elektrolytem při stejném tlaku.

Pro jednu proceduru byly použity 3 zásobníky elektrolytů – jeden byl určen na promývání kapiláry, další dva jako vstupní a výstupní zásobník pro analýzu. Jedna sada roztoků BGE byla používána na 6 analýz.

Injekce roztoku probíhala hydrodynamicky tlakem 50mbar po dobu 6 sekund.

Analýza byla prováděna v místnosti klimatizované na 25°C a kapilára byla uschována v cele temperované vzduchem na 25 \pm 0,1°C.

Nastavení CCD detektoru bylo následující: Gain 50%, Voltage -18dB, Offset 0.

3.4 Příprava roztoků standardů a elektrolytů

Elektrolyt byl připraven naředěním potřebného množství kyseliny octové ve vodě a pH upraveno pomocí 0,1M roztoku NaOH pomocí pH metru.

Všechny výpočty jsou vztaženy na obsah volné baze glukosaminu a na volné draselné kationty.

Vodné roztoky standardu glukosaminu a ethanolaminu (vnitřní standard) byly připravovány v koncentraci 1mg/ml jako zásobní roztoky, před použitím byly ředěny na potřebnou koncentraci. Zásobní roztok KCl obsahoval 150 μ g/ml K⁺.

Roztoky pro stanovení linearitu byly ředěny ze zásobních roztoků o přibližné koncentraci 1mg/ml glukosaminu a 150 μ g/ml K⁺ na koncentraci 100 – 300 μ g/ml volné baze glukosaminu a 15 – 75 μ g/ml K⁺ iontů podle následující tabulky.

Tabulka 1.: Ředění zásobních roztoků pro stanovení linearitu

	K ⁺		EtOHNH ₂		GlAm	
	konc.	ml rozt.	konc.	ml rozt.	konc.	ml rozt.
1	15	1,0	100	1,0	100	1,0
2	30	2,0	100	1,0	150	1,5
3	45	3,0	100	1,0	200	2,0
4	60	4,0	100	1,0	250	2,5
5	76	5,0	100	1,0	300	3,0

Koncentrace vnitřního standardu ve všech vzorcích byla 100 μ g/ml ethanolaminu.

Všechny roztoky standardů a elektrolytů byly odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

Elektrolyty byly před použitím zfiltrvány přes 0,45 μ m nylonový filtr.

3.5 Optimalizace metody

Byly vyzkoušeny různé BGE v rozmanitém složení za účelem vyhledat optimální složení BGE. Mezi testovanými BGE byly: acetát, formiát, fosfát o pH = 7, fosfát o pH = 2, HEPES, citrát/fosfát o pH = 5,5. Byl vyzkoušen také elektrolyt dle da Silvy¹⁶.

Jako optimální složení elektrolytu byl nakonec zvolen acetátový pufr.

K dalším krokům optimalizace metody patřilo optimalizace koncentrace kyseliny octové (20 – 60mM), pH elektrolytu (5,1 – 5,6), vkládaného napětí (20 – 30kV) a nástřík vzorku a kondicionace kapiláry.

Identita píku byla potvrzena metodou standardního přídavku a analýzou slepého vzorku.

3.6 Optimalizace složení vnitřního standardu

Vnitřní standard byl volen na základě vlastností elektrolytu. Byla hledána bazická látka, dobře rozpustná ve vodě, která bude v prostředí BGE protonizována a při koncentraci podobné koncentraci analytu bude vykazovat přibližně stejnou odezvu detektoru a zároveň její migrační čas bude dostatečně odlišný od glukosaminu.

Byly vyzkoušeny látky spermidin, kyselina glutamová, imidazol, ethanolamin a N,N-dimethylethanolamin.

První tři látky nevykazovaly před EOF žádnou odezvu. Rozlišení glukosaminu a N,N-dimethylethanolaminu bylo nižší než ethanolaminu a glukosaminu, proto byl jako IS vybrán ethanolamin v koncentraci 100 μ g/ml.

3.7 Stanovení linearit a opakovatelnosti metody

Linearita byla stanovena v rozsahu 100 μ g/ml až 300 μ g/ml pro glukosamin a 15 μ g/ml až 75 μ g/ml pro K⁺ ionty s obsahem 100 μ g/ml ethanolaminu jako IS, každý vzorek byl nastříknut třikrát za optimálních podmínek.

Plochy analytů byly korigovány časem a plochou vnitřního standardu podle vzorce

$$A = \frac{A_x}{t_x} : \frac{A_{IS}}{t_{IS}},$$

kde A je výsledná plocha, A_x a A_{IS} jsou plochy analytu resp. vnitřního standardu a t_x a t_{IS} jsou migrační časy analytu, resp. vnitřního standardu.

Výsledky byly zpracovány metodou lineární regrese a byla určena závislost plochy na čase.

Opakovatelnost byla stanovena 3 po sobě následující dny na dvou koncentračních úrovních 100 μ g/ml a 200 μ g/ml glukosaminu, každá koncentrace 6x. Každý den proběhla analýza s čerstvě připraveným roztokem elektrolytu. Roztoky vzorku byly ředěny ze zásobního taktéž každý den nově, zásobní roztoky glukosaminu a IS byly připraveny do zásoby.

RSD – relativní směrodatná odchylka, je definována jako podíl průměru a směrodatné odchylky, kterou lze spočítat podle vzorce

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}},$$

kde n je počet dat v souboru, \bar{x} je průměrná hodnota a x jsou jednotlivé hodnoty¹⁷.

3.8 Stanovení obsahu glukosaminu v přípravcích

Pro stanovení byly vybrány přípravky ve formě granulátu pro přípravu p.o. roztoku (přípravek A a B), přípravek ve formě potahovaných tablet (přípravek C) a tobolek (přípravek D).

U každého přípravku byly pro stanovení obsahu analyzovány tři na sobě nezávislé navážky, každá analyzována třikrát.

Koncentrace byla spočítána na základě poměru se standardem, který byl měřen každý den 3x před analýzou jednotlivých navážek. Pokud nebylo RSD těchto šesti analýz uspokojiví, byl připraven nový elektrolyt a kapilára byla promyta 10 minut 0,1M NaOH a 10 minut vodou při tlaku 1000mbar. Přepočet koncentrace se konal podle vzorce

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot c_{st}$$

kde A_{vz} je průměr korigovaných ploch vzorku, A_{st} je průměr korigovaných ploch standardu a c_{st} je koncentrace standardu.

Výsledek je vyjádřen jako procentuální obsah nalezeného množství k deklarovanému množství.

K určení správnosti metody bylo k těmto navážkám přidáno přesné množství glukosaminu, správnost byla vypočítána podle vzorce

$$R(\%) = \frac{c_1 - c_0}{c_{st}},$$

kde c_1 je koncentrace vzorku vzniklého přidavkem glukosaminu, c_0 je nalezená koncentrace navážky odpovídající c_1 a c_{st} je koncentrace přidavku standardu.

U přípravku A a B byl zvážena a smíchán obsah 5 sáčků. Množství granulátu odpovídající přibližně 2mg/ml glukosaminu bylo rozpuštěno v 1/2 objemu odměrné baňky vody pomocí ultrazvuku po dobu 5 minut a doplněn do 100ml. Tento zásobní roztok byl naředěn na požadovanou koncentraci, byl přidán roztok IS a byla provedena analýza. Pro stanovení správnosti metody bylo k finálnímu roztoku přidáno množství glukosaminu odpovídající koncentraci 75 μ g/ml.

