

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ
VYBRANÝCH MYORELAXANCIÍ
S VYUŽITÍM BEZKONTAKNÍ VODIVOSTNÍ
DETEKCE

Diplomová práce

Hradec Králové, 2011

Veronika Lužová

Velké poděkování patří doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a připomínky. Dále děkuji PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. a Mgr. Kláře Petřů za jejich nápady, vstřícné jednání, ochotu a pomoc.

Obsah:

1. Úvod	6
1.1. Úvod	7
1.2. Cíl a popis zadání práce	7
2. Teoretická část	8
2.1. Elektroforetické migrační metody	9
2.1.1. Úvod a teorie	9
2.1.2. Princip kapilární zónové elektroforézy	17
2.1.3. Užití cyklodextrinů	19
2.2. Metody detekce	20
2.2.1. Detekce užívané u CZE	20
2.2.2. Princip bezkontaktní vodivostní detekce	22
2.3. Pankuronium a Vekuronium	24
2.3.1. Základní údaje o analytech	24
2.3.2. Farmakologické vlastnosti analytů	25
2.3.3. Publikované metody stanovení myorelaxancií	26
3. Experimentální část	28
3.1. Přístroje a pomůcky	29
3.2. Chemikálie a roztoky	29
3.2.1. Chemikálie	29
3.2.2. Příprava roztoků	30
3.3. Elektrolyty, vnitřní standardy a cyklodextriny	32
3.3.1. Elektrolyty	32
3.3.2. Vnitřní standard (IS)	33
3.3.3. Cyklodextrin	33
3.3.4. Organická rozpouštědla	34

3.4. Pracovní a výpočetní postupy	34
3.4.1. Pracovní postup	34
3.4.2. Validace	35
3.4.2.1. Linearita	35
3.4.2.2. Rozsah	36
3.4.2.3. LOD a LOQ	36
3.4.2.4. Přesnost	36
3.4.2.5. Správnost	37
3.4.2.6. Stanovení obsahu	37
4. Výsledky a diskuze	39
4.1. Výběr elektrolytu, cyklodextrinu a vnitřního standardu	40
4.1.1. Elektrolyty	40
4.1.2. Vnitřní standard (IS)	42
4.1.3. Cyklodextrin	43
4.1.4. Organická rozpouštědla	46
4.2. Optimalizace metody	46
4.2.1. Optimalizace elektrolytu	46
4.2.2. Optimalizace dalších podmínek	50
4.3. Validace	55
4.3.1. Linearita	55
4.3.2. Rozsah	56
4.3.3. LOD a LOQ	56
4.3.4. Přesnost	57
4.3.5. Správnost	58
4.3.6. Stanovení obsahu	58
5. Závěr	60
5.1. Shrnutí závěru práce	61
5.2. Abstrakt	62

6. Seznam zkratek	63
7. Literatura a použité zdroje	65

1. Úvod

1.1. Úvod

Každý den se díky farmaceutickému výzkumu a následně průmyslu vyvíjí nové potenciální léčivé látky. Souběžně s tímto výzkumem jde i vývoj analytických metod, který se snaží zajistit, aby tyto léčivé látky byly kvalitní, účinné a bezpečné. Je důležité, snažit se tyto metody vyvíjet tak, aby se kvalita i kvantita stanovovaných látek určila co nejpřesněji, v pokud možno krátkém čase a za použití nízkých nákladů. Mezi instrumentální metody, které splňují tyto požadavky, patří elektromigrační separační metody.

První zmínky o elektromigračních metodách jsou z 40. let minulého století. Komerční využití elektroforézy bylo poprvé představeno o skoro 40 let později. Největší expanze kapilární elektroforézy začala v devadesátých letech 20. století, kdy byl uveden na trh první analyzátor, fungující na principu kapilární elektroforézy. Od té doby se tato metoda neustále rozvíjí a užívá v různých oblastech nejen vědeckého výzkumu. Vývoj elektroforetických metod je rychlý a perspektivní, v porovnání s vysoce-účinnou kapalinovou chromatografií je v praxi minoritní, přesto se v některých případech jeví jako výhodnější metoda. Jelikož pankuronium i vekuronium mají kladný náboj, bylo výhodné pro jejich stanovení použít metodu kapilární elektroforézy.

Stanovení vybraných myorelaxancií, pomocí kapilární elektroforézy, je v začátcích. Zvláště u vekuronia doposud nebyla publikována žádná kapilárně elektroforetická metoda, která by se jeho stanovením v léčivých přípravcích zabývala. Molekuly pankuronium a vekuronium neobsahují žádný chromofor (neabsorbují v UV-VIS oblasti) a proto nemohou být detekovány spektrofotometrickými či luminiscenčními metodami. MS detektory jsou značně nákladné a ne každá laboratoř si může dovolit jejich pořízení. Z těchto důvodů se nabízí, jako potenciálně vhodná, bezkontaktní vodivostní detekce.

1.2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení vybraných analytů (bromidu pankuronium, bromidu vekuronium) v běžně dostupných farmaceutických přípravcích Pavulon a Norcuron.

2. Teoretická část

2.1. Elektroforetické migrační metody

2.1.1. Úvod a teorie

U elektromigračních metod dochází k separaci díky dvěma základním elektrokinetickým jevům – elektroforézy a elektroosmózy. Separace se uskutečňuje v prostředí, které tvoří roztok (elektrolyt) s nabitými částicemi a pevný povrch (stěna kapiláry). Působením elektrického pole dojde k porušení rovnováhy tohoto prostředí a posléze k určitému rozdělení nábojů a zároveň jejich pohybu. Každá nabitá částice se liší v určitém prostředí svou elektroforetickou pohyblivostí. Migrační rychlost částic je různá a proto dojde k fyzické separaci těchto iontů. Působení elektrického pole vyvolá výše zmiňované jevy: *elektroforéza* – kdy dochází k pohybu iontů k opačně nabitě elektrodě a *elektroosmóza* – kdy se molekuly vody základního elektrolytu přítomného v křemenné kapiláře pohybují k záporně nabitě elektrodě. [1]

Arne Tiselius získal v roce 1948 Nobelovu cenu za své experimenty s využitím metody elektroforézy. Velký průlom v kapilární elektroforéze udělal Jorgenson a spol., kteří zavedli do analytické praxe křemenné kapiláry. [2]

V současné době existuje několik typů elektromigračních separačních metod. Fungují na principu elektroforézy či její kombinace s elektroosmózou, eventuelně s jevy, využívanými v kapalinové chromatografii.

Mezi kapilární elektromigrační separační metody patří [1] :

- Kapilární zónová elektroforéza
- Kapilární gelová elektroforéza
- Kapilární izotachoforéza
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
- Kapilární isoelektrická fokusace
- Kapilární elektrochromatografie
- Elektroforéza v nevodném prostředí

Elektroforéza

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. [1]

Máme-li v tomto elektrickém poli směs iontů, budou kationty (částice s kladným nábojem) působením elektroforézy putovat ke katodě (záporná elektroda) a anionty (částice se záporným nábojem) k anodě (kladná elektroda). Neutrální částice se vlivem elektrického pole sice pohybovat nebudou, ale budou poháněny elektroosmotickým tokem. Čím větší náboj částice bude mít, tím bude její elektroforetická pohyblivost rychlejší, čím větší bude velikost částic, tím její pohyblivost bude menší, jelikož bude muset překonávat větší odpor prostředí. [3]

Elektroosmotický tok

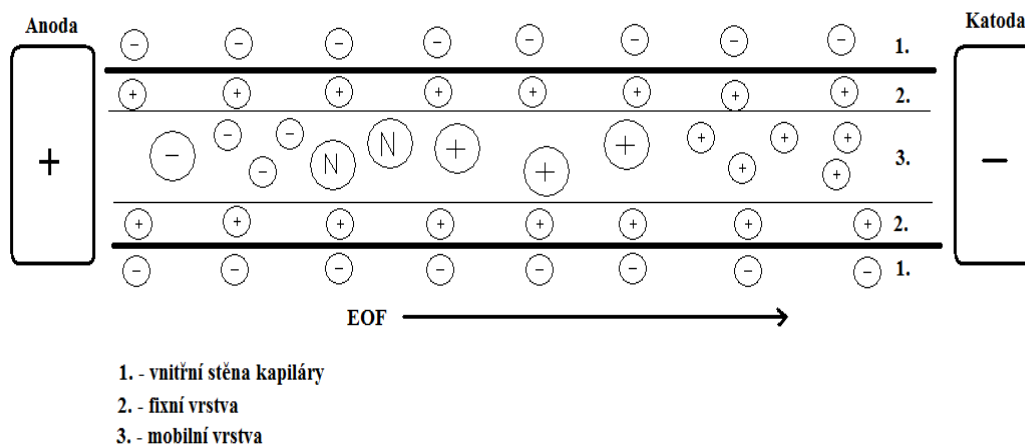
Elektroosmotický tok neboli elektroosmóza (EOF) je jedna z hybných sil kapilární elektroforézy. Při dostatečně vysokém pH základního elektrolytu dochází k ionizaci silanolových skupin na vnitřní straně křemenné kapiláry. Tím získává tato stěna negativní náboj. [3]

Na negativně nabitou vnitřní stěnu kapiláry se vážou kationty z elektrolytu a společně vytváří fixní vrstvu. Kationty vyskytující se ve větší vzdálenosti od silanolových skupin se na stěnu kapiláry nemohou navázat. Vytvářejí tzv. mobilní vrstvu; ta putuje ke katodě a vyvolá tak tok celého roztoku (EOF) přítomného v kapiláře. Mezi fixní a mobilní vrstvou však vzniká časem nerovnováha a ta se vyjádří jako zeta potenciál ζ . [3]

Rychlost EOF lze pak díky zeta potenciálu vyjádřit takto:

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

kde ε je dielektrická konstanta elektrolytu, ζ je zeta potenciál, E je intenzita elektrického pole a η charakterizuje viskozitu elektrolytu. [1]



Obrázek 1.: Princip elektroosmotického toku

Na EOF mají vliv následující faktory, kterými můžeme vlastnosti elektroosmotického toku upravovat [3,5,6].:

Instrumentální parametry:

Aplikované napětí

Čím je vyšší napětí, tím je vyšší i rychlost EOF a vlastní migrace analytů, následkem toho se celková doba analýzy zkracuje. Nevýhodou zvyšování napětí je i přímo úměrné zvyšování intenzity proudu. Vzniká tak Joulovo teplo, které zhoršuje výsledky analýzy (možnost tepelného rozkladu vzorku, rozšíření píků a špatná reprodukovatelnost migračních časů).

Teplota

S růstem teploty klesá viskozita elektrolytu, tudíž se ve výsledku zvýší rychlost EOF a celkové separace. Teplota má vliv i na dielektrickou konstantu, ale vliv na viskozitu je mnohem důležitější.

Parametry elektrolytu:

pH

S rostoucím pH se zvyšuje rychlost EOF a migrace analytů, díky tomu se celková doba analýzy zkracuje. Pokud je však pH nižší než 2, nedochází ke vzniku EOF, jelikož je vnitřní povrch kapiláry zcela protonizován. Změna pH ovlivňuje jak EOF, tak i pohyblivost iontů, proto je velmi důležitým parametrem, jenž je obvykle optimalizován pro dosažení separace analytů.

Koncentrace elektrolytu a iontová síla

Čím je koncentrace elektrolytu vyšší, tím více se snižuje zeta potenciál a následně EOF. Vysoká iontová síla může vyvolat zvýšení intenzity proudu a nadměrný růst Joulova tepla. Výhodnější jsou nižší koncentrace elektrolytu, ale nesmí negativně ovlivnit separaci (hrozí asymetrie a rozšíření píků nebo nestabilita elektrického pole).

Organická rozpouštědla

Organická rozpouštědla většinou snižují EOF, záleží ovšem na množství a typu přidávaného rozpouštědla. Mají vliv na několik faktorů separace (viskozita, zeta potenciál, rozpustnost a ionizace analytů), proto je obtížné spolehlivě předpovědět výsledek separace po přidání těchto rozpouštědel.

Povrchově aktivní látky

Adsorbují se na stěnu kapiláry díky existenci hydrofobních či hydrofilních interakcí. Anionické tenzidy zrychlují EOF, kationické látky zpomalují či obracejí EOF.

Neutrální hydrofobní polymery

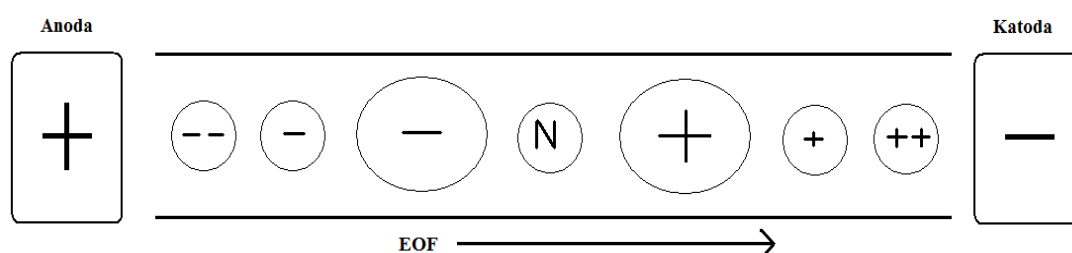
Adsorbují se na stěnu kapiláry pomocí hydrofobních vazeb, dochází tak ke změně povrchového náboje stěny kapiláry a zvýšení viskozity. Ve výsledku je zpomalen EOF.

Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost je rychlost pohybu nabité částice v elektrickém poli. Je zřejmé, že během separace rychleji migrují ionty, které mají pohyblivost větší. Částice s menší pohyblivostí se zpožďují a tím dochází k jejich oddělení od iontů s vyšší pohyblivostí. Na ionty působí dvě síly a to elektrická síla a odpor viskózního prostředí, který jejich rychlost brzdí. [2]

Pohyblivost se dá ovlivňovat různými faktory, z nichž důležitým je pH. pH ovlivňuje například iontovou formu slabých kyselin či zásad. Změnou pH můžeme ovlivňovat jejich migraci a následnou separaci. [2]

Rychlost tohoto pohybu částic závisí na jejich poměru náboj/hmotnost, jak je názorně uvedeno na obrázku č. 2.



Obrázek 2.: Princip pohyblivosti nabitých iontů v el. poli

Vztah pro výpočet rychlosti elektroforetického pohybu se dá vyjádřit následujícím vzorcem:

$$V_e = (Q/6 \pi \eta r) \cdot (V/L)$$

kde V_e je rychlost elektroforetického pohybu, Q je náboj rozpuštěné látky, η je viskozita elektrolytu, r charakterizuje velikost molekuly, V je vložené napětí a L je celková délka kapiláry. [6]

Jelikož elektroforetickou pohyblivost nelze přímo experimentálně zjistit, byl zaveden parametr migrační čas. Ten lze experimentálně zjistit přímo a z něj lze vypočítat elektroforetickou pohyblivost. Mezi další separační parametry patří účinnost, selektivita a rozlišení. Tyto parametry jsou ovlivněny různými instrumentálními

parametry, jako např. délkou kapiláry, vloženým napětím, EOF a samotnou elektroforetickou pohyblivostí. Zde je uveden přehled zmíněných separačních parametrů. [2,6]

Migrační čas

Je čas, který látka potřebuje k pohybu z místa nástřiku do místa, kde je vložena detekční cela. Tato vzdálenost se nazývá efektivní délka kapiláry. Takže čím je EOF rychlejší a kapilára kratší, tím kratší bude migrační čas.