U přípravku C bylo zváženo a rozdrceno 10 tablet a z deklarovaného obsahu byl spočítán obsah glukosaminu ve směsi. Byla odvážena směs v takovém množství, aby roztok získaný rozpuštěním v 25 ml elektrolytu obsahoval přibližně 3mg/ml glukosaminu. Tato suspenze byla ponechána v ultrazvuku po dobu 10 minut. Následujícím krokem byla centrifugace po při 3000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Z roztoku bylo odebráno 0,5ml do 10ml baňky,

byl přidán vnitřní standard a provedena analýza. Pro stanovení správnosti byl standard glukosaminu přidán současně se směsí před rozpouštěním v BGE v takovém množství, aby výsledná koncentrace glukosaminu byla zvýšena o 75 μ g/ml a suspenze byla poté podrobena stejné proceduře, tedy rozpouštění v ultrazvuku, centrifugace, ředění, analýza.

U přípravku D byl zvážen obsah 10 tobolek a smíchán dohromady. Ze směsi bylo odváženo do 50 ml odměrné baňky množství odpovídající přibližně 1,5mg/ml glukosaminu, bylo dispergováno v přibližně 1/2 objemu vody a rozpuštěno pomocí ultrazvuku po dobu 10 minut. Poté byl objem doplněn po rysku, tento roztok byl naředěn do 10ml baňky a po přidání roztoku IS byla provedena analýza. Správnost byla stanovena po přidavku 75 μ g/ml glukosaminu do 10ml baňky.

3.9 Mezipřesnost

Tento parametr metody byl stanoven tři po sobě následující dny na přípravku B (šarže 07007). Každý den bylo analyzováno 5 navážek (každá 3x) na čerstvě připraveném elektrolytu, roztoku vnitřního standardu a standardu. Z výsledků byla stanovena RSD migračních časů, ploch a obsahu glukosaminu.

3.10 Určení LOD a LOQ

LOD a LOQ byl stanoven na základě poměru S/N, pro LOD $S/N = 10$, pro LOQ $S/N = 3$ a potvrzen experimentálně.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace metody

4.1.1 Optimalizace elektrolytu

Optimalizační kroky byly prováděny s roztokem obsahující glukosamin o koncentraci 0,1mg/ml, IS 0,1mg/ml a K⁺ ionty 0,1mg/ml a slepým roztokem bez těchto součástí.

Složení elektrolytu

Jak bylo uvedeno výše, bylo vyzkoušeno různé složení elektrolytu.

Elektrolyty obsahující fosfáty se neosvědčily, před EOF nebyl zřetelný pík glukosaminu. U elektrolytu založeného na HEPES došlo pravděpodobně kvůli mutarotaci glukosaminu k separaci těchto dvou izomerů a rozdvojení píku, ale tento fakt z důvodu cíle diplomové práce nebyl dále prověřován.

Elektrolyt s vysokým pH a obsahem CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid)¹¹ v koncentraci na otočení směru EOF vykazoval velmi špatnou citlivost a nemohl být použit.

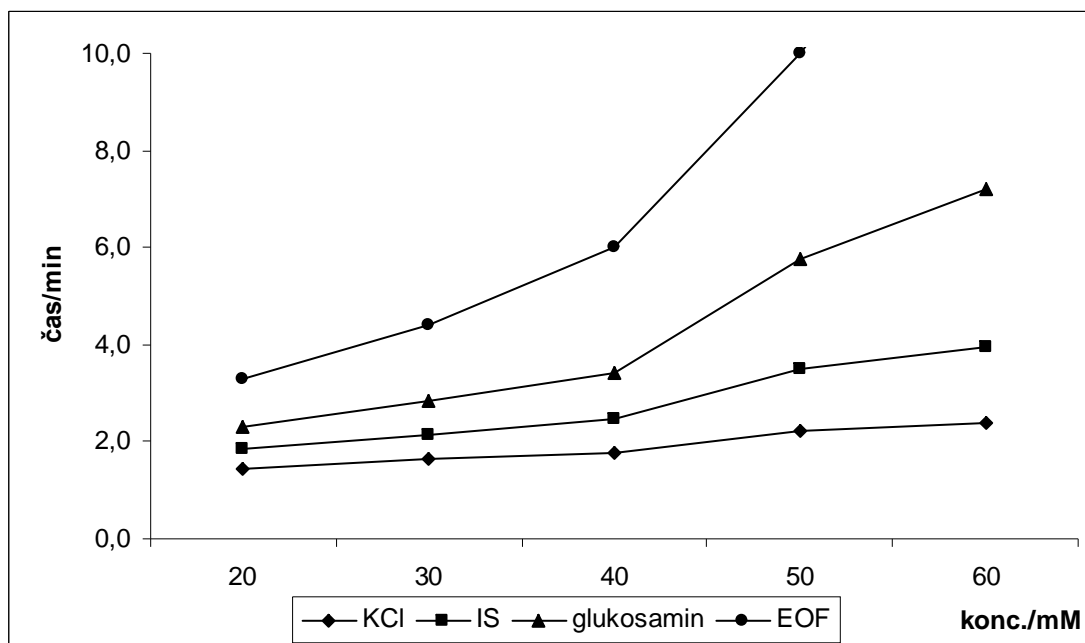
Mravenčanový vykazoval citlivost i rozlišení na velmi podobné úrovni jako acetátový, ale záznam obsahoval systémový pík, proto byl vybrán elektrolyt na bázi octanového tlumivého roztoku.

Koncentrace elektrolytu

Koncentrace elektrolytu byla optimalizována v rozsahu koncentrací 20mM až 60mM po 10mM, s každým elektrolytem byly provedeny 2 analýzy při 20kV. pH bylo upraveno u všech elektrolytů stejně na hodnotu 5,5. Průměrné migrační časy jsou uvedeny v tabulce a v grafu

Tabulka 2.: Závislost migračních časů na koncentraci BGE

Konc. BGE mM	Proud μA	KCl t _m /min	IS t _m /min	glukosamin t _m /min	EOF t _m /min
20	17	1,46	1,83	2,31	3,29
30	23	1,63	2,15	2,83	4,39
40	29	1,79	2,48	3,42	6,00
50	39	2,21	3,48	5,78	10,00
60	42	2,39	3,96	7,20	15,00



Obr. 5.: Závislost migračních časů na koncentraci BGE

U vyšších koncentrací elektrolytu dochází k růstu migračních časů.

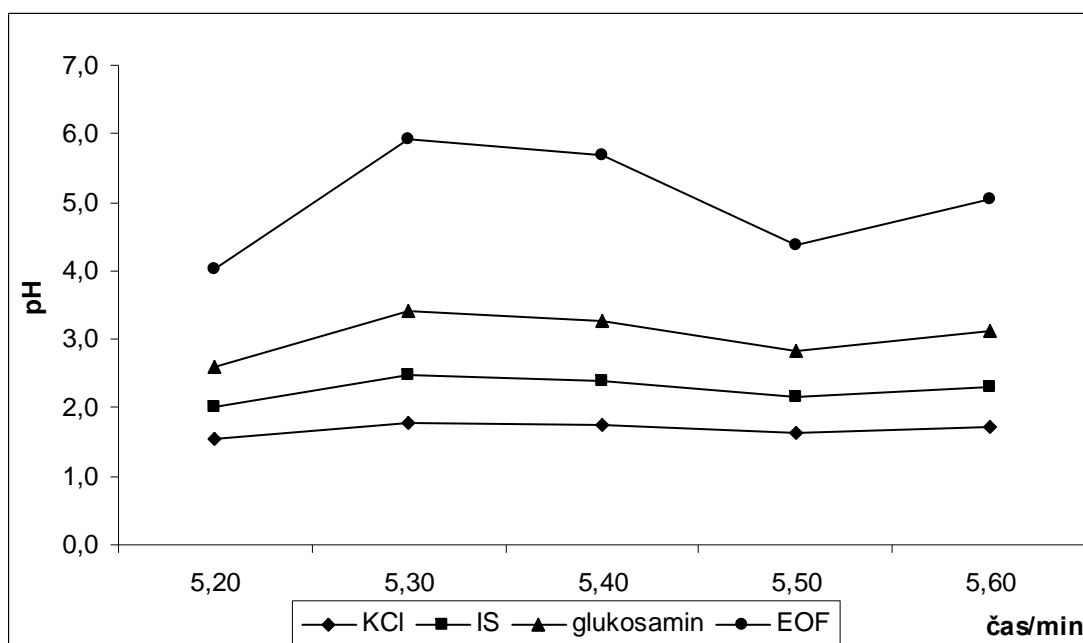
Jako optimální byla vybrána koncentrace 30mM z důvodu dostatečného rozlišení a symetrie píků.

pH elektrolytu

pH bylo optimalizováno pro 30mM elektrolyt v rozsahu 5,2 až 5,6 po 0,1 jednotce pH. Úprava pH byla uskutečněna 0,1M NaOH. S každým elektrolytem byly provedeny dvě analýzy při 20kV, průměrné hodnoty migračních časů jsou vypsány v tabulce a vyneseny v grafu.