Účinnost

Je podobně jako u chromatografických metod vyjádřena počtem teoretických pater. Čím jsou píky užší a migrační čas vyšší, tím je i vyšší účinnost.

Rozlišení

Je velmi důležitý separační parametr. Informuje nás o tom, zdali jsou analyty od sebe dobře separovány, či nikoliv. Definuje se pomocí migračních časů dvou sousedních analytů a šířky jejich píků.

Typy elektroforetických separačních metod.

- *Kapilární izotachoforéza*

Při izotachoforéze se na rozdíl od elektroforézy užívají elektrolyty dva. Elektrolyt vedoucí (v katodovém prostoru nebo naopak) a elektrolyt koncový (v anodovém prostoru či naopak). Vedoucí elektrolyt obsahuje ion, jenž má větší elektroforetickou pohyblivost, než všechny analyty ve vzorku. Koncový elektrolyt obsahuje hlavně koncový ion, který má tuto pohyblivost nejmenší. Po zavedení stejnosměrného proudu, vzrůstá intenzita elektrického pole od iontu vedoucího až k iontu koncovému. Jednotlivé zóny analytů se dotýkají, rozhraní mezi sousedními zónami je ostré v důsledku existence samozaostřujícího efektu. Po dosažení rovnovážného stavu zóny putují stejnou rychlostí. Dochází současně i k zakoncentrování analytů, což je velmi výhodné a této vlastnosti izotachoforézy se v praxi často využívá. Ve všech zónách jsou obsaženy i protiionty, z důvodu zachování

jejich elektroneutrality. Dochází ale pouze k separaci složek, které migrují jedním směrem, nelze tudíž zároveň stanovit anionty a kationty, ale pouze jen jednu skupinu z nich. [1,2]

- Kapilární gelová elektroforéza

Princip separace látek je na základě jejich pohyblivost v gelu (nejčastěji polyakrylamidový a agarosový), který se nachází v kapiláře. Díky vlastnostem gelu zde nevzniká elektroosmotický tok a proto, podobně jako u izotachoforézy, migruje k detektoru pouze jeden druh iontů (kationty či anionty). Gel zvyšuje rozdíly jednotlivých elektroforetických pohyblivostí a to hlavně větších molekul, které díky svým tvarům a velikostem různě migrují gelovými póry. Kapilární gelová elektroforéza se využívá zejména pro velké ionty, jakými jsou sacharidy, peptidy, bílkoviny, úseky DNA a RNA. V současné době je to v praxi nejpoužívanější elektroforetická metoda. [3,7]

- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

Je to metoda, která kombinací mechanismů elektroforetických a chromatografických metod dovoluje stanovovat i neutrální molekuly. Pracovní elektrolyt obsahuje ionogenní smáčedlo (tenzid) v takové koncentraci, aby mohly vzniknout micely (koncentrace tenzidu v základním elektrolytu musí být vyšší, než kritická micelární koncentrace). Molekuly jsou v micelách uspořádány tak, že hydrofobní část tvoří jádro a hydrofilní část je na povrchu micely. Ideální pH elektrolytu je v rozmezí neutrálního až zásaditého pH. Je to z toho důvodu, aby byl EOF výrazný. Nejčastěji používaným tenzidem je dodecylsírán sodný (SDS), který se řadí mezi anionogenní tenzidy. Dále do této skupiny patří např. žlučové kyseliny a jejich soli. Jako kationogenní tenzidy se v MEKC používají kvartérní amoniové soli. Pokud bychom chtěli snížit migrační rychlost micel, lze použít i neionogenní tenzidy. Záleží tedy na lipofilitě analytu a z toho plynoucí interakci analytu s micelami. Nejčastěji migrace probíhá následně. Nejdříve se detekuje EOF, posléze molekuly, které jen částečně interagují s micelami (záleží na jejich lipofilitě a náboji) a jako poslední migrují samotné micely. Čas mezi migrací EOF a samotných micel se nazývá retenční okno. Analytický systém, který se u micelární elektrokinetické kapilární chromatografie používá, je shodný se systémem kapilární zónové elektroforézy. Tato metoda není

vhodná k analýze příliš velkých molekul (bílkoviny). Užívá se však pro separaci různých typů analytů, například u neionogenních solutů, pesticidů, aminokyselin... [2,3]

- Kapilární isoelektrická fokusace

Je to elektroforetická metoda, která se užívá pro stanovení molekul s amfolytickým charakterem (proteinů, aminokyselin), které mohou obsahovat současně jak kladný, tak záporný náboj. Na migraci těchto sloučenin se podílí elektroforetická pohyblivost i gradient pH prostředí. Kapilára obsahuje pufr s pH gradientem, který se během separace nemění. Jakmile se izoelektrický bod vyrovná pH gradientu pufru, stane se analyt navenek nenabitou molekulou a přestane tak migrovat. Při této rovnováze dochází i k zakoncentrování analytu. Po ukončení separačního procesu se analyty posunou k detektoru obvykle působením hydrodynamického tlaku. Pro lepší průběh fokusace se upravuje vnitřní stěna kapiláry, například jejím pokrytím polyakrylamidem či methylcelulózou. Zabrání se narušení migračního procesu elektroosmotickým tokem. [2,3]

- Kapilární elektrochromatografie

Je další nadějná a rychle se rozvíjející metoda, která kombinuje separační mechanismus kapilární elektroforézy a vysoce účinné kapalinové chromatografie. Jsou zde používány kapilární kolony náplňové kolony nebo kapiláry, ve kterých je stacionární fáze fixována na vnitřním povrchu kapiláry. Pohyb elektrolytu v kapiláře je aktivován elektrickým polem a následným vznikem EOF. Je to vysoce účinná a jednoduchá metoda. Analyty jsou od sebe odděleny na základě rozdílných interakcí mezi stacionární a mobilní fází. Ionizované látky se pohybují i na základě jejich vlastní elektroforetické pohyblivosti. Díky konstantní rychlosti pohybu elektrolytu v celém průřezu kapiláry se zóny analytů během separace prakticky nerozmývají a je tak zajištěna vyšší separační účinnost ve srovnání s HPLC. Kapilární elektrochromatografie není vhodná pro analýzu vzorků, které by se mohly adsorbovat na stěnu kapiláry (proteiny a jiné makromolekuly). [1,3]

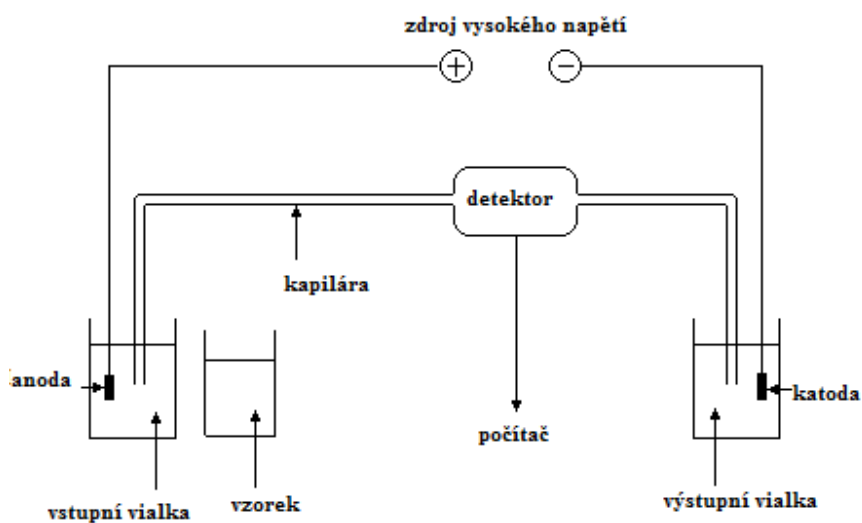
- Elektroforéza v nevodném prostředí

Jedná se o typ elektroforetické metody, který je podobný kapilární zónové elektroforéze. Umožňuje navíc separaci obtížně separovatelných látek, které jsou nerozpustné ve vodném prostředí – málo polárních látek. Patří sem některá léčiva, například beta blokátory či antidiabetika. Během posledních let význam této metody roste, ale nadále je její užití v praxi minoritní. Jako elektrolyt se často využívá kyselina octová, či mravenčí a to hlavně při separaci bazických analytů. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla patří methanol, ethanol či acetonitril nebo jejich směsi. Rozpouštědla však musí být kompatibilní s materiálem kapiláry a detektorem. Tato rozpouštědla mají vysokou těkavost a nízké povrchové napětí, proto je ideální kombinace tohoto typu elektroforézy s MS detekcí (snadné odpaření rozpouštědla), lze ji však využít i ve spojení s UV detektorem. [8,9]

2.1.2. Princip kapilární zónové elektroforézy

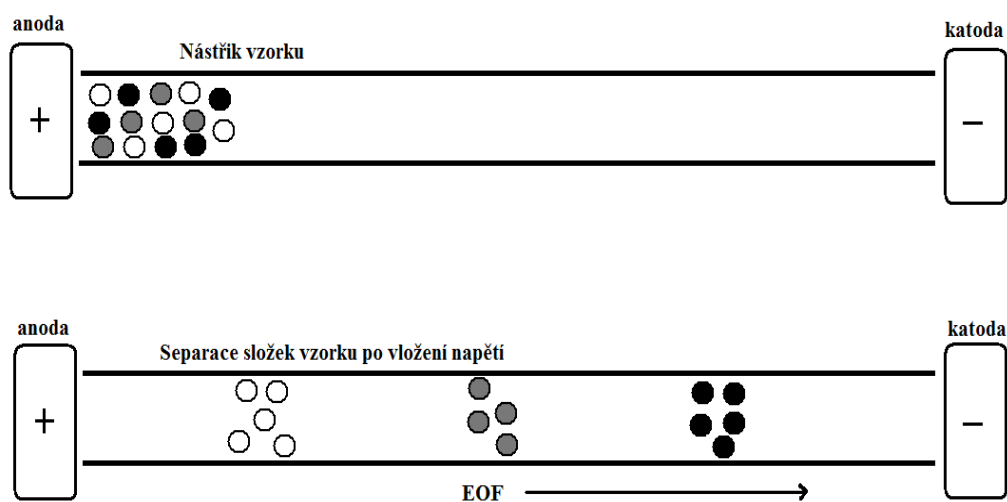
Tato metoda se řadí mezi významné a v praxi často aplikované elektromigrační metody. Díky ní mohou být analyzovány vzorky různého původu, např. aminokyseliny, peptidy, různé proteiny, nukleotidy, léčiva a složky tělních tekutin, potravin a jiných průmyslových látek. Umožňuje separaci kationtů i aniontů během jednoho měření. Funguje na principu kapilární elektroforézy a i zde se uplatňují výše zmíněné jevy, elektroosmóza a elektroforetická pohyblivost. [2]

Separční prostředí tvoří kapilára obsahující elektrolyt. Kapilára je vložena jedním koncem do vstupní vialky (nádobky) s elektrolytem a druhým koncem do výstupní vialky, obsahující stejný elektrolyt. V těchto nádobkách jsou zároveň umístěny i elektrody, které jsou zapojeny ke zdroji vysokého napětí.



Obrázek 3.: Instrumentální uspořádání pro CZE

Po nástřiku vzorku a vložení stejnosměrného napětí začne probíhat separace. Při průchodu zóny analytu detekční celou poskytne detektor signál úměrný koncentraci analytu. Tento signál je zaznamenán a vyhodnocen počítačem s využitím vhodného programu. Nejčastěji se provádí on-line detekce tzn., že signál je získáván při průchodu zóny analytu detekčním oknem přímo v kapiláře. Užití derivatizace je méně časté. Mezi nejpoužívanější typy detekce patří spektrofotometrická UV detekce, fluorescence indukovaná laserem, hmotově spektrometrická detekce, amperometrie a konduktometrie. [2]

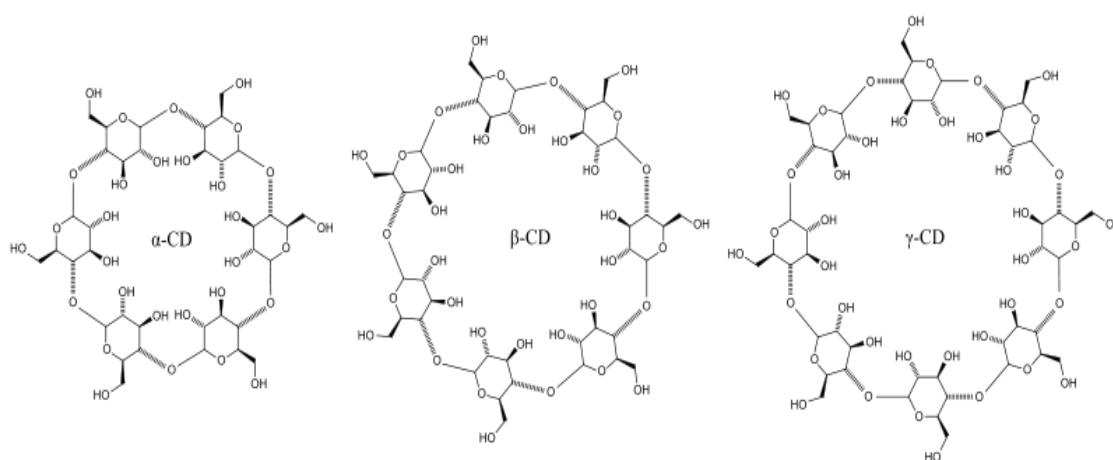


Obrázek 4.: Klasická separace metodou CZE

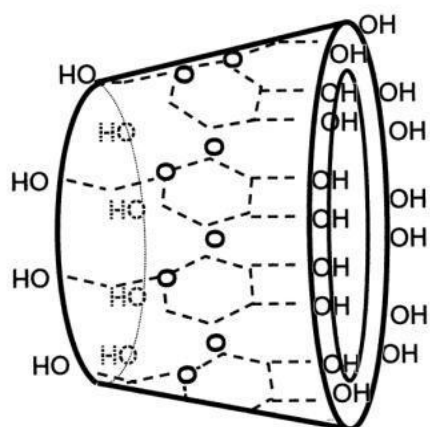
Jelikož samotné křemenné kapiláry jsou velmi křehké, pro zvýšení jejich odolnosti a zlepšení pružnosti se potahují polymerem. Separční kapilára musí být umístěna v dostatečně teplotně stabilním prostředí, jelikož i menší výkyvy teploty mohou nepříznivě ovlivnit výsledky analýzy. Mezi nejčastější způsoby dávkování vzorku patří dávkování elektrokinetické a hydrodynamické. U elektrokinetického dávkování se potřebné množství vzorku dostane do kapiláry díky vložení napětí, které je většinou nižší, než napětí potřebné k separaci. Častěji se však užívá dávkování hydrodynamické, které se uskutečňuje pomocí tlaku či vakua. [2,3,4]

2.1.3. Užití cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou cyklické dextriny (oligosacharidy), které se skládají z 6-8 molekul α -1,4-D-glukopyranosových jednotek. Vznikají enzymatickou degradací škrobu glukosyltransferasami bakteriálního původu (*Bacillus macerans*). Poprvé byly izolovány a popsány v roce 1891 A. Villiersem. Dalších přibližně 40 let trvalo, než byla popsána jejich přesná struktura. Cyklodextriny tvoří dutý válec, jehož jádro se skládá z hydrofobních molekul a na jeho obvodu jsou přítomny hydroxylové skupiny. Mají nízkou toxicitu a schopnost vytvářet s lipofilními molekulami různé komplexy. Díky této vlastnosti jsou velmi často užívány v praxi v různých oblastech (kosmetickém, farmaceutickém, potravinářském, chemickém průmyslu, supramolekulární chemii a v oblasti životního prostředí). Pro zlepšení komplexotvorných i katalytických vlastností a jejich rozpustnosti jsou přírodní cyklodextriny různě chemicky upravovány. [2,10,11]



Obrázek 5.: Struktura cyklodextrinů [10]



Obrázek 6.: Prostorové uspořádání γ -cyklodextrinu [10]

Jelikož hydroxylové skupiny na povrchu jsou chirální, vytváří cyklodextriny s chirálními analyty komplexy lišící se stabilitou a to umožňuje jejich separaci. Důležitou jejich schopností je tvořit inkluzní komplexy – do cyklodextrinové kavity (hostitel) je okludována organická či anorganická molekula (host). Jejich vhodnou úpravou lze zlepšit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Inkluzní komplexy nativních cyklodextrinů a nepolárních látek jsou zpravidla ve vodě málo rozpustné, zatímco hydroxyalkylderiváty cyklodextrinů tvoří ve vodě dobře rozpustné komplexy i s parafíny. V současnosti jsou ve farmaceutickém průmyslu běžně využívány inkluzní komplexy nativních cyklodextrinů s řadou léčiv pro zlepšení jejich biodostupnosti. [2,11]

2.2. Metody detekce

2.2.1. Detekce užívané u CZE

Jelikož průměr separační kapiláry je relativně malý a analyty jsou do ní nastříkovány ve velmi malém množství, je potřeba, aby detektory byly velmi citlivé. Nejběžnější detekce je tzv. on-line (detekuje analyt přímo v kapiláře). Užití derivatizace analytu po průchodu kapilárou je méně časté a zároveň časově náročnější. [2]

Nejčastěji užívanou a univerzální detekční metodou v kapilární elektroforéze je UV-VIS detekce (absorpce elektromagnetického záření v rozmezí od 200-800nm).

Většina stanovovaných látek biologického původu absorbuje UV-VIS záření a je proto touto metodou dobře detekovatelná. Samotná UV detekce může být přímá či nepřímá. Přímá – analyty absorbují UV záření. Nepřímá – analyty neabsorbují UV záření a je třeba, aby pracovní elektrolyt obsahoval ion, který v UV oblasti absorbuje. Záznam detekce (elektroforegram) vyjadřuje závislost absorbance při dané vlnové délce na čase. [2,12]

V současné době je již většina komerčně dostupných přístrojů vybavena diode-array detekcí (DAD). Polychromatický paprsek světla je po průchodu kapilárou rozložen na jednotlivé pásy. Každý tento pás je detekován jednou fotodiodou. Výsledkem analýzy je trojrozměrný elektroforegram. [2]

Mezi další často užívané detekce patří např. detekce založená na laserem indukované fluorescenci (LIF), hmotnostní spektrometrii, amperometrii, refraktometrii či detekce vodivosti, o které bude pojednáno v následující kapitole.

LIF patří mezi necitlivější metody detekce v CZE. Většina stanovovaných látek však neobsahuje fluorofor, proto je potřeba je ještě před analýzou derivatizovat fluorescenčními činidly (fluoreskamin, dansylchlorid...) Stanovované látky lze stanovit i nepřímo na podobném principu jako u UV detekce. Nevýhodou této metody je její finanční nákladnost. [2]

Hmotnostní spektrofotometrie (MS) studuje ionty v plynném stavu. Využívá separace iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboji (m/z) a měří jednotlivě separované ionty. Je to metoda destrukční, která však nabízí strukturní informace. Největší význam má ionizace elektroprayem. Výhodné je její užití s elektroforézou v nevodném prostředí. [2,13]

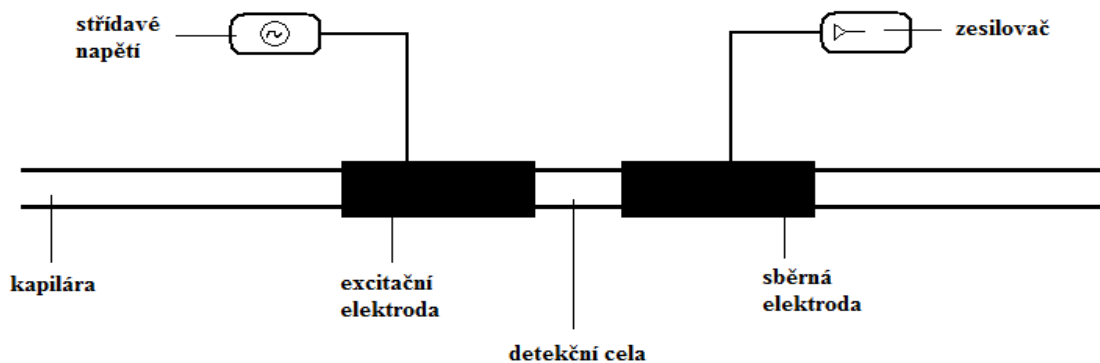
Tabulka 1.: Přehled nejčastějších detekčních metod v CZE [4]

Druh detekce	Hmotnostní det. limit (mol)	Koncentrační det. limit (mol/l)
UV-VIS	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$
Vodivost	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
LIF	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-14} - 10^{-16}$
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$
MS	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$

Nepřímá UV, fluorescence a amperometrie	potřeba 10 – 100 vyšší koncentrace analytu než u přímé metody
---	---

2.2.1. Bezkontaktní vodivostní detekce

První zmínky o bezkontaktní vodivostní detekci (CCD) jsou známé od roku 1950, kdy byla použita při titračních analýzách. První zmínky užití CCD u elektromigračních metod se datují k roku 1980 a to jako detektor u izotachoforézy. Je to univerzální metoda pro CE, atraktivní obzvláště pro anorganické a organické ionty, které jsou špatně měřitelné optickými detekčními metodami. Nabízí tak vhodnější variantu volby detektoru, oproti užití rozsáhlých nepřímých derivatizací či použití drahé MS detekce. Využívá se např. při analýzách potravin, nebo i při analýzách chirálních látek, jelikož je schopna analyzovat enantiomery. Svou jednoduchostí a malými rozměry je ideální pro přenosnou polní instrumentaci. Hoffmann a spol. před pár lety ohlásili použití miniaturního nástroje, který je založen na principu na lab-on-a-chip zařízení. V CE se tento detektor užívá přibližně 15let, ale využití tohoto detektoru díky jeho výhodám rok od roku roste. Detektor tvoří dvě za sebou umístěné elektrody, které obklopují kapiláru. Tyto elektrody nejsou v přímém kontaktu s elektrolytem. Mezera mezi nimi vytváří detekční celou. Střídavý proud přiváděný na excitační elektrodu prochází detekční celou a je snímán na sběrné elektrodě. Následně je veden do zesilovače a změřen. Změna obsahu cely se projeví změnou vodivosti, která se projeví změnou proudu. Z rovnice $I = G \cdot U$ plyne, že pokud bude vloženo konstantní napětí, tak měřením proudu I můžeme zjistit změny vodivosti G . Celková schopnost analýzy detektoru závisí na rozdílných vodivostech analytu a základního elektrolytu, jehož výběr je pro CE velmi zásadní. Výhodou je vysoká citlivost detekce a to až 10^{-7} - 10^{-8} mol/l. [14,15,16]



Obrázek 7.: Schéma uspořádání bezkontaktního vodivostního detektoru

Ačkoli výhod k užití CCD detektoru je jednoznačně více než nevýhod, nesmí být nevýhody opomíjeny.

Tabulka 2.: Výhody a nevýhody bezkontaktní vodivostní detekce [16]

výhody	nevýhody
minimální údržba	teplotní citlivost, která může vést k nestabilní základní linii
nízké náklady	příležitostné artefakty
snadná a jednoduchá obsluha	nelze použít přísady, které mají vysoký náboj (sulfatované cyklodextriny)
kompatibilita s CE	absorpce CO ₂ z ovzduší snižuje pH a ovlivní základní linii
komerčně dostupná	citlivá na iontové kontaminace (změny ve složení pufru způsobené vysokým napětím elektrod použitých pro elektrolýzu)
malé rozměry	
přesnost	
nízké požadavky na výkon	
vysoce citlivá u přímé detekce	
vhodná i pro IC, HPLC a FIA	

Kapilární elektroforéza v kombinaci s detektorem CCD nabízí možnost stanovení sloučenin, které neobsahují chromofory a to bez použití derivatizace. Mezi

tyto sloučeniny se řadí i analyty pankuronium a vekuronium, kterými se zabývá tato diplomová práce.

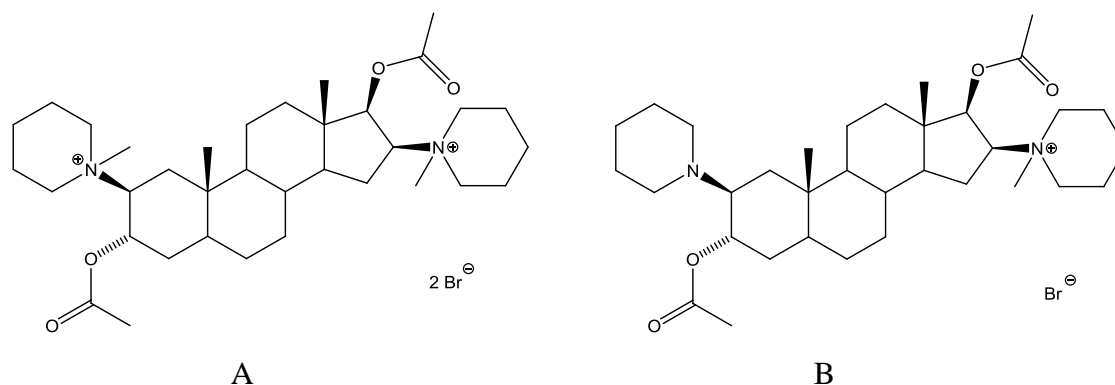
2.3. Pankuronium a Vekuronium

2.3.1. Základní údaje o analytech

Pancuronii bromidum (PMB) – *1,1'–[3 α ,17 β -bis(acetoxy)-5 α -androstan-2 β -16 β -diyl]bis(1-methylpiperidin-1-ium)-dibromid* – je bílý, žlutobílý či světle růžový krystalický hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný či snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu a snadno rozpustný v 96 % etanolu. Patří mezi separanda. [5]

Vecuronii bromidum (VMB) – *1–[3 α ,17 β -diacetoxy-2 β -(piperidin-1-yl)-5 α -androstan-16 β -yl]-1-methylpiperidin-1-ium-bromid* – jsou bílé, či téměř bílé krystaly či krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonitrilu a v bezvodém etanolu. Patří mezi venena. [5]

Pankuronium a vekuronium jsou kvartérní amoniové soli. Liší se počtem kvartérních dusíků, pankuronium obsahuje 2 kvartérní dusíky, vekuronium pouze jeden, což je základní předpoklad pro jejich separaci.



Obrázek 8.: Struktura pankuronium bromidu (A) a vekuronium bromidu (B)

Řadí se mezi nedepolarizující, kompetitivní, periferní myorelaxancia se steroidní strukturou (androstanový skelet). PMB je hlavní účinnou látkou přípravku Pavulon. Pavulon je u nás jediný registrovaný přípravek dostupný na českém trhu.

VMB je hlavní účinnou látku přípravku Norcuron, který je u nás opět jediný registrovaný přípravek, který je dostupný na českém trhu.

2.3.2. Farmakologické vlastnosti analytů

Mechanismus účinku kompetitivních nedepolarizujících myorelaxancií je v obsazování postsynaptických nikotinových receptorů. Jsou to kompetitivní antagonisté acetylcholinu, zabraňují tak jeho působení na vzniku akčního potenciálu svalové buňky a její následné kontrakci. Na hladké svalstvo ovšem nepůsobí. Dále působí na žírné buňky a proto tak mohou ovlivňovat uvolňování histaminu, který pak může způsobit bronchospasmus, či pruritus. Příkladem takového myorelaxancia přírodního původu je tubokurarin (Kurare – šípový jed jihoamerických Indiánů obsahující alkaloidy z rostlin druhu *Strychnos* a *Chondodendron*). Účinky nedepolarizujících myorelaxancií mohou být ukončeny podáním inhibitorů acetylcholinesterázy (antidotum – neostigmin, pyridostigmin), kdy nahromadění endogenního acetylcholinu vytěsni myorelaxancium z vazby na receptor. Jako antidotum se nově používá i sugammadex (modifikovaný cyklodextrin) pod názvem Bridion. Tento cyklodextrin tvoří s rokuroniem nejsilněji vázaný komplex, který je v současnosti znám. Selektivně vyváže myorelaxancium z vazby na receptor nervosvalové ploténky a ukončí účinek aminosteroidních myorelaxancií rokuronie a vekuronie. Vzniklý neúčinný hydrofilní komplex je eliminován ledvinami. [11,17,18]

Pankuronium má asi 5x silnější účinek než tubokurarin. Velmi vzácně však snižuje krevní tlak a uvolňuje histamin. Jeho účinek nastupuje rychleji a trvá přibližně stejně dlouho, jako u tubokurarinu (40-60 min). Vylučuje se ledvinami a neměl by se podávat u pacientů, kteří trpí poruchami srdečního rytmu, nebo kteří mají renální insuficienci. Podává se intravenózně. Steroidní skelet nemá žádnou hormonální aktivitu. Vekuronium se od pankuronie liší v počtu kvartérních dusíků. Tento rozdíl ovlivňuje hlavně farmakokinetiku. Účinek vekuronie nastupuje rychleji, je o něco silnější a asi o polovinu doby kratší. (20-30min). Farmakodynamika vekuronie je stejná. [17,18]

Pavulon a Norcuron jsou indikovány při celkové anestezii k usnadnění tracheální intubace a k navození relaxace kosterního svalstva v průběhu chirurgických zákroků středního a delšího trvání. Dávkování Pavulonu a Norcuronu je různé, záleží na typu zákroku a na pacientovi. Musí však být podáván pod dohledem zkušeného anesteziologa. Kontraindikace a nežádoucí účinky jsou podobné: alergická až

anafylaktická reakce, anafylaktický šok, myopatie, mióza, hypotenze, tachykardie, bronchospasmus, atd... [17,18]

2.3.3. Publikované metody stanovení myorelaxancií

V českém lékopisu 2009 je metoda pro stanovení obsahu PMB a VMB uvedena ve 3. díle. Jedná se o nevodnou acidimetrickou titraci.