Tabulka 3.: Závislost migračních časů na pH BGE

pH	Proud μA	KCl t _m /min	IS t _m /min	glukosamin t _m /min	EOF t _m /min
5,20	17	1,56	2,01	2,60	4,03
5,30	25	1,79	2,47	3,41	5,93
5,40	26	1,74	2,39	3,28	5,67
5,50	27	1,63	2,15	2,83	4,39
5,60	27	1,71	2,31	3,12	5,04



Obr. 6.: Závislost migračních časů na pH BGE

Vzhledem k symetrii píků bylo jako optimální pH zvoleno pH = 5,2.

Závěr

Na základě optimalizace bylo rozhodnuto o závěru, že optimální elektrolyt je 30mM acetátový pufr o pH = 5,2 upravovaný 0,1M NaOH.

4.1.2 Optimalizace dalších podmínek

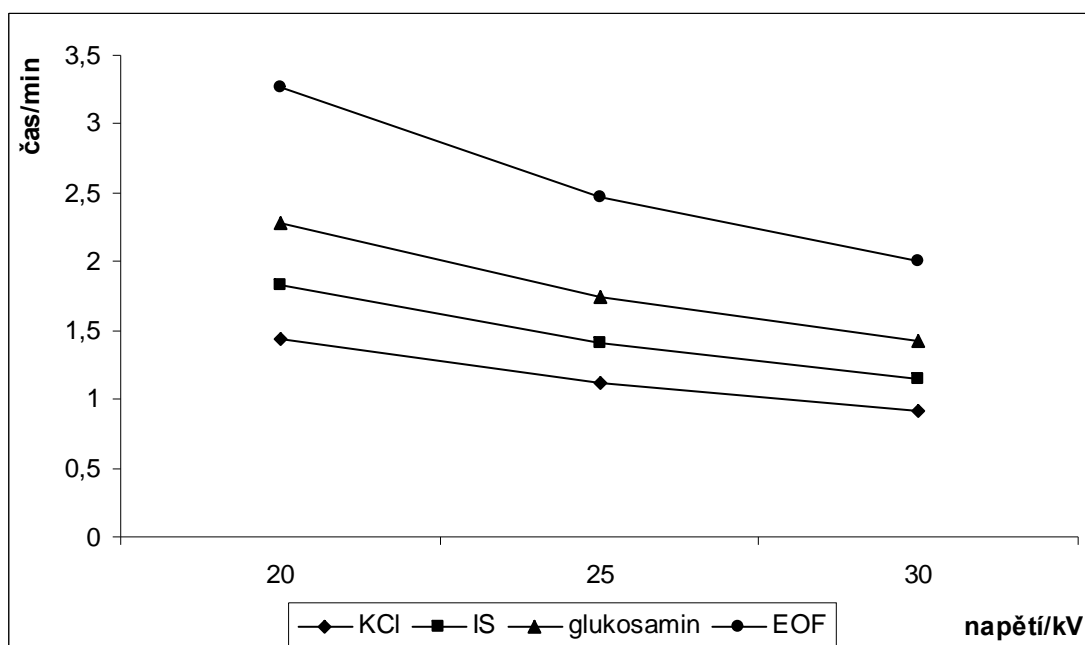
Další optimalizované parametry byly velikost vkládaného, nástřiku a kondicionace kapiláry.

Velikost napětí

Optimalizace napětí proběhla v rozsahu 20 – 30kV s elektrolytem optimálního složení, každý krok byl proveden dvakrát a průměrné hodnoty byly zaznamenány do tabulky. Jako ideální napětí bylo zvoleno napětí 30kV, protože rozlišení a symetrie u tohoto napětí jsou dostatečné a nižší napětí nepřináší žádnou výhodu, ale pouze prodlužují dobu analýzy.

Tabulka 4.: Závislost migračních časů na napětí

napětí kV	Proud μ A	KCl t_m /min	IS t_m /min	glukosamin t_m /min	EOF t_m /min
20	25	1,44	1,83	2,28	3,27
25	33	1,12	1,41	1,75	2,47
30	39	0,97	1,15	1,42	2,00



Obr. 7.: Závislost migračních časů na napětí

Optimalizace nástřiku

Používaný systém je vybaven hydrodynamickým nástřikem vzorku a lze měnit dobu nástřiku (6, 12 a 18 sekund) a tlak nástřiku (50mbar a 100mbar). Analýzou stejného vzorku při různých nástřicích byl potvrzen vzorec uveden v kapitole 2.2.1, tedy že pokud zůstává konstantní součin *čas krát tlak*, je množství vstříknutého vzorku konstantní.

U vyššího tlaku a delších časů nástřiku docházelo ke zbytečnému rozmývání píků a snížení symetrie, proto byl jako optimální vybrán nástřik 50mbar a 6 sekund, při kterém je dostatečná odezva detektoru a nejlepší symetrie.

Kondicionace kapiláry

Kondicionace kapiláry před každou analýzou se ukázala jako hlavní činitel ovlivňující reprodukovatelnost migračních časů.

Při promývání kapiláry jenom roztokem elektrolytu mezi analýzami se migrační časy prodlužovaly a RSD časů bylo velmi vysoké.

Zavedením kroku 2 minut promývání 0,1M NaOH před 4 minutami elektrolytem, oba kroky při 1000 mbar, se zvýšila reprodukovatelnost řádově. RSD migračních časů glukosaminu při promývání jenom elektrolytem (n=6) se z 9,6% snížila na 0,08% při promytí nejdříve hydroxidem, poté elektrolytem, což je více než 100x.

4.1.3 Závěr

Podmínky separace, které se jeví vývojem metody jako optimální, jsou následující:

- elektrolyt: 30mM acetátový pufr, pH = 5,2, upravovaný 0,1M NaOH
- napětí: 30kV, běžná polarita, tedy anoda na výstupu
- nástřik vzorku: 6 sekund při tlaku 50mbar
- kondicionace kapiláry: před každou analýzou při 1000mbar promytí 2 minuty 0,1M NaOH, 4 minuty BGE.

Elektroforeogram standardu obsahující 45 μ g/ml K⁺, 200 μ g/ml glukosaminu a 100 μ g/ml ethanolaminu jako IS a elektroforeogram slepého vzorku je uveden v příloze. Migrační časy látek jsou přibližně 1,0 minuty K⁺ ionty; 1,4 minuty ethanolamin; 1,8 minuty glukosamin 3,0 minuty EOF.

Rozlišení mezi K⁺ – IS bylo 5,6; mezi IS – glukosaminem 4,5; mezi glukosaminem – EOF 7,0.

Efektivita metody vyjádřená jako počet teoretických pater byla přibližně 13 100 pro K⁺, 32 900 pro IS a 12 000 pro glukosamin.

4.2 Stanovení linearity a opakovatelnosti

4.2.1 Linearita

Linearita byla stanovena jak pro glukosamin, tak pro draselné kationy. Pro glukosamin bylo zvoleno rozpětí koncentrací 100 μ g/ml až 300 μ g/ml po 50 μ g/ml, pro K⁺ ionty 15-75 μ g/ml po 15 μ g/ml.