Pro PMB se uvádí: 0,200g se rozpustí, je-li potřeba zahřátím, v 50ml acetanhydridu R a titruje se kyselinou chloristou 0,1mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Kdy 1ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 36,63mg $C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$. [5]

Pro VMB se uvádí: 0,450g se rozpustí v 50ml kyseliny octové ledové R a titruje se kyselinou chloristou 0,1mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Kdy 1ml kyseliny chloristé 0,1mol/l VS odpovídá 63,8mg $C_{34}H_{57}BrN_2O_4$. [5]

Je jen velmi málo literárních zdrojů, které by se zabývaly metodami stanovení pankuronia, vekuronia či jiných myorelaxancií v léčivech. Například analytická metoda pro stanovení vekuronia v léčivech zatím nebyla dosud zveřejněna. Co se týká stanovení pankuronia v léčivech, byly použity metody HPLC s UV detekcí. Dosud publikované práce se zabývají spíše stanovením definovaných nečistot pankuronia, než stanovením pankuronia jako hlavní účinné látky. V Evropském lékopisu se nejčastěji používá ke zkoušce na příbuzné látky buďto tenkovrstvá chromatografie (PMB), či HPLC-UV (VMB). [5]

Stanovované analyty jsou často užívány při náročnějších operacích. Bývají však často zneužity při sebevraždách. Proto bylo vyvinuto více metod pro stanovení těchto analytů v plazmě, moči a jiných tělních tekutinách. Metodou první volby díky své citlivosti, selektivitě a rychlosti je metoda LC-MS. Další prací bylo např. stanovení pankuronia a jeho rozkladného produktu v krvi u mrtvého pacienta opět pomocí LC-ESI-MS. Zabývá se tak stanovením pankuronia, vekuronia a některých jejich metabolitů v lidském séru. [19,20]

Jinou možností je využití HPLC s detekcí amperometrickou či coulometrickou při stanovení nedepolarizujícího myorelaxancia a jeho dvou derivátů. Tato metoda je opět rychlá, přesná a citlivá. Díky elektrochemické detekci bylo možno stanovit

nečistoty konkrétního myorelaxancia při velmi nízkých koncentracích; ve výsledku byla detekce coulometrická ještě citlivější, než amperometrická. [21]

Práce z počátku 90.tých let se zabývala stanovením vekuroniumu a jeho metabolitů v lidské plazmě pomocí HPLC a elektrochemické detekce. Díky její citlivosti a reprodukovatelnosti, byla úspěšně použita ke studiu farmakokinetiky vekuroniumu u pacientů. [22]

Starší zprávy informují o stanovování vekuroniumu v plazmě pomocí HPLC a fluorimetrického detektoru. Tato metoda se dá rovněž použít při stanovování hladin vekuroniumu a jeho metabolitů v jiných biologických médiích (jaterní či ledvinové tkáni, moči, žluči). [23]

Další starší metoda byla vyvinuta pro kvantifikaci pankuroniumu, vekuroniumu a pipekuroniumu a jejich určitých metabolitů v moči, žluči či plazmě. U studia farmakokinetiky těchto analytů u zdravých osob a u pacientů s poruchou jaterní či ledvinové funkce. Užívá se zde plynové chromatografie s detektorem selektivním na sloučeniny, obsahující dusíkový atom. [24]

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a pomůcky

Všechna měření byla prováděna s elektroforetickým systémem PrinCE 650 (PrinCE Technologies B. V., Nizozemsko), který byl vybaven bezkontaktním vodivostním detektorem TraceDec® (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Rakousko). Ovládání celého elektroforetického systému i analyzátoru bylo zajištěno programem WinPrinCE, který byl integrován v systému DAX (software pro získávání a analýzu dat). Analýzy probíhaly v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 50 µm, celkové délky 75 cm a efektivní délky 45 cm, šarže: AABT05A (Composite Metal Services, Ltd., The Chase, Hallow, Worcester, UK). K měření hodnoty pH elektrolytů a dalších roztoků byl použit pH metr PHM 220 (Radiometer, Francie) s PHC 2401-8 kombinovanou skleněnou elektrodou, která byla kalibrována na standardní Radiometer pufrů. K odplyňování roztoků byl použit ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo). K přefiltrování standardních roztoků, i roztoků elektrolytu byly použity 0,45 µm nylonové filtry (Tecknokroma, Barcelona, Španělsko). K přípravě roztoků byly použity pipety (Brand) s rozsahy 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-10 ml, 0,5-5 ml.

3.2. Chemikálie a roztoky

3.2.1. Chemikálie

- Pankuronium bromid p.a. a vekuronium bromid p.a. - Lunarsun Pharmaceutical Co., LTD (Beijing, China),
- MES 99% - Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- TRIS 99% - Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- ACES 99% - Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- HEPES 99% - Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- TAPSO 99%- Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HP-β-CD) p.a., Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika),
- ACN 99,9% - Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- MeOH 99,9%- Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Imidazol 99,5%- Fluka Chemie GmbH, (Německo)

- α -cyklodextrin, (α -CD) 98% - Fluka Chemie GmbH, (Německo)
- β -, γ -cyclodextrin (α -, β -, γ -CD) 99% - Fluka Chemie GmbH, (Německo)
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin (HP- γ -CD) p.a.– Fluka Chemie GmbH, (Německo)
- Chlorid sodný p.a.- Lachema (Brno, Česká republika)
- Fenyltrimethylamonium jodid 99% - Lachema (Brno, Česká republika)
- Tetramethylamonium jodid 99% - Lachema (Brno, Česká republika)
- Tetrabutylamonium jodid 99%- Lachema (Brno, Česká republika)
- Tetraethylamonium jodid 98%- Lachema (Brno, Česká republika)
- NaOH p.a.- Lachema (Brno, Česká republika)
- Pavulon inj. a Norcuron inj. - N. V. Organon, Oss (Nizozemsko)
- Kyselina octová 99%,- Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Kyselina boritá p.a.- Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Kyselina fosforečná 85% – Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a.– Penta (Praha, Česká republika)
- Ultračistá voda – produkována systémem Milli-Q-Systém (Millipore, Bedford, MA, USA)

3.2.2. Příprava roztoků

Příprava elektrolytu

Optimální elektrolyt obsahující 50 mM borátu a 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu o pH 9,5 byl připraven následovně. Navážené potřebné množství kyseliny borité se rozpustilo v ultračisté vodě, následně bylo upraveno pH pomocí 1 M hydroxidu sodného a nakonec bylo přidáno odpovídající množství (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu a doplněno zbývajícím množstvím ultračisté vody na požadovaný objem. Vzniklý elektrolyt byl odplyněn na ultrazvukové lázni (5 min) a přefiltrován 0,45 μ m nylonovým filtrem. Následně mohl být použit k analýze.

Příprava roztoku standardů

Zásobní standardní roztoky bromidu pankuronia PMB, bromidu vekuronia VMB a jodidu fenyltrimethylamonia FTMAI (vnitřní standard - IS) byly připraveny následovně. Navážení potřebného množství PMB, VMB a FTMAI bylo rozpuštěno ve fosfát-citrátovém pufru (10 mM kyseliny citrónové a 20 mM kyseliny fosforečné, upravené pomocí 1 M hydroxidu sodného na pH 4). Výsledné roztoky analytů (PMB, VMB) byly o koncentraci 1 mg/ml, výsledný roztok vnitřního standardu byl o koncentraci 5 mg/ml. Tyto roztoky byly opět odplyněny na ultrazvukové lázni (5 min) a přefiltrovány 0,45 μ m nylonovým filtrem. Tyto zásobní roztoky se dále ředily ultračistou vodou, aby byla dosažena požadovaná koncentrace k jednotlivým analýzám, kde finální koncentrace IS byla 0,5 mg/ml.

Roztoky pro optimalizaci metody

Pro optimalizaci pH elektrolytu bylo připraveno 6 roztoků 50 mM borátu. U těchto roztoků bylo upraveno pH 1M NaOH v rozmezí 8-10,5. Byl přidán 2-HP- γ -CD tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 15mg/ml a roztok byl doplněn ultračistou vodou v odměrných baňkách po rysku. Následně byly roztoky přefiltrovány nylonovým filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni. pH řada zahrnovala konkrétně tyto hodnoty: 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5.

Pro optimalizaci koncentrace elektrolytu bylo připraveno 5 roztoků elektrolytu s rozdílnou koncentrací borátu. Vypočtené navážky byly rozpuštěny v ultračisté vodě, po úpravě pH 1 M hydroxidem sodným (NaOH) a po přidání cyklodextrinu (2-HP- γ -CD) (15mg/ml) byly roztoky doplněny v odměrných baňkách (10 ml) po rysku. Opět byly všechny roztoky přefiltrovány nylonovým filtrem (0,45 μ m) a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 min. Vzniklá koncentrační řada elektrolytů byla: 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM.

Pro optimalizaci koncentrace cyklodextrinu (2-HP- γ -CD) bylo připraveno 6 roztoků elektrolytů o optimální koncentraci a optimálním pH elektrolytu s různou koncentrací cyklodextrinu v rozmezí 5-15 mg/ml. Před analýzou byly všechny elektrolyty přefiltrovány a odplyněny. Konkrétní koncentrace cyklodextrinu měla tyto hodnoty 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml, 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, 15 mg/ml.

Roztoky pro stanovení linearity

Roztoky pro stanovení linearity byly připraveny ředěním ze zásobních roztoků o koncentraci 1mg/ml (VMB, PMB) na výsledné koncentrace 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml. IS (FTMAI) byl naředěn ze zásobního roztoku o koncentraci 5 mg/ml na koncentraci 500 µg/ml. Jednotlivé objemy byly pipetou odměřeny do odměrných 10 ml baněk. Elektrolyty byly přefiltrovány 0,45 µm nylonovým filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 min.

Příprava roztoků Norcuronu a Pavulonu

Zásobní roztok Pavulonu byl připraven následovně. Bylo smícháno 5 ampulek obsahující 2ml roztoku PMB o koncentraci 2 mg/ml v acetátovém pufru (stabilizátor). Zásobní roztok Norcuronu byl připraven smícháním 5 ampulek Norcuronu. Každá ampulka obsahující 4 mg lyofilizátu (VMB ve fosfát-citrátovém pufru (stabilizátor)) byla kvantitativně rozpuštěna v 1 ml ultračisté vody. Zásobní roztoky byly odplyněny na ultrazvukové lázni (5 min) a přefiltrovány 0,45 µm nylonovým filtrem. Tyto zásobní roztoky se dále ředily ultračistou vodou a bylo přidáno potřebné množství IS ze zásobního roztoku, aby byla dosažena požadovaná koncentrace bromidu pankuronia a bromidu vekuronia (75 µg/ml) a koncentrace IS (500 µg/ml) k jednotlivým analýzám.

3.3. Elektrolyty, vnitřní standardy a cyklodextriny

3.3.1. Elektrolyty

Bylo vyzkoušeno několik elektrolytů odlišného složení s cílem najít vhodný elektrolyt pro metodu stanovení pankuronia a vekuronia. Vložené napětí při těchto analýzách bylo 30 kV, v případě obrácené polarity bylo -30 kV, teplota 25°C. Byly testovány následné elektrolyty a to v rozmezí pH 3-10,5:

- octanový
- citrátový
- borátový
- mravenčnanový
- HEPES
- ACES

- MES
- TAPSO
- MOPSO
- imidazolový

3.3.2. Vnitřní standardy

Vnitřní standard (IS) byl vybírán ze skupiny kvartérních amoniových sloučenin, jejichž molekuly nesou permanentní kladný náboj podobně jako bromid pankuronia a bromid vekuronia. Zásadní pro výběr byl požadavek, aby IS vykazoval přibližně stejnou odezvu detektoru jako analyty a aby se jeho migrační čas dostatečně lišil od migračního času analytů. Všechna měření byla prováděna v borátovém elektrolytu (50 mM; pH 9, upravené 1 M NaOH) při napětí 30 kV, teplota 25°C. Byly vyzkoušeny následující látky:

- fenyltrimethylamonium jodid (FTMAI)
- tetrabutylamonium jodid (TBAI)
- tetraethylamonium jodid (TEAI)
- tetramethylamonium jodid (TMAI)

3.3.3. Cyklodextriny

Díky příznivému vlivu cyklodextrinů na separaci (ovlivňují rychlost migrace analytů, jejich absorpci na stěnu kapiláry a následný tvar píku) jsme hledali vhodný cyklodextrin pro vývoj této konkrétní analytické metody. Při analýzách byl použit borátový elektrolyt (50 mM, pH 9 upraven 1 M NaOH) a bylo vloženo napětí 30 kV, teplota 25°C. Byly testovány následující cyklodextriny:

- α -cyklodextrin
- β -cyklodextrin
- γ -cyklodextrin
- (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin

3.3.4. Organická rozpouštědla

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, organická rozpouštědla, mají vliv na několik faktorů separace (viskozita základního elektrolytu, zeta potenciál). V rámci optimalizace metody byla testována následující organická rozpouštědla:

- acetonitril
- methanol
- 2-propanol
- DMSO
- tetrahydrofuran

3.4. Pracovní a výpočetní postupy

3.4.1. Pracovní postup

Byla použita křemenná separační kapilára o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 75 cm a efektivní délce 45 cm. Separační kapilára a detekční cela byly temperovány vzduchem na $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Před prvním použitím byla kapilára promyta methanolem 5 minut, ultračistou vodou 3 minuty, 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou 20 minut, opět ultračistou vodou 3 minuty, 1 M roztokem NaOH 30 minut a nakonec ultračistou vodou 30 minut. Vše při tlaku 750 mbar.

Denně byla kapilára před první analýzou promyta 10 minut 0,1 M roztokem NaOH a 10 minut ultračistou vodou při tlaku 1000 mbar. Všechny roztoky použité k promývání kapiláry byly před použitím přefiltrovány 0,45 μm nylonovým filtrem do zásobníků a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

Před jednotlivými nástřiky vzorku byla kapilára promyta 1 M NaOH (2min) a ultračistou vodou (2 min) při tlaku 1000 mbar. Nástřik vzorku (standardů) byl realizován pomocí hydrodynamického tlaku 1000 mbar po dobu 3 sekund. Pro každou analýzu byly použity tři zásobníky elektrolytů. První sloužil k promývání kapiláry, druhý a třetí jako vstupní a výstupní zásobník pro analýzu. Jedna sada roztoků elektrolytů byla používána maximálně na šest analýz. Po posledním měření se kapilára promyje a stabilizuje 0,1% kyselinou fosforečnou (vyčištění kapiláry od cyklodextrinů), poté 0,1 M NaOH a ultračistou vodou. Každý krok trval 10 minut.

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

3.4.2. Validace

Úkolem validace je dokázat vhodnost vyvinuté metody pro její další použití v praxi. Mezi základní parametry validace, které se při vývoji metody testují, patří:

Selektivita, linearita, rozsah, přesnost, správnost, limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), robustnost a test vhodnosti systému. [5, 25]

Další parametry byly vypočítány softwarem DAX.

- počet teoretických pater [5]

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

N počet teoretických pater

t_R migrační čas odpovídající vrcholu píku

w_h je šířka píku v polovině jeho výšky

- rozlišení [5]

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

t_{R1} a t_{R2} migrační časy odpovídající vrcholu píku

w_{h1} a w_{h2} šířky píků v polovině jejich výšky

- faktor symetrie píku [5]

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

3.4.2.1. Linearita

Linearita vyjadřuje závislost odezvy detektoru (plocha pod píkem, resp. častěji korigovaná plocha, což je poměr plochy píku a migračního času stejného píku, tento údaj je i mnohem přesnější) na stoupající koncentraci roztoků. Většinou se testuje aspoň

pět různých koncentrací v požadovaném rozsahu. Tato závislost by měla být, jak už vyplývá z názvu, lineární. V této metodě byla stanovena v rozsahu šesti koncentrací 25 µg/ml - 250 µg/ml pro pankuronium a vekuronium s obsahem vnitřního standardu jodidu fenyltrimethylamonia 500 µg/ml. Každý vzorek byl nastříknut třikrát za optimálních podmínek. [5, 25]

3.4.2.2. Rozsah

Metoda by měla být lineární, správná a přesná v celém rozsahu, včetně jeho hraničních hodnot. Rozsah stanovení by měl být aspoň 80 – 120% testované koncentrace. [5, 25]

3.4.2.3. LOD a LOQ

Limit detekce (LOD) je nejnižší koncentrace či množství analytu ve vzorku, které můžeme danou analytickou metodou zaznamenat. Limit kvantifikace (LOQ) je nejmenší množství analytu ve vzorku, které můžeme danou analytickou metodou správně a přesně kvantitativně stanovit. Nejčastěji bývá 3,3 násobkem limitu detekce. LOD a LOQ byly stanoveny na základě poměru signálu k šumu (S/N). [5, 25]

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

H výška píku odpovídající dané složce na elektroforegramu předepsaného porovnávacího roztoku

h rozsah šumu na elektroforegramu získaném ze slepého vzorku

3.4.2.4. Přesnost

Přesnost vyjadřuje shodu v řadě měření provedených za uvedených podmínek. Lze ji testovat na třech úrovních: opakovatelnost, intermediární přesnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost vyjadřuje proměnlivost výsledků získaných jedním analytikem na stejném přístroji v krátkém časovém úseku. Nejčastěji se hodnotí opakovaným nástřikem vzorku (šest nástřiků) či na třech koncentračních úrovních (každá úroveň se ovšem nástřikuje třikrát). Opakovatelnost byla stanovena na dvou různých koncentracích pankuronium a vekuronium: 25 µg/ml a 100 µg/ml. Každá

koncentrace byla testována šestkrát v průběhu tří dnů, kdy jedna sada vialek s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz. [5, 25]

$$\text{RSD}_{\%} = \frac{100}{a} \times \sqrt{\frac{\sum(b-a)^2}{x-1}}$$

a průměr jednotlivých hodnot

b..... jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku či poměr ploch u metody vnitřního standardu

x je počet jednotlivých hodnot

Intermediární přesnost vyjadřuje míru shody výsledků v laboratoři při změně jednoho či více faktorů (změna např. šarže separační kapiláry, den analýzy, analytik) a reprodukovatelnost je nejvyšší stupeň přesnosti vyvíjené metody, který se provádí v interlaboratorním měřítku – stejný vzorek se analyzuje v různých laboratořích a výsledky se pak porovnají.

3.4.2.5. Správnost

Správnost vyjadřuje shodu mezi testovanou hodnotou a hodnotou, kterou lze považovat jako výchozí. Často se stanovuje pomocí výtěžnosti R (%), která se testuje pomocí přidáním známého množství analytu k placebo a jeho následným stanovením. Výsledek se porovná s hodnotou známého přídatku. Správnost by měla být testována aspoň na třech koncentračních hladinách za optimálních podmínek. Správnost byla testována u pankuronia i vekuronia, kdy bylo ke vzorku o koncentraci 75 µg/ml přidán porovnávací roztok (na třech koncentračních hladinách 50 µg/ml, 75 µg/ml a 100 µg/ml. Kdy jedna trojice vialek s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz. [5, 25]

$$R (\%) = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložená}} \times 100$$

3.4.2.6. Stanovení obsahu

Pro stanovení obsahu pankuronia a vekuronia byly vybrány přípravky Pavulon a Norcuron od firmy N. V. Organon, Oss (Nizozemsko). Byly připraveny dva vzorky od každého přípravku (různé pipetáže stejného objemu) o koncentraci 75 µg/ml, vzorky

byly analyzovány šestkrát. Vzorek standardu pankuronia a vekuronia o koncentraci 75 µg/ml, byl také analyzován šestkrát. V každém vzorku byl vnitřní standard o koncentraci 500 µg/ml. Přepočet koncentrace byl realizován dle vzorce: [26]

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times C_{st}$$

A_{vz} průměr ploch vzorku

A_{st} průměr ploch standardu

C_{vz} koncentrace vzorku

C_{st} koncentrace standardu

Po korekci ploch IS byl výpočet realizován dle vzorce: [27]

$$C_{vz} = \frac{\frac{A_{vz}}{A_{ISvz}}}{\frac{A_{st}}{A_{ISst}}} \times C_{st}$$

A_{vz} průměr ploch vzorku

A_{st} průměr ploch standardu

A_{ISvz} průměr ploch vnitřního standardu ve vzorku

A_{ISst} průměr ploch vnitřního standardu ve vzorku standardu

C_{vz} koncentrace vzorku

C_{st} koncentrace standardu

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

4. Výsledky a diskuse

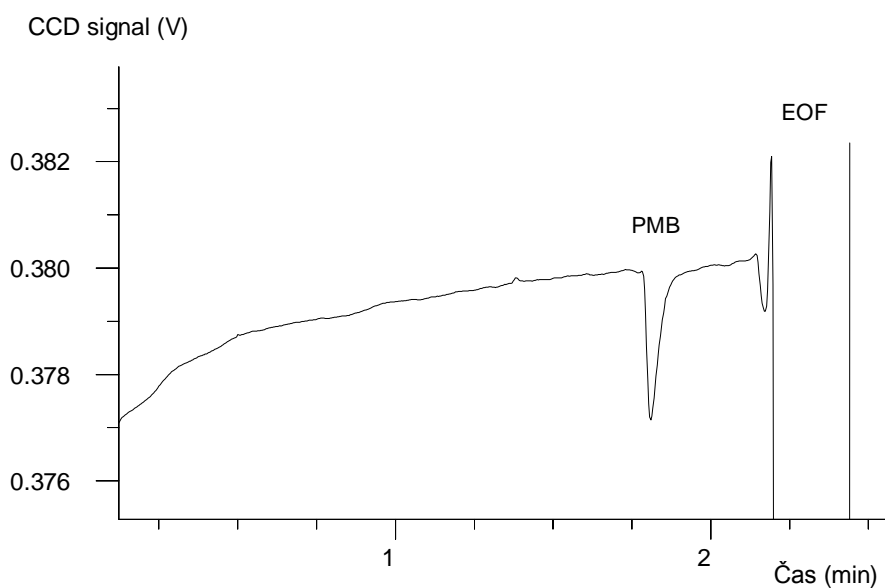
4.1. Výběr elektrolytu, cyklodextrinu a vnitřního standardu

V této části jsou doloženy elektroforegramy a tabulky parametrů pro srovnání jednotlivých elektrolytů, cyklodextrinů a vnitřních standardů. Tyto parametry byly vypočítány softwarem DAX.

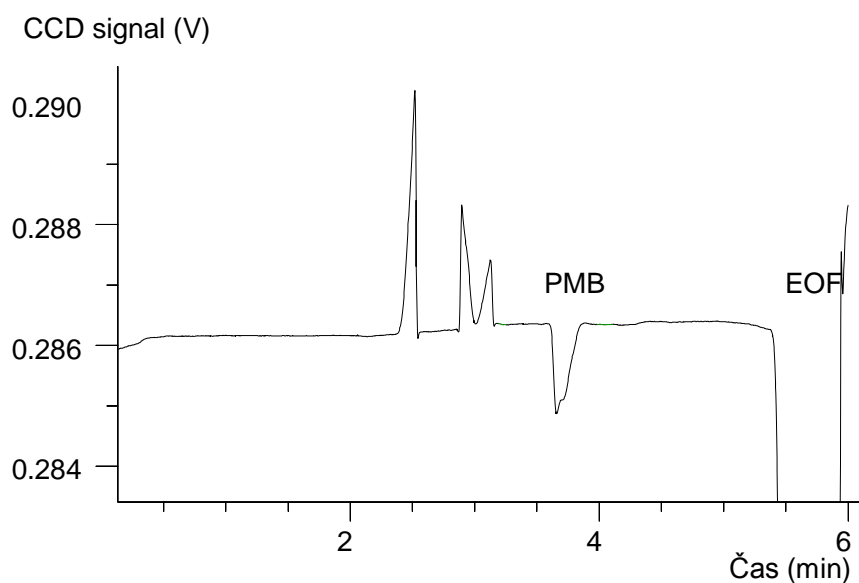
4.1.1. Elektrolyty

Výsledky testovaných elektrolytů uvedených v kapitole 3.3.1. jsou tyto:

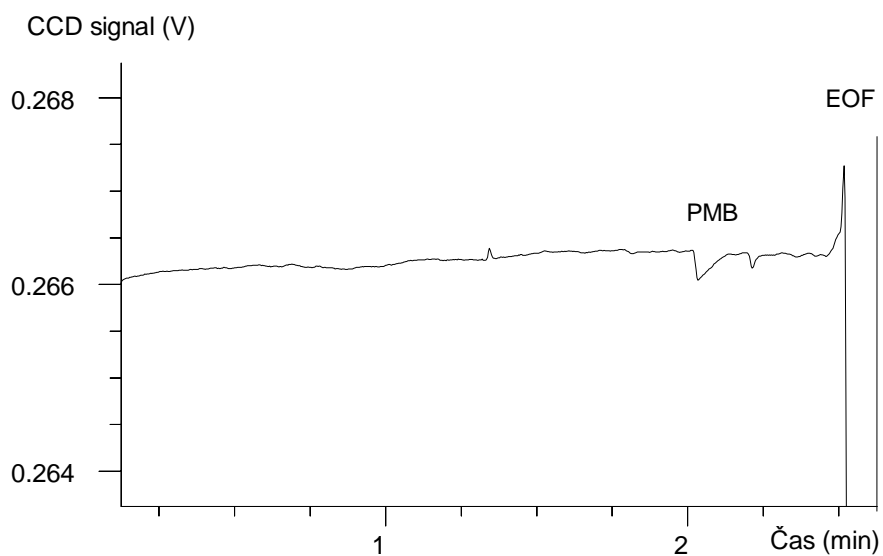
- 20 mM citrát o pH 2,9 a 4,6 – špatná separace, asymetrické píky, systémové píky, dlouhá doba separace
- 10 mM acetát o pH 5 – špatná separace, systémové píky, asymetrické píky, kratší doba separace
- 30 mM ACES o pH 6,9 – malá citlivost
- 30 mM imidazol o pH 7 – malá citlivost, asymetrické píky, dlouhá doba separace
- 30 mM HEPES o pH 7,55 – malá citlivost, špatná separace, systémový pík
- 30 mM TAPSO o pH 7,4 – malá citlivost, špatná symetrie píku
- 30 mM MOPSO o pH 6,9 – malá citlivost, špatná symetrie píku
- 50 mM borát o pH 9 – krátká doba analýzy, dobrá separace, vysoká citlivost a dobrá symetrie píku analytu



Obrázek 9.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) v borátovém pufru (50 mM) o pH 9



Obrázek 10.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) v citrátovém pufru (20 mM) o pH 2,9



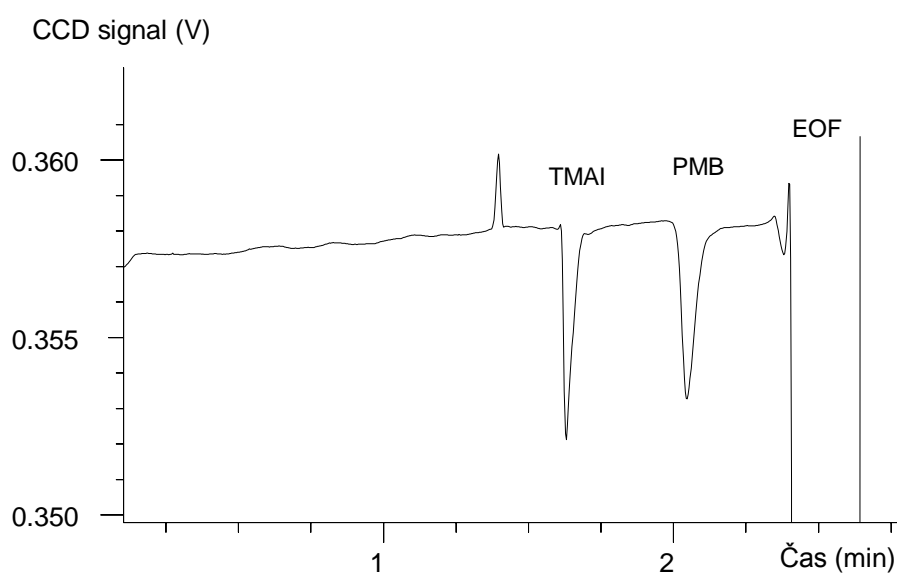
Obrázek 11.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) v pufru HEPES (30 mM) o pH 7,55

Na základě uvedených informací byl jako vhodný elektrolyt pro metodu stanovení vybraných myorelaxancií vybrán borátový pufr (50 mM) o pH 9, které bylo nastaveno přidavkem 1 M NaOH.

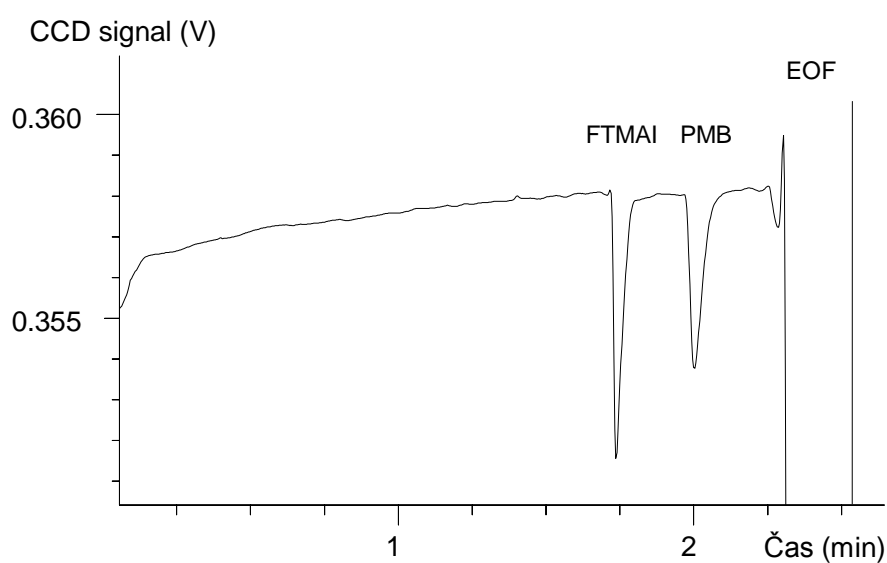
4.1.2. Vnitřní standard (IS)

Výsledky testovaných vnitřních standardů uvedených v části 3.3.2. jsou tyto:

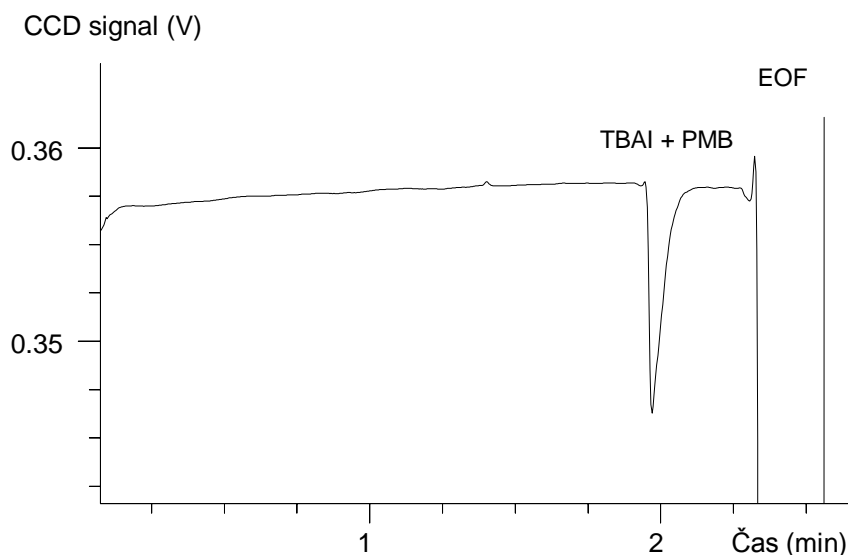
- jodid fenyltrimethylamonia (FTMAI) – dobrá separace, nejcitlivější
- jodid tetrabutylamonia (TBAI) – migrační čas stejný jako pankuronium
- jodid tetramethylamonia (TMAI) – dobrá separace, systémový pík
- jodid tetraethylamonia (TEAI) – dobrá separace, ale méně citlivý než FTMAI



Obrázek 12.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) s vnitřním standardem (TMAI)



Obrázek 13.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) s vnitřním standardem (FTMAI)



Obrázek 14.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) s vnitřním standardem (TBAI)

Z testovaných vnitřních standardů byl na základě výsledků jako nejvhodnější vybrán jodid fenyltrimethylamonia (FTMAI).