Byl připraven zásobní roztok glukosaminu o přesné koncentraci 0,9676mg/ml glukosaminu odvážením 0,0233g glukosamin hydrochloridu do 200ml odměrné baňky.

Zásobní roztok K⁺ byl připraven odvážením 0,0286g KCl, což rozpuštěním v 100ml odměrné baňce odpovídá koncentraci 0,1498mg/ml.

Roztok IS byl připraven rozpuštěním 99 μ l ethanolaminu v 100ml odměrné baňce.

Jednotlivé vzorky byly vytvořeny ředěním těchto tří roztoků do 10ml baňky, přesné koncentrace jsou v následující tabulce, koncentrace jsou uváděné v μ g/ml.

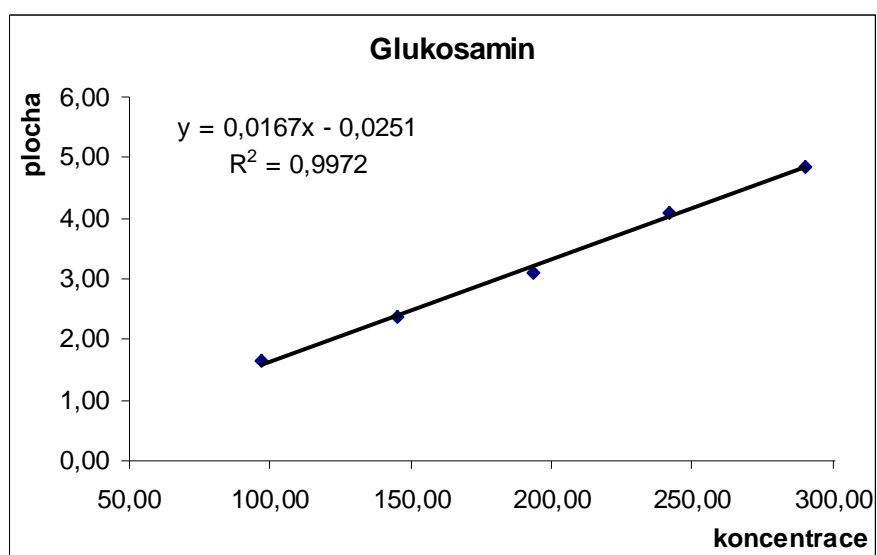
Tabulka 5.: Přesné koncentrace vzorků pro stanovení linearitu

	K ⁺ μg/ml	EtOHNH ₂ μg/ml	glukosamin μg/ml
1	14,98	100	96,77
2	29,96	100	145,15
3	44,95	100	193,54
4	59,93	100	241,92
5	74,91	100	290,30

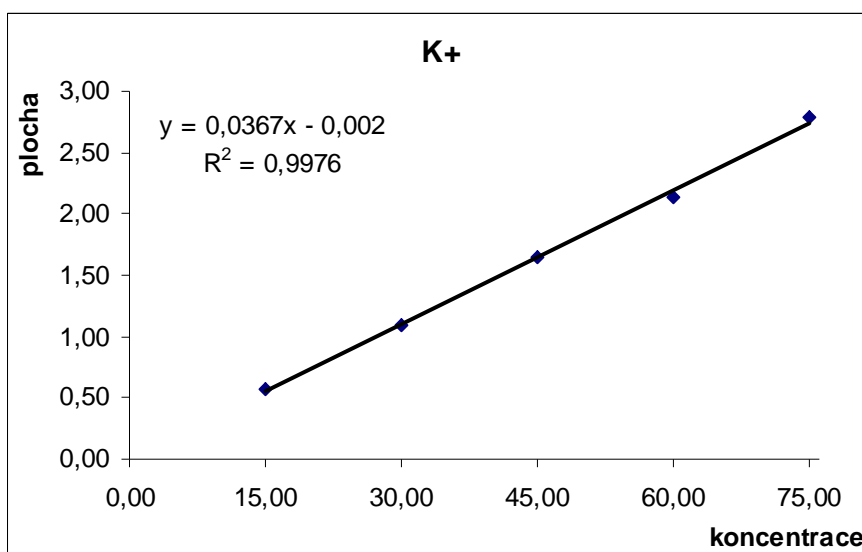
Všechny vzorky byly zanalyzovány 3x za optimálních podmínek (viz výše).

Analýzy probíhaly na jedné šarži elektrolytu, ale pro každý vzorek byl elektrolyt v zásobnících vyměněn.

Plochy glukosaminu a K⁺ iontů byly zkorigovány časem a vnitřním standardem, hodnoty byly vyneseny do grafu a byla určena závislost korigované plochy na koncentraci a korelační koeficienty křivek.



Obr. 8.: Závislost plochy píku na koncentraci (μg/ml) volné baze glukosaminu



Obr. 9.: Závislost plochy píku na koncentraci ($\mu\text{g/ml}$) K^+ iontů

Korelační koeficient křivky pro glukosamin je $r = 0,9985$, pro K^+ $r = 0,9987$

RSD podílů koncentrace k odpovídající ploše byla u glukosaminu rovna 2,29%, u draselných iontů 2,42%.

4.2.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena 3 po sobě následující dny na dvou koncentračních úrovních (v kalibrační křivce body 1 + 3), každý vzorek 6x. Vzorky byly připravovány čerstvým ředěním ze zásobních roztoků připravených pro kalibraci, přesné navážky a koncentrace viz předchozí kapitola.

Elektrolyt byl každý den připravován nově a pro každý vzorek byla naplněna nová sada zásobníků.

Z naměřených výsledků byla určena RSD migračních časů a korigovaných ploch pro 1. den, pro 1. a 2. den současně a pro všechny 3 dny současně pro obě koncentrace. Výsledky jsou znázorněny v tabulce.

Tabulka 6.: Opakovatelnost metody pro 100 $\mu\text{g/ml}$ glukosamin a 15 $\mu\text{g/ml}$ K^+

Den	Glukosamin		K^+ ionty	
	RSD času	RSD ploch	RSD času	RSD ploch
1.	0,74%	3,11%	0,25%	1,97%
1. + 2.	3,22%	5,15%	1,55%	4,89%
1. až 3.	3,23%	4,64%	1,84%	7,77%

Tabulka 7.: Opakovatelnost metody pro 200 μ g/ml glukosamin a 45 μ g/ml K⁺

Den	Glukosamin		K ⁺ ionty	
	RSD času	RSD ploch	RSD času	RSD ploch
1.	0,08%	2,64%	0,12%	1,64%
1. + 2.	1,44%	2,17%	0,87%	3,04%
1. až 3.	1,86%	1,98%	1,28%	2,82%

Jak je patrné z výsledků, metoda má velmi vysokou reprodukovatelnost migračních časů i ploch.

Tímto stanovením byla rovněž potvrzena stabilita zásobního roztoku glukosaminu a draselných iontů.

4.3 Stanovení obsahu glukosaminu v přípravcích

Jako standard pro porovnání ploch pro tyto měření byl použit zásobní roztok, který vznikl rozpuštěním 0,2490g glukosaminu hydrochloridu v 100 ml. Tento roztok obsahuje 2,0863mg/ml glukosaminu. Po naředění 0,75ml do 10 baňky byla koncentrace standardu 155,1 μ g/ml.

Do všech analyzovaných vzorků byl přidán IS o výsledné koncentraci 0,1mg/ml a všechny plochy byly vztaženy k tomuto standardu.

Elektroforeogramy přípravků jsou uvedeny v příloze.

4.3.1 Přípravek A

Přípravek A byl prášek na přípravu perorálního roztoku s deklarovaným obsahem 1,5g glukosamin sulfátu, což odpovídá 1,178g glukosaminu.

Pět sáčků obsahovalo 19,4026g granulátu, na jeden sáček odpovídá průměrně 3,8805g granulátu, tzn. že 30,36% granulátu odpovídá glukosaminu.

Byly odváženy tři navážky a rozpuštěny v 100 ml vody s množstvím glukosaminu takovým, aby po rozpuštění byl získán přibližně 2mg/ml roztok glukosaminu. Tyto byly naředěny odebráním 0,75ml do 10ml baňky, čímž vznikl roztok o koncentraci přibližně 150 μ g/ml.

Údaje v tabulce značí hmotnost navážky, deklarované množství glukosaminu v 1 sáčku v gramech (m_{dek}), nalezený obsah v procentech a množství glukosaminu v gramech na 1 sáček.

Tabulka 8.: Stanovení obsahu v přípravku A

navážka	m_{dek}/mg	$m_{\text{nalezeno}}/\text{mg}$	obsah
1	1178	1095,0	92,9%
2	1178	1140,0	96,8%
3	1178	1128,9	95,8%
průměr	1178	1121,9±23,5	95,2%±2,1%

V přípravku A bylo nalezeno 95,2±2,1% deklarovaného obsahu glukosamin, což odpovídá 1121,9±23,5mg na jeden sáček.

Po stanovení koncentrací bylo provedeno nové ředění ze zásobních roztoků a bylo k nim přidáno 0,375ml roztoku standardu glukosaminu obsahující 2,0863mg/ml, což odpovídá 77,6μg/ml glukosaminu. S těmito třemi vzorky byla opět provedena analýza 3x.

Údaje v tabulce odpovídají naměřené koncentraci tohoto vzorku $c_{\text{naměř}}$ (vč. přídatku), rozdílu koncentrace s a bez přídatku, koncentrací přídatku c_{rec} a procentuálnímu obsahu nalezeného množství přídatku.

Tabulka 9.: Stanovení správnosti u přípravku A

navážka	c-naměřeno μg/ml	rozdíl μg/ml	$C_{\text{přidavek}}$ μg/ml	nalezeno
1	217,3	78,6	77,6	101,3%
2	225,3	79,9	77,6	103,0%
3	217,3	75,0	77,6	96,6%

Průměrné množství nalezeného přídatku glukosaminu bylo 100,3±3,3%.

4.3.2 Přípravek B

Jako přípravek B byl zvolen přípravek ve formě granulátu pro přípravu p.o. roztoku. Deklarovaný obsah v příbalovém letáku byl 1,5g glukosamin sulfátu, což odpovídá 1,178g volné baze glukosaminu.

Pět sáčků obsahovalo 19,3918g granulátu, na jeden sáček odpovídá 3,8784g granulátu, z čehož vyplývá, že 30,38% granulátu odpovídá glukosaminu.

Ze tří navážek byly připraveny zásobní roztoky o přibližné koncentraci 2mg/ml, které byly potom ředěny na přibližnou koncentraci 150μg/ml. Údaje v tabulce byly získány stejným postupem jako u přípravku A, viz výše.

Tabulka 10.: Stanovení obsahu v přípravku B

navážka	m _{dek} /mg	m _{nalezeno} /mg	obsah
1	1178	1087,7	92,3%
2	1178	1088,6	92,4%
3	1178	1056,4	89,7%
průměr	1178	1077,5±18,3	91,5±1,7%

V přípravku B bylo obsaženo 91,5±1,7% deklarovaného obsahu glukosaminu, což odpovídá 1077,5±18,3mg na jeden sáček.

Na stanovení správnosti metody byly připraveny nové vzorky ředěním ze zásobních roztoků na přibližnou koncentraci 150μg/ml glukosaminu a k těmto vzorkům bylo přidáno 0,375ml standardu o koncentraci 2,0863mg/ml, což odpovídá 77,6μg/ml glukosaminu. V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření.

Tabulka 11.: Stanovení správnosti u přípravku B

navážka	c-naměřeno μg/ml	rozdíl μg/ml	C _{přídavek} μg/ml	nalezeno
1	214,0	74,3	77,6	95,7%
2	212,3	74,1	77,6	95,5%
3	206,1	73,3	77,6	94,6%

Analýzami bylo nalezeno průměrně 95,3±0,7% přídavku standardu.

4.3.3 Přípravek C

Přípravek C byl jako jediný potravní doplněk v lékové formě potahovaných tablet. Deklarované množství glukosaminu sulfátu bylo 800mg odpovídající 628mg volné baze glukosaminu.

Hmotnost jedné tablety 1,5044g byla určena průměrem z hmotností 10 tablet. V jedné tabletě je tedy 41,77% glukosaminu.

10 tablet bylo rozdrobeno v třecí misce a bylo naváženo takové množství, aby výsledná koncentrace v 25ml roztoku byla přibližně 3mg/ml. Navážka byla dispergována v elektrolytu a ponechána v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Byla vyzkoušena i extrakce do vody, ale správnost metody byla velmi nízká.

Po 10 minutách v ultrazvuku byla suspenze s rozpuštěným glukosaminem převedena do centrifugační zkumavky a byla odstředěna při 3000 otáčkách/minutu po dobu 15 minut. Ze supernatantu bylo odebráno 0,5ml do 10ml baňky, výsledná koncentrace byla tedy přibližně 150 μ g/ml. Deklarovaný obsah na 1 tabletu m_{dek} , naměřený obsah v jednotlivých navážkách, přepočít na jednu tabletu a průměrné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce

Tabulka 12.: Stanovení obsahu v přípravku C

navážka	m_{dek}/mg	$m_{nalezeno}/mg$	obsah
1	628	567,7	90,4%
2	628	556,4	88,6%
3	628	564,6	89,9%
průměr	628	562,9 \pm 5,8	89,6 \pm 1,0%

Obsah glukosaminu v přípravku C vypočítáný jako průměr z jednotlivých analýz byl 89,6 \pm 1,0%, na jednu tabletu odpovídá 562,9 \pm 5,8mg

Ke stanovení správnosti metody byl k navážce prášku z tablety před rozpuštěním v BGE přidán standard glukosaminu v takovém množství, aby se ve výsledném ředění koncentrace zvedla o 75 μ g/ml a byla s ním provedena extrakce stejná jako u vzorků bez přídavku, tedy ultrazvuk, centrifugace, ředění. Výsledné nalezené koncentrace a procentuální množství nalezeného přídavku jsou uvedeny v následující tabulce

Tabulka 13.: Stanovení správnosti u přípravku C

Navážka	c-naměřeno μ g/ml	rozdíl μ g/ml	$C_{přidavek}$ μ g/ml	nalezeno
1	214,5	75,8	75,5	100,4%
2	214,4	76,1	76,1	102,3%
3	215,8	69,9	69,9	95,3

Průměrně bylo nalezeno 99,29 \pm 3,7% přídavku standardu.

4.3.4 Přípravek D

Přípravek D byl ve formě želatinových tobolek pro p.o. užití. Deklarovaný obsah byl 400 mg glukosaminu, tzn. že při průměrném obsahu 0,6820g prášku v jedné tobolce odpovídá 58.66% prášku čistému glukosaminu.

Byly zanalyzovány tři různé navážky. Zásobní roztok byl připraven v koncentraci přibližně 1,5mg/ml do 50ml baňky, vzorek vznikl desetinásobným naředěním tohoto roztoku do 10ml baňky. Prášek obsahoval magnesium stearát, který v zásobním roztoku lehce opalizoval, ale roztok vzorku byl po naředění zcela čirý. V následující tabulce jsou uvedeny deklarovaný obsah v jedné tobolce, naměřený obsah a naměřená hmotnost.

Tabulka 14.: Stanovení obsahu v přípravku D

navážka	m_{dek}/mg	$m_{nalezeno}/mg$	obsah
1	400	362,2	90,6%
2	400	365,2	91,3%
3	400	366,4	91,6%
průměr	400	364,6±2,1	91,2±0,6%

Průměrně je v 1 tobolce obsaženo 91,2±0,6%, což odpovídá obsahu 364,6±2,1mg na jednu tobolku.