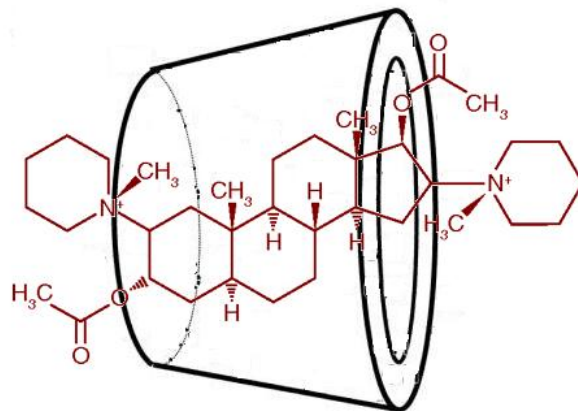
4.1.3. Cyklodextrin

Pankuronium i vekuronium mají hydrofilní kladně nabitou část (kvartérní amin/y) a lipofilní část, kterou tvoří steroidní skelet. Při reakci s cyklodextrinem dochází ke vzniku inkluzního komplexu vsunutím steroidního skeletu do kavity cyklodextrinu. (viz. Obrázek 15). Kladný náboj pankuronia a vekuronia může interagovat se stěnou kapiláry (negativní náboj). Tyto změny jsou nežádoucí. Rozhodli jsme se pro přidání cyklodextrinu, který minimalizoval toto shlukování a vazbě na kapilární stěnu a zároveň pozitivně ovlivnil celkovou separaci. Nejdříve byl testován vliv základních cyklodextrinů na parametry píku PMB (viz tab. 3). Později byly testovány separační schopnosti jednotlivých CD během testování PMB a VMB.

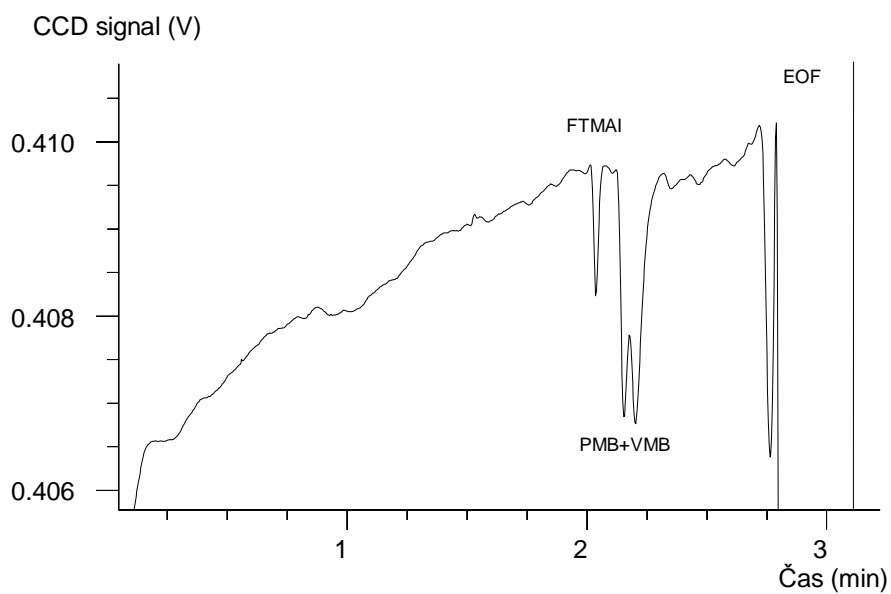
Výsledky testovaných cyklodextrinů uvedených v části 3.3.3. jsou tyto:

- α -cyklodextrin – neúplná separace
- β -cyklodextrin – dobrá separace, menší citlivost s porovnáním s 2HP- γ -cyklodextrinem
- γ -cyklodextrin – dobrá separace, asymetrické píky
- (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin – dobrá separace, špatná symetrie píků

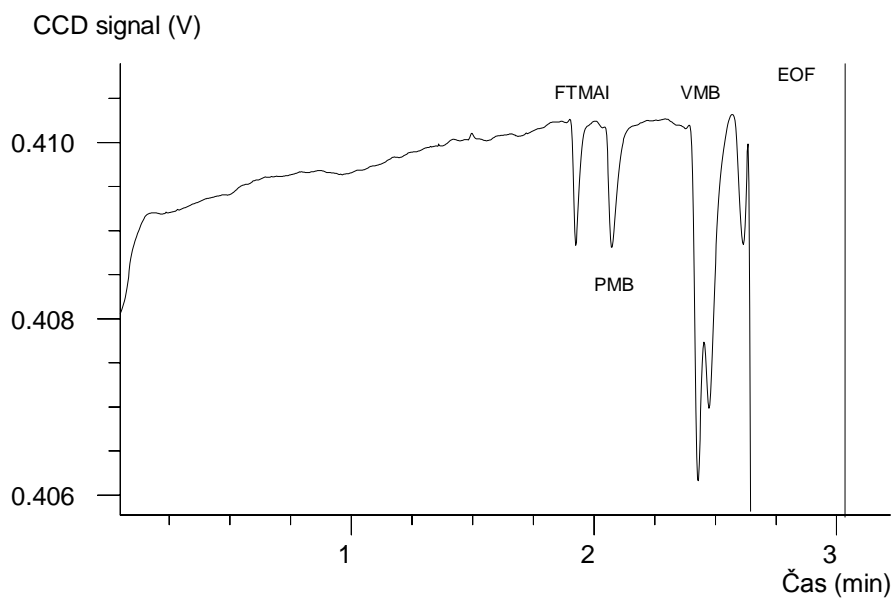
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin – dobrá separace, dobrá citlivost



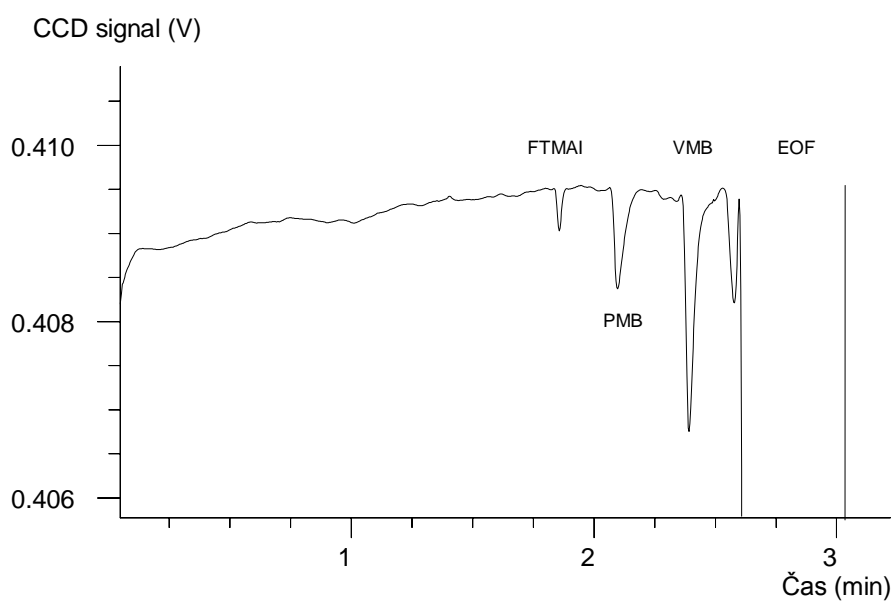
Obrázek 15.: Inkluzní komplex dextrinu (hostitel) s pankuroniem (host)



Obrázek 16.: Elektroforegram bromidu pankuronie (PMB) a bromidu vekuronie (VMB) s vnitřním standardem (FTMAI) s použitím α -cyklodextrinu



Obrázek 17.: Elektroforeogram bromidu pankuronia (PMB) a bromidu vekuronia (VMB) s vnitřním standardem (FTMAI) s použitím (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu



Obrázek 18.: Elektroforeogram bromidu pankuronia (PMB) a bromidu vekuronia (VMB) s vnitřním standardem (FTMAI) s použitím (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu

Tabulka 3.: Hodnoty parametrů píku PMB u základních CD

CD	plocha	asymetrie	S/N	N
bez CD	12,11	2,6	55,2	11514
alfa CD	13,06	2,8	36,3	11675
beta CD	13,7	3,2	49,6	12432
gama CD	24,5	2,2	72	11654

Tabulka 4.: Hodnoty rozlišení Rs a asymetrie píků analytů u jednotlivých CD

CD	Rs IS/PMB	Rs PMB/VMB	Rs VMB/EOF	Asymetrie PMB	Asymetrie VMB
alfa	2,92	0,65	6,93	1,7	2,78
beta	2,19	2,68	1,91	2,5	2,05
gama	6,12	2,69	2,94	2,2	2,1
HP-beta	1,38	2,44	0,42	2,6	3,1
HP-gama	3,53	2,86	2,36	2,2	1,9

Citlivost separace PMB se zvýšila o 100% při použití gama-CD. Z dalšího testování cyklodextrinů byl na základě výsledků vybrán jako nejvhodnější (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin.

4.1.4. Organická rozpouštědla

Z testovaných organických rozpouštědel byly testovány vždy 5% koncentrace rozpouštědel uvedených v části 3.3.4. Jelikož neměla pozitivní vliv na separaci, citlivost a symetrii píků, tak jsme od jejich použití upustili. Navíc čistě vodný základní elektrolyt je ekologičtější a méně zatěžuje životní prostředí.

4.2. Optimalizace metody

4.2.1. Optimalizace elektrolytu

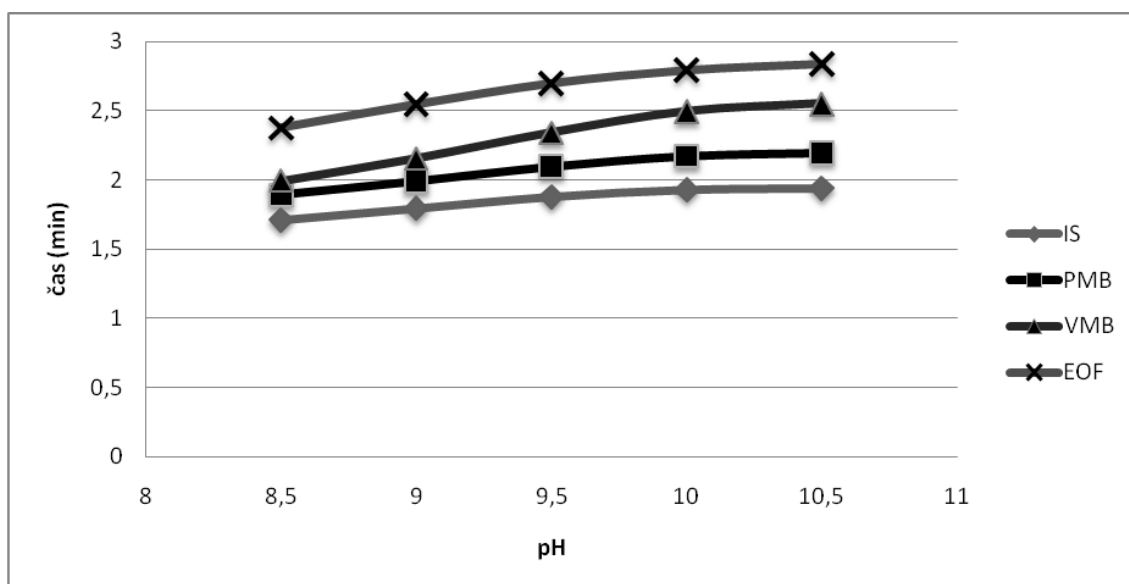
pH elektrolytu

Jako optimální elektrolyt byl zvolen borát, přidán (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin o koncentraci 15 mg/ml. pH bylo testováno v rozsahu 8,5- 10,5. Každé pH bylo proměřeno dvakrát, při napětí 30 kV. Optimalizace byla testována s roztokem

obsahujícím bromid pankuronia a bromid vekuronia o koncentraci 0,1 mg/ml a IS (jodid fenytrimethylamonia) o koncentraci 0,5 mg/ml.

Tabulka 5.: Závislost migračních časů na pH elektrolytu

pH	migrační čas (min)			
	IS	PMB	VMB	EOF
8,5	1,71	1,89	1,99	2,38
9	1,79	1,99	2,16	2,55
9,5	1,88	2,10	2,34	2,70
10	1,93	2,17	2,50	2,80
10,5	1,94	2,20	2,55	2,84



Obrázek 19.: Graf závislosti migračních časů na pH elektrolytu

S rostoucím pH elektrolytu rostou migrační časy. Na základě výsledků bylo vybráno jako optimální pH 9,5, pro dostatečné rozlišení jednotlivých píků, jejich dobré symetrie a přijatelné hodnotě jejich migračního času.