Správnost metody byla stanovena na základě standardního přídatku ke každé navážce. Vzorky přidáním 0,375ml roztoku glukosaminu o koncentraci 2,0863mg/ml, koncentrace se tedy zvedla o 77,6µg/ml glukosaminu. Naměřené hodnoty jsou v následující tabulce.

Tabulka 15.: Stanovení správnosti u přípravku D

navážka	c - naměřeno µg/ml	rozdíl µg/ml	C_{rec} µg/ml	nalezeno
1	211,0	78,7	77,6	101,5
2	212,2	78,6	77,6	101,4
3	215,0	80,1	77,6	103,3

Průměrně bylo nalezeno 102,0±1,1% z standardního přídatku.

4.3.5 Závěr

Na základě předchozích měření byly stanoveny obsahy glukosaminu v přípravcích, výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 16.: Obsahy glukosaminu ve všech přípravcích

Přípravek	Deklarovaný obsah glukosaminu	Nalezený obsah	Odpovídá na jednotku lékové formy	Nalezeno přídatku
A	1,178g	95,2±2,1%	1121,9±23,5mg	100,3±3,3%
B	1,178g	91,5±1,7%	1077,5±18,3mg	95,3±0,7%
C	800mg	89,6±1,0%	562,9±5,8mg	99,29±3,7%
D	400mg	91,2±0,6%	364,6±2,1mg	102,0±1,1%

4.4 Mezidenní přesnost

Mezidenní přesnost byla stanovena u přípravku B šarže 07007, tedy prášku pro přípravu roztoku. Stanovení probíhalo tři po sobě následující dny, každý den s novým elektrolytem.

Roztok standardu byl připraven opět jako zásobní roztok rozpuštěním 0,1799g glukosamin hydrochloridu v 100 ml odměrné baňce.

Každý den před sérií měření vzorků byl naředěn nový roztok standardu (výsledná koncentrace 149,4µg/ml) a zanalyzován 6x.

Vzorky přípravku byly připravovány navážením přibližně přesně 0,31g granulátu do 50 ml baňky a po naředění 0,8 ml tohoto zásobního roztoku do 10ml baňky byla teoretická koncentrace ve vzorku 150µg/ml.

Bylo stanoveno 5 navážek 3 po sobě následující dny, celkem tedy 15 navážek a z výsledků byly určeny RSD obsahu 1. dne, 1. a 2. dne dohromady a všech tří dnů.

Tabulka 17.: Mezidenní přesnost

navážka	množství	C _{teor-50ml} mg/ml	C _{teor-10ml} mg/ml	C _{naměř} mg/ml	obsah
1.1	0,3170	1,8907	151,3	152,4	100,7%
1.2	0,3175	1,8937	151,5	151,7	100,1%
1.3	0,3186	1,9002	152,0	152,7	100,5%
1.4	0,3204	1,9110	152,9	153,5	100,4%
1.5	0,3203	1,9104	152,8	151,3	99,0%
2.1	0,3191	1,9032	152,3	153,8	101,0%
2.2	0,3187	1,9008	152,1	150,8	99,2%
2.3	0,3177	1,8949	151,6	154,0	101,6%
2.4	0,3221	1,9211	153,7	155,4	101,1%
2.5	0,3194	1,9050	152,4	154,0	101,1%
3.1	0,3179	1,8961	151,7	139,4	91,9%
3.2	0,3190	1,9026	152,2	151,5	99,6%
3.3	0,3239	1,9319	154,5	156,1	101,0%
3.4	0,3221	1,9211	153,7	151,1	98,3%
3.5	0,3189	1,9020	152,2	151,4	99,5%

Tabulka 18.: RSD obsahu glukosaminu mezidenní přesnosti

	1. den	1. + 2. den	1. + 2. + 3. den
RSD obsahu glukosaminu	0,68%	0,84%	2,35%

4.5 Stanovení a ověření LOD a LOQ

Limit detekce a kvantifikace byl stanoven na základě poměru signálu k šumu S/N a ověřen měření. Elektroforeogramy viz přílohy.

Tabulka 19.: LOD a LOQ

	Glukosamin		K ⁺	
	µg/ml	mol/l	µg/ml	mol/l
LOD	9,3	5,18×10 ⁻⁵	2,9	1,60×10 ⁻⁵
LOQ	30,9	1,73×10 ⁻⁵	9,6	5,34×10 ⁻⁵

4.6 Ověření správnosti metody referenční HPLC metodou

Metoda byla převzata od . Všechny podmínky analýzy byly totožné s touto metodou, kromě rozměrů Phenomenex Luna aminokolony (délka 100mm, 3mm vnitřní průměr) a objem nastříknutého vzorku – 20 μ l.

Reprodukovatelnost metody byla potvrzena linearitou metody na šesti vzorcích, (1,25g až 5,02g glukosaminu) každý analyzován 3x. Korelační koeficient křivky byl $r = 0,9998$. Opakovatelnost byla potvrzena desetinásobnou analýzou vzorku s obsahem 3,61mg/ml glukosaminu.

Pro potvrzení byla použita šarže 07007 přípravku B. Analýzou tří na sobě nezávislých navážek byl zjištěn obsah 98,9% glukosaminu (RSD = 0,73%). Pro tři různé navážky množství nalezeného standardního přídatku bylo 99,7%, RSD = 3,12%.

Student t-testem nebyly objeveny žádné významné statistické odlišnosti.

5. Závěr

Z výsledků této práce vyplývají následující závěry:

- metodou CZE s bezkontaktní vodivostní detekcí je možné zároveň stanovit glukosamin a draselné kationty
- metoda nebyla primárně určena pro stopové analýzy, ale pro stanovení obsahu hlavní účinné složky, byl kladen důraz na vysokou opakovatelnost a rychlost metody
- kapilára měla vnitřní průměr 50 μ m, celkovou délku 75cm, efektivní délku k detektoru 27cm
- optimální podmínky pro stanovení jsou 30mM acetátový pufr o pH = 5,2 upravovaném pomocí 0,1M NaOH, 30kV 25°C, nástřik při tlaku 50mbar 6sekund
- při těchto podmínkách netrvá analýza déle než 3 minuty, vč. promývání kapiláry a nástřiku vzorku méně než 10 minut
- migrační časy analytů byly 1,0 minuty pro K⁺; 1,4 minuty pro ethanolamin; 1,8 minut pro glukosamin
- rozlišení analytů je dostatečné, pohybovalo se v hodnotách v rozmezí 4,5 až 7,0, separace byla dostatečně účinná
- množství teoretických pater N se pohybuje v rozmezí 12 000 až 32 900
- pro zajištění reprodukovatelných migračních časů je potřeba před každou analýzou kondicionovat kapiláru roztokem 0,1M NaOH a poté roztokem elektrolytu
- jako vnitřní standard byl použit ethanolamin byla ověřena linearita metody na 5 různých koncentračních úrovních, každý vzorek stanoven 3x, korelační koeficienty r byly 0,9985 pro glukosamin a 0,9987 pro draselné kationty.
- opakovatelnost metody byla stanovena při dvou koncentracích standardu (100 a 200 μ g/ml) 3 po sobě následující dny, každá koncentrace 6x. Pro glukosamin bylo RSD časů i ploch počítané z 18 analýz nižší než 2%, pro draselné ionty nižší než 3%
- v přípravcích bylo nalezeno více než 90% deklarovaného obsahu s RSD nižší než 5% a správnost metody byla ověřena metodou standardního přídatku a referenční HPLC metodou
- RSD obsahu u mezidenní přesnosti bylo pro 15 různých navážek pro 3 po sobě jdoucí dny celkově nižší než 2,5%