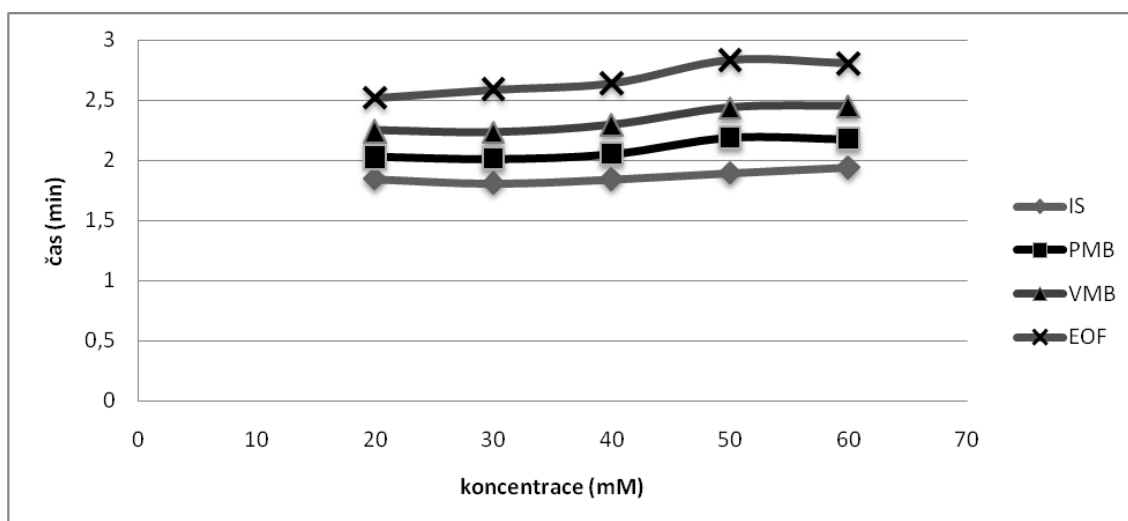
Koncentrace elektrolytu

Jako optimální elektrolyt byl zvolen borát, jehož pH bylo upraveno 1 M NaOH na 9,5 a přidán (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin o koncentraci 15 mg/ml. Optimalizace byla prováděna v rozsahu 20 mM – 60 mM. Každá koncentrace byla proměřena dvakrát, při napětí 30 kV. Optimalizace byla prováděna s roztokem obsahujícím bromid

pankuronia a bromid vekuronia o koncentraci 0,1 mg/ml a IS (jodid fenyltrimethylamonia) o koncentraci 0,5 mg/ml.

Tabulka 6.: Závislost migračních časů na koncentraci elektrolytu

koncentrace (mM)	migrační čas (min)			
	IS	PMB	VMB	EOF
20	1,85	2,03	2,25	2,52
30	1,81	2,01	2,23	2,59
40	1,84	2,05	2,30	2,64
50	1,89	2,19	2,44	2,83
60	1,94	2,18	2,45	2,81



Obrázek 20.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci elektrolytu

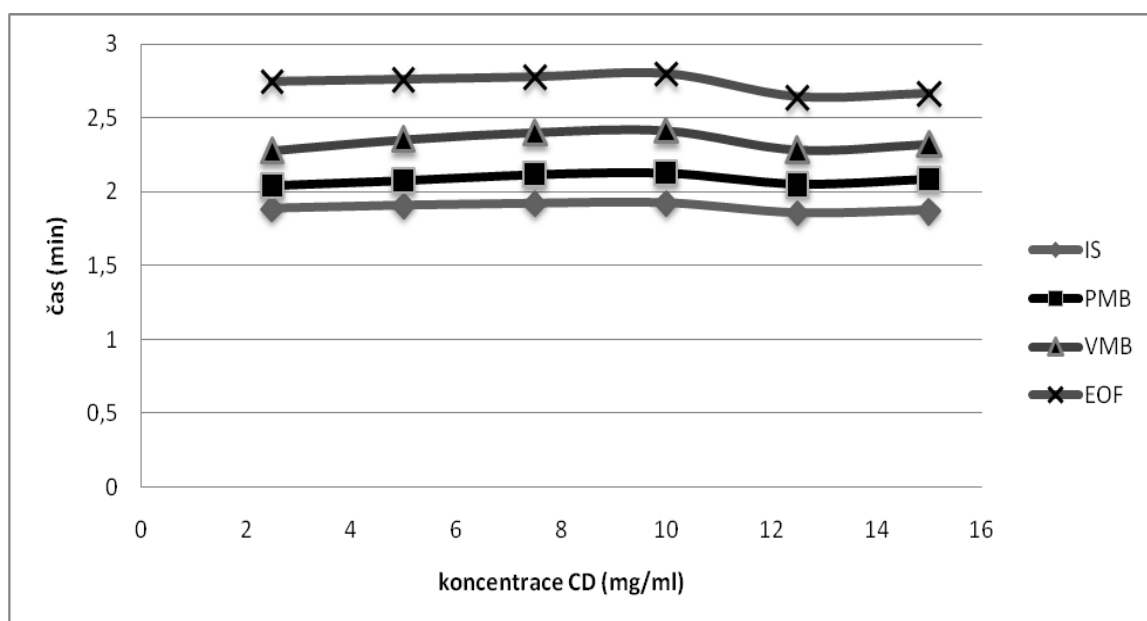
S rostoucí koncentrací elektrolytu rostou migrační časy. Na základě výsledků byla vybrána optimální koncentrace borátu 50 mmol/l pro dostatečné rozlišení jednotlivých píků, jejich dobrou symetrii a přijatelné migrační časy IS a analytů.

Koncentrace cyklodextrinu

Jako optimální elektrolyt byl zvolen 50 mM borát o pH 9,5 (upraveno 1 M NaOH). Koncentrace (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu byla testována v rozmezí 2,5 mg/ml – 15 mg/ml. Pro každou koncentraci byly změřeny dva elektroforegramy při napětí 30 kV. Optimalizace byla testována s roztokem obsahujícím bromid pankuronia a bromid vekuronia o koncentraci 0,1 mg/ml a IS (jodid fenyltrimethylamonia) o koncentraci 0,2 mg/ml.

Tabulka 7.: Závislost migračních časů na koncentraci cyklodextrinu

koncentrace CD	migrační čas (min)			
	IS	PMB	VMB	EOF
2,5	1,89	2,04	2,28	2,75
5	1,91	2,08	2,35	2,76
7,5	1,92	2,12	2,40	2,78
10	1,92	2,13	2,41	2,80
12,5	1,86	2,05	2,29	2,64
15	1,88	2,09	2,32	2,67



Obrázek 21.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci cyklodextrinu

Tabulka 8.: Závislost parametrů píků PMB na koncentraci CD

koncentrace CD (mg/ml)	PMB			
	rozlišení	asymetrie	S/N	N
2,5	2,32	1,86	7,1	20339
5	2,36	1,91	4,8	19047
7,5	2,42	2,02	6	18654
10	2,61	2,07	7,2	18929
12,5	2,88	1,99	28,7	19747
15	3,6	2,12	30,9	18672

Tabulka 9.: Závislost parametrů píků VMB na koncentraci CD

koncentrace CD (mg/ml)	VMB			
	rozlišení	asymetrie	S/N	N
2,5	2,57	2,45	11,4	17456
5	2,72	2,12	8,5	18629
7,5	2,54	1,98	10,9	18874
10	3,04	2,07	13,2	20019
12,5	2,19	2,02	54,3	21140
15	2,84	2,23	56,8	20938

Na základě výsledků byla vybrána jako optimální koncentrace 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu. Pro dostatečné rozlišení jednotlivých píků, jejich dobré symetrie a vhodné délce jejich migračního času.

Jako optimální základní elektrolyt byl na základě výše uvedených výsledků vybrán 50 mM borát o pH 9,5 (upraveno pomocí 1 M NaOH) s přídavkem 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu.

4.2.2. Optimalizace dalších podmínek

Dále byly optimalizovány následující podmínky: velikost vkládaného napětí, tlak a doba nástřiku vzorku a standardu.

Doba a tlak nástřiku

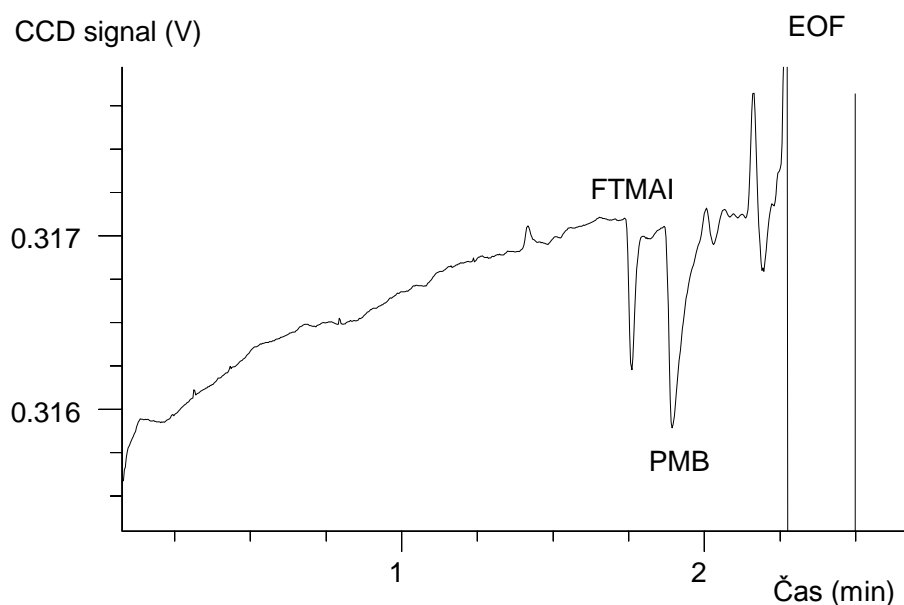
Analyzátor umožňuje hydrodynamický nástřik vzorku a lze měnit dobu jeho nástřiku a jeho tlak. Optimalizace doby a tlaku nástřiku byla prováděna mezi prvními měřeními, tudíž vliv tohoto parametru byl testován jen u PMB. Doba nástřiku byla testována v rozmezí 0,05 min – 1 min. Všechna měření byla provedena třikrát při napětí 30 kV a tlaku nástřiku 100mbar. Tlak nástřiku byl optimalizován v rozmezí 100 mbar – 1000 mbar. Všechna měření byla analyzována třikrát při napětí 30 kV a době nástřiku 0,05 min. Optimalizace byla prováděna s roztokem obsahující pankuronium bromid o koncentraci 0,1 mg/ml a IS (fenyltrimethylamonium jodid) o koncentraci 0,2 mg/ml. Jako optimální elektrolyt byl testován 50 mM borát o pH 9 (upraveno pomocí 1 M NaOH), bez přídavku cyklodextrinu.

Tabulka 10.: Závislost parametrů píku PMB na době nástřiku

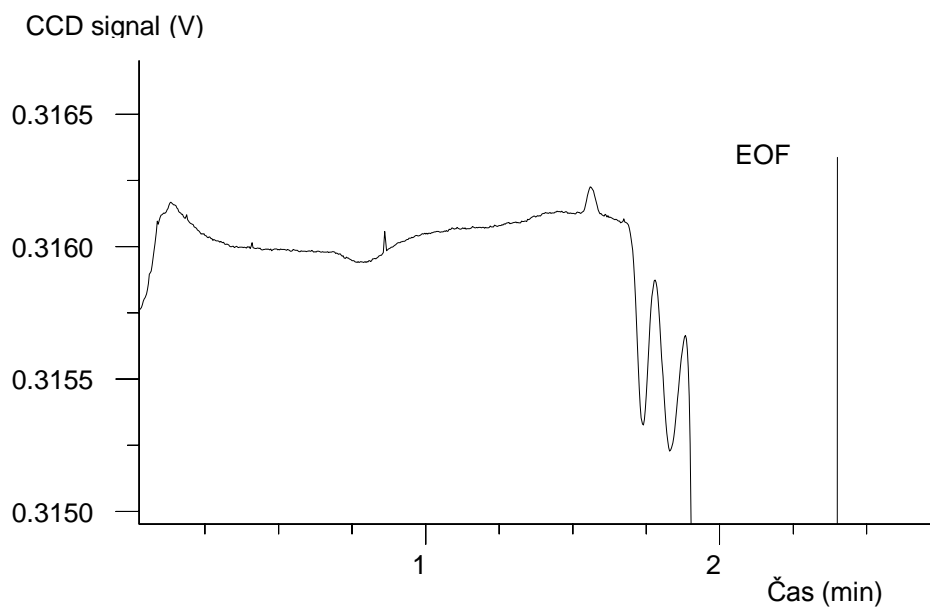
Doba nástřiku (min)	rozlišení	asymetrie	S/N	N
0,05	3,94	2,78	18,4	29606
0,1	3,74	3,67	15,4	13794
0,2	2,22	5,47	13,5	16873
0,4	1,4	4,85	23,1	9617
0,6	1	4,56	14,7	5429
0,8	0,97	6,08	4,9	3217
1	splynutí s EOF			

Tabulka 11.: Závislost parametrů píku PMB na tlaku nástřiku

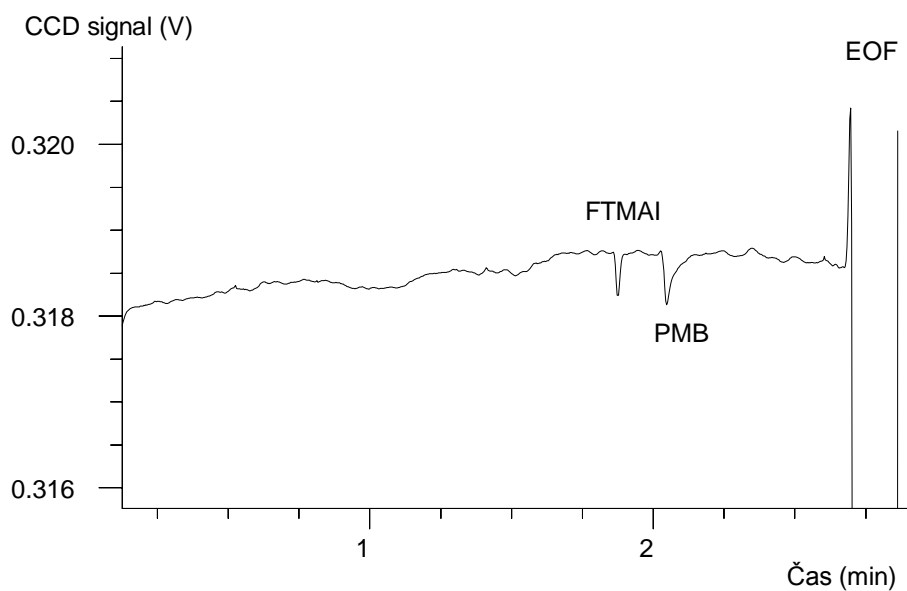
Tlak nástřiku (mbar)	rozlišení	asymetrie	S/N	N
100	3,94	2,78	8,4	29582
150	3,55	3,16	8,6	26864
300	2,83	4,34	13,5	27306
500	2,67	3,37	13,4	19763
750	2,62	2,93	13,8	15192
1000	2,96	2,22	25,7	11182



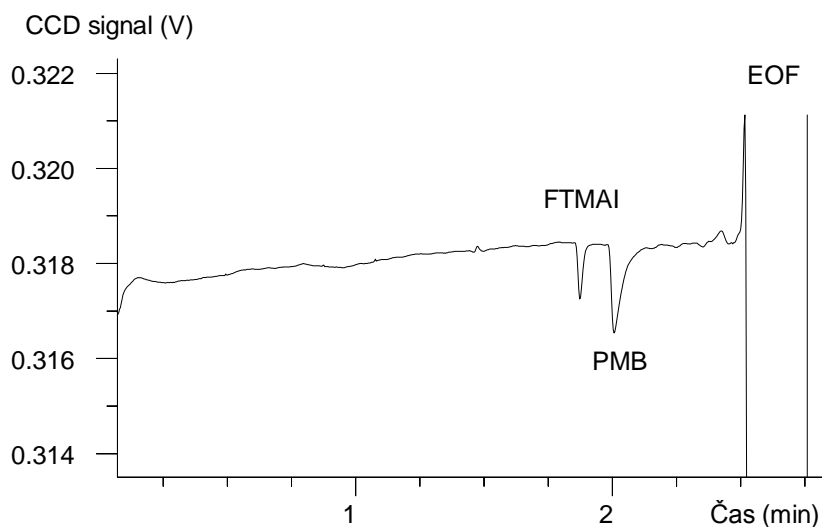
Obrázek 22.: Elektroforegram bromidu pankuronium (PMB) a vnitřního standardu (FTMAI) při tlaku nástřiku 100mb a času nástřiku 0,4min