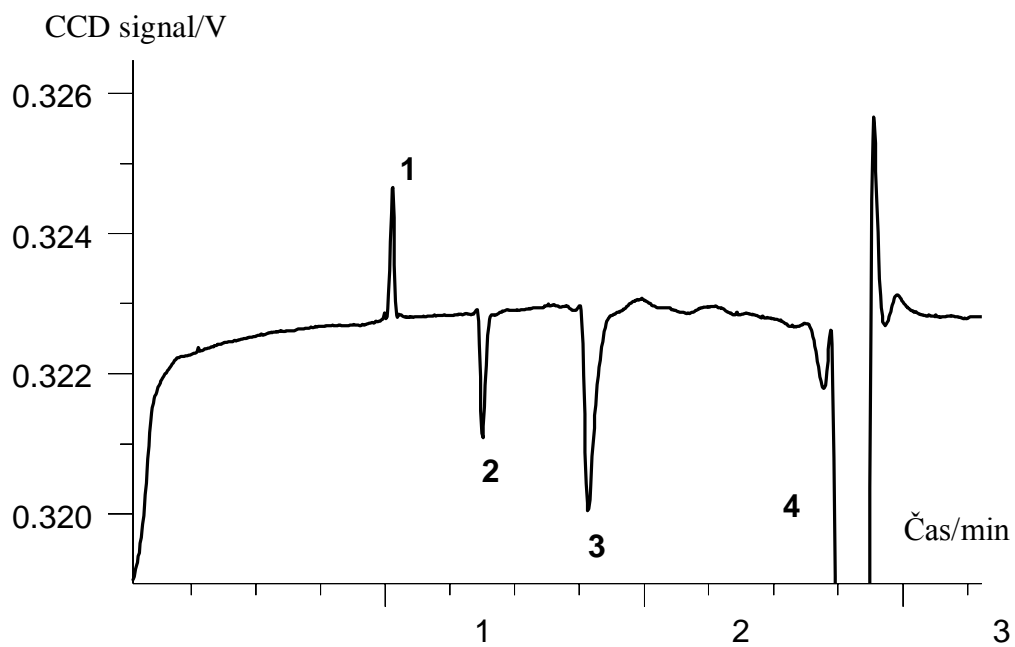
6. Seznam použité literatury

1. Gaš, B., Kapilární elektroforéza, *Vesmír* 80, 370, 2001/7
2. Český Lékopis 2002, Grada Publishing a.s., 2002
3. Baker, D.R., Capillary electrophoresis, John Wiley & Sons Inc New York, 1995
4. Users Manual, Programmable Inejctor for Capillary Electrophoresis, Prince Technologies B.V., 1999
5. Karlíček, R., a kolektiv, Analytická chemie pro farmaceuty, Nakladatelství Karolinum 2001
6. Galceran, M.T., Carneiro, M.C., Diez, M., a Puignou, L., Separation of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *J. Chromatogr.* 1997, 782:289-295
7. Šolínová, V., Kasička, V., Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 2006, 29:1743-1762
8. Kubáň, P., Hauser, P.C., Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis, *Electroanalysis* 2004, 16:2009-2021
9. Ryvolová, M., Táborský P., Vrábel P., Havel J., Preisler J., Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze, *Chem. Listy* 2006, 100:191-195
10. Databáze léčiv AISLP, SPC přípravku GOOL, verze 2008.1
11. The United States Pharmacopeia 30, The United States Pharmacopeial convention, Rockville, MD, 2007
12. Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H.M., Complexation on the Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 1991, 63:1541-1547
13. Skelley, A.M., Mathies, R.A., Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2006, 1132:304-309
14. Soga, T., Heiger, D.N., Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.* 1998, 261:73-78
15. Shao, Y., Alluri, R., Mummert, M., Koetter, U., Lech, S., A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35:625-631.

16. Carvalho, A.Z., da Silva, J.A.F., do Lago, C.L., Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 2003, 24:2138-2143
17. Eckschlager, K., Chyby chemických rozborů, SNTL Praha 1971

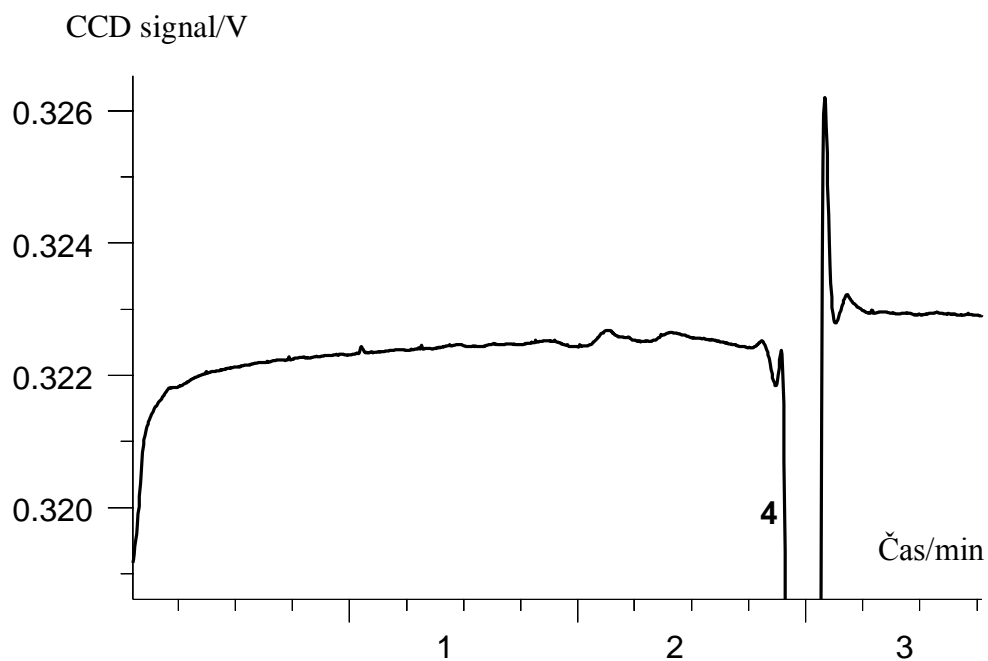
7. Přílohy

7.1 Elektroforeogramy



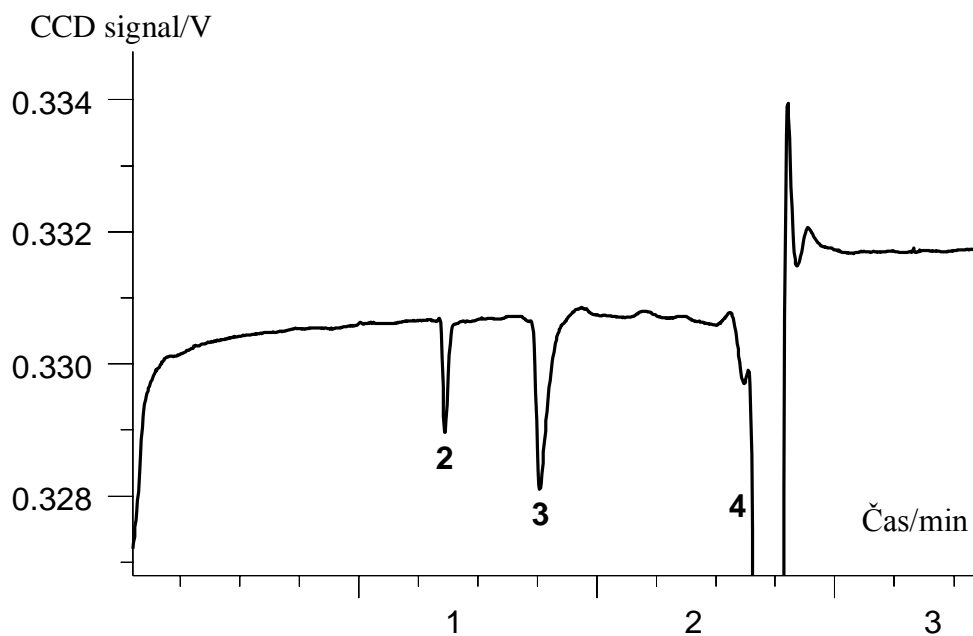
Obr. 10.: Elektroforeogram standardu za optimálních podmínek

Legenda: 1 = K^+ ionty, 2 = IS, 3 = glukosamin, 4 = EOF



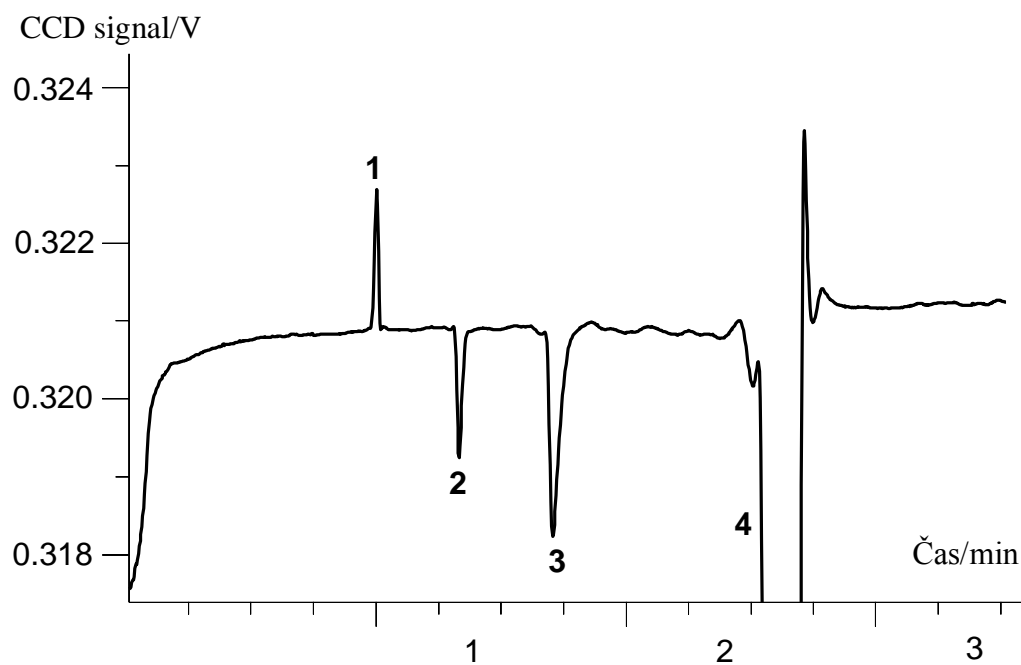
Obr. 11.: Elektroforeogram slepého vzorku za optimálních podmínek

Legenda viz obrázek 10.



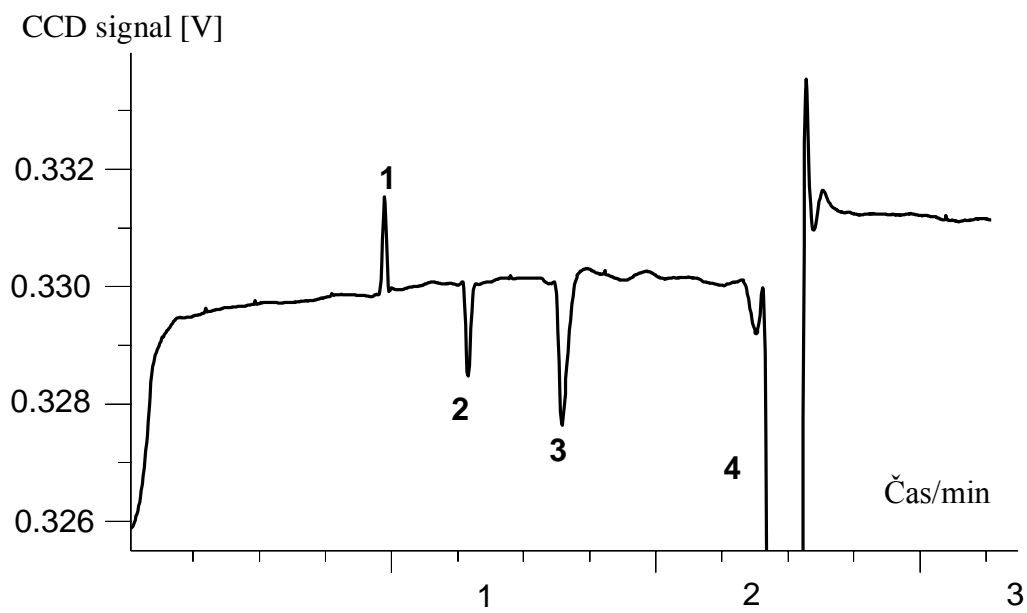
Obr. 12.: Elektroforeogram přípravku B

Legenda viz obrázek 10.



Obr. 13.: Elektroforeogram přípravku C

Legenda viz obrázek 10.



Obr. 14.: Elektroforeogram přípravku D

Legenda viz obrázek 10.

7.1 Abstrakty

7.1.1 Stanovení glukosaminu metodou kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí

Byla navržena nová CE metoda s bezkontaktní vodivostní detekcí pro analýzu glukosaminu a draselných kationtů v léčivých přípravcích. S optimálními podmínkami (elektrolyt 30mM tlumivý roztok kyseliny octové o pH = 5,2; napětí 30kV; 25°C) glukosamin (migrující jako volná base) byl dostatečně separován od draselných kationtů, které se mohou v přípravcích objevit jako pomocná látka. Analýza byla vykonána v křemíkové kapiláře (50 μ m vnitřní průměr, 75cm celková délka, 27 cm k detektoru) a trvala méně než 3 minuty. Kalibrační závislosti byly lineární jak pro glukosamin (100 - 300 μ g/ml; R2 = 0.997) tak pro K⁺ ionty (15 - 75 μ g/ml; R2 = 0.997) při použití ethanolaminu (100 μ g/ml) jako vnitřního standardu. Hodnoty LOD (S/N = 3) byly 9,3 μ g/ml pro glukosamin a 2,9 μ g/ml pro K⁺. Metoda byla použita pro různé lékové formy. Mezidenní přesnost byla stanovena 3 po sobě následující dny, pro celkem 15 navážek bylo RSD ploch glukosaminu 2,35%. Správnost metody byla potvrzena standardním přídatkem (poměr přídavek/nalezené množství se pohyboval v hodnotách 94,6 až 103,3%) a referenční HPLC metodou.

7.1.2. Determination of glucosamine using capillary zone electrophoresis with conductivity contactless detection

A novel CE method with contactless conductivity detection suitable for the determination of glucosamine and K⁺ in pharmaceuticals was devised. Under the optimum conditions (aqueous 30 mM acetate buffer of pH 5.2 as the background electrolyte; voltage 30 kV; 25 °C) glucosamine (migrating as glucosaminium cation) was well separated from K⁺ that could occur in the dosage forms as excipient. The CE analysis was performed in fused-silica capillaries (50 μ m i.d., 75 cm total length, 27 cm to detector) and the separation took < 3 min. The calibration graphs were linear for both glucosamine (100 - 300 μ g/ml; r^2 = 0.997) and K⁺ (15 - 75 μ g/ml; r^2 = 0.997) when using ethanolamine (100 μ g/ml) as the internal standard. The LOD values (S/N = 3) were 9.3 μ g/ml for glucosamine and 2.9 μ g/ml for K⁺. The method was applied to the assay of glucosamine content in various dosage forms. Intermediate precision evaluated by determining the content of glucosamine in a single formulation on 3 consecutive days was characterized by RSD 2.35% (n=15). Acceptable accuracy of the CE method was confirmed by the added/found glucosamine recovery experiments (recoveries 94.6-103.3%) and by statistical comparison of the results attained by the proposed CE and a reference HPLC method.