Obrázek 23.: Elektroforegram bromidu pankuronia (PMB) a vnitřního standardu (FTMAI) při tlaku nástřiku 100mb a času nástřiku 0,8min



Obrázek 24.: Elektroforegram bromidu pankuronia PMB a vnitřního standardu (FTMAI) při tlaku nástřiku 300mb a době nástřiku 0,05min



Obrázek 25.: Elektroforegram bromidu pankuronia PMB a vnitřního standardu (FTMAI) při tlaku nástřiku 1000mb a době nástřiku 0,05min

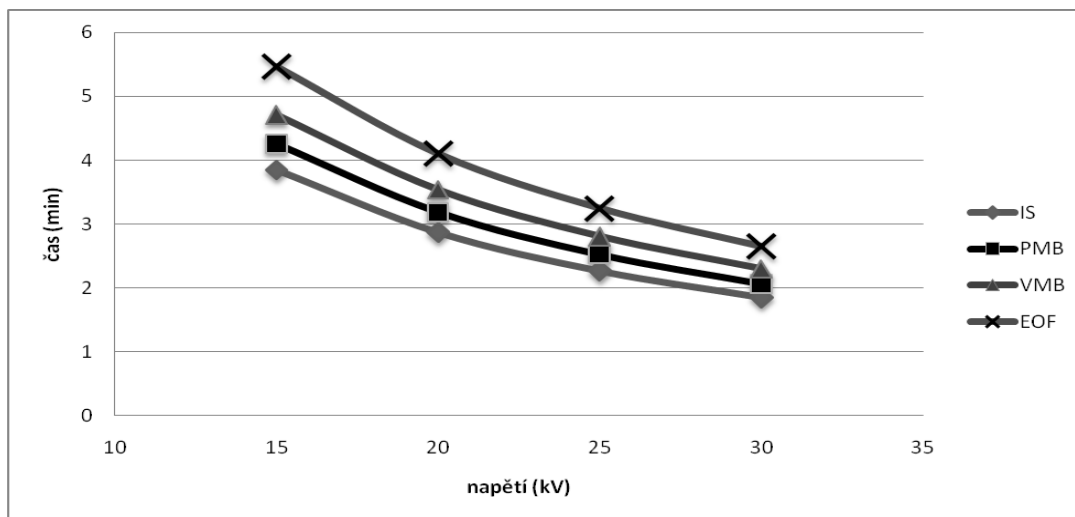
Jako optimální dávkování vzorku byl vybrán nástřik o době trvání 0,05 min při tlaku 1000 mbar. Tlak nástřiku je v našem případě neobvyklý (většinou bývá 100mbar), avšak měl příznivý vliv na symetrii piku a redukoval šum základní linie. Zlepšení těchto parametrů bylo upřednostněno na úkor účinnosti separace (snížen počet pater), která je pro účel použití metody dostatečná.

Vložené napětí

Vliv napětí byl testován v rozsahu 15 kV- 30 kV s optimálním elektrolytem (50 mM borát o pH 9,5 s přidavkem 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu). Optimalizace byla testována s roztokem obsahujícím bromid pankuronia a bromid vekuronia o koncentraci 0,1 mg/ml a IS (jodid fenyltrimethylamonia) o koncentraci 0,5 mg/ml.

Tabulka 12.: Závislost migračních časů na vloženém napětí

napětí (kV)	migrační čas (min)			
	IS	PMB	VMB	EOF
15	3,84	4,26	4,71	5,47
20	2,87	3,19	3,54	4,11
25	2,27	2,52	2,81	3,25
30	1,85	2,06	2,30	2,66

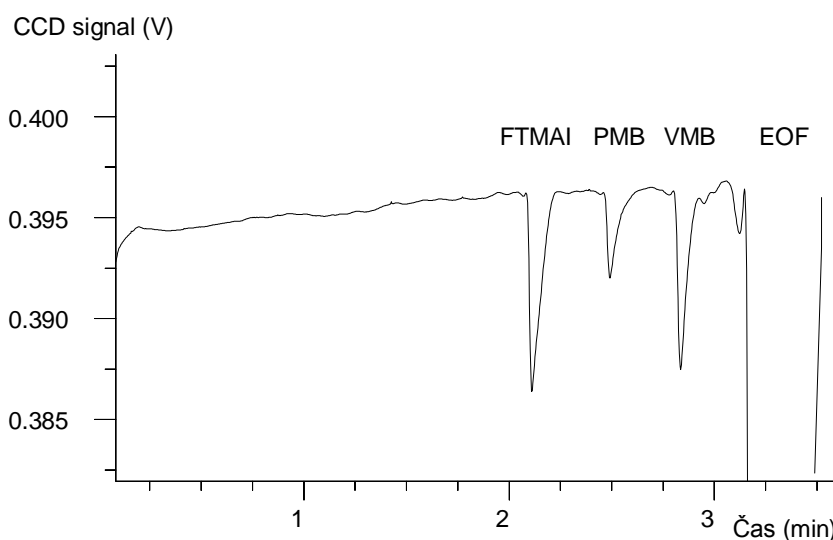


Obrázek 26.: Graf závislosti migračních časů na vloženém napětí

Čím vyšší bylo vložené napětí, tím kratší byla doba analýzy. Jako optimální napětí byla vybrána hodnota 30 kV. Vložené napětí nemělo vliv na rozlišení a asymetrii píků.

Jako finální optimální podmínky byly vybrány tyto:

- elektrolyt: 50 mM borát o pH 9,5 (upraveno 1 M NaOH) s přidavkem 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu
- napětí: 30 kV a nástřik: 0,05 min při tlaku 1000 mbar



Obrázek 27.: Elektroforeogram bromidu pankuronia (PMB) a bromidu vekuronia (VMB) s vnitřním standardem (FTMAI) za výše zmíněných optimálních podmínek

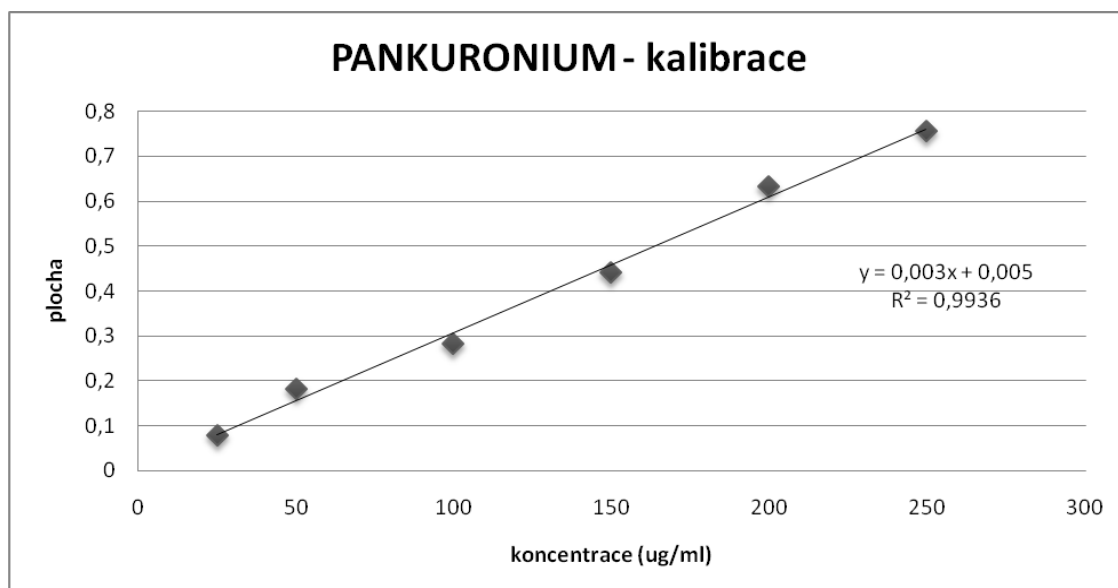
4.3. Validace

4.3.1. Linearita

Linearita byla stanovena v rozsahu šesti koncentrací 25 µg/ml - 250 µg/ml pro bromid pankuronia a bromid vekuronia s obsahem vnitřního standardu jodidu fenytrimethylamonium 500 µg/ml. Byl použit optimální pracovní elektrolyt. Každý vzorek byl nastříknut třikrát za optimálních podmínek. Výsledné plochy byly korigovány migračním časem a plochou píku IS. Plochy byly vyhodnoceny počítačovým programem.

Tabulka 13.: Koncentrace kalibračních standardů PMB pro vyhodnocení kalibrační křivky

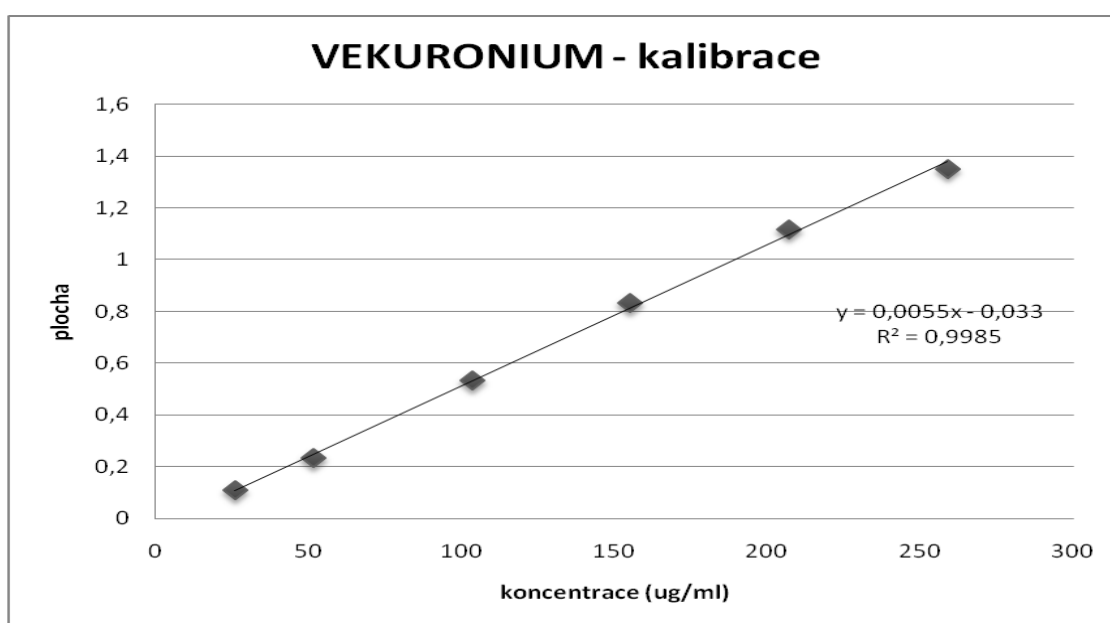
koncentrace PMB (µg/ml)	fenyltrimethylamonium jodid (µg/ml)
24,95	500
49,9	500
99,8	500
149,7	500
199,6	500
249,5	500



Obrázek 28.: Závislost korigované plochy píku na koncentraci bromidu pankuronia

Tabulka 14.: Koncentrace kalibračních standardů VMB pro vyhodnocení kalibrační křivky

koncentrace VMB (µg/ml)	fenyltrimethylamonium jodid (µg/ml)
25,875	500
51,75	500
103,5	500
155,25	500
207	500
258,75	500



Obrázek 29.: Závislost korigované plochy píku na koncentraci bromidu vekuronia

Výsledný korelační koeficient byl pro PMB je $r = 0,9968$ a pro VMB $r = 0,9992$. Pro oba analyty je závislost lineární.

4.3.2. Rozsah

Rozsah byl testován v rozmezí 25 µg/ml - 250 µg/ml pro oba analyty.

4.3.3. LOD a LOQ

Byly stanoveny na základě poměru signálu k šumu a ověřeny experimentálně.

Tabulka 15.: LOD a LOQ bromidu pankuronia

	PMB	
	µg/ml	mol/l
LOD	7	$3,183 \times 10^{-6}$
LOQ	21	$9,55 \times 10^{-6}$

Tabulka 16.: LOD a LOQ bromidu vekuronia

	VMB	
	µg/ml	mol/l
LOD	6	$3,137 \times 10^{-6}$
LOQ	18	$9,41 \times 10^{-6}$

Výsledný limit detekce činí u PMB 7 µg/ml a 6 µg/ml u VMB, limit kvantifikace činí u PMB 21 µg/ml a 18 µg/ml u VMB.

4.3.4. Přesnost

Opakovatelnost byla stanovena pro dvě různé koncentrace bromidu pankuronia a bromidu vekuronia: 25 µg/ml a 100 µg/ml. Každá koncentrace byla testována šestkrát za optimálních podmínek, kdy jedna sada vialek s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz. Byl použit optimální pracovní elektrolyt. Plochy byly vyhodnoceny počítačovým programem. Výsledné plochy byly korigovány migračním časem a IS.

Tabulka 17.: Opakovatelnost migračních časů a poměrů ploch píků bromidu pankuronia a bromidu vekuronia vzhledem k ploše píku IS (Av/Ais)

	25 µg/ml		100 µg/ml	
	čas (min) / RSD (%)	plocha / RSD (%)	čas (min) / RSD (%)	plocha / RSD (%)
pankuronium	2,09/0,37	0,07/1,83	2,07/0,20	0,28/2,03
vekuronium	3,10/1,88	0,14/1,88	3,08/0,48	0,64/0,90

Směrodatné odchylky migračních časů analytů i poměrů ploch Av/Ais jsou u obou analytů podobná a vyhovující.

4.3.5. Správnost

Správnost byla ověřena pomocí výtěžnosti, která se testuje pomocí přidání známého množství standardu ke vzorku (HVLP) a jeho následným stanovením. Výsledek se porovná s hodnotou známého přídatku. Byl použit optimální pracovní elektrolyt. Každý vzorek byl dávkován třikrát na třech koncentračních hladinách za optimálních podmínek, kdy jedna sada vialek s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz. Výsledné plochy byly korigovány migračním časem a plochou píku IS. Plochy byly vyhodnoceny počítačovým programem.

Tabulka 18: Výtěžnost u bromidu pankuronia

PMB			
přidáno (µg/ml)	nalezeno (µg/ml)	výtěžnost (%)	RSD (%)
49,90	49,50	99,20	2,56
74,90	75,20	100,40	2,61
99,80	96,60	96,70	0,66

Tabulka 19.: Výtěžnost u bromidu vekuronia

VMB			
přidáno (µg/ml)	nalezeno (µg/ml)	výtěžnost (%)	RSD (%)
50,40	51,40	101,90	1,30
75,60	72,30	95,70	1,27
100,80	103,50	102,70	2,20

Díky výsledkům výtěžnosti lze říci, že vyvinutá metoda CZE je správná, tudíž lze ji aplikovat na stanovení účinných látek bromidu pankuronia a bromidu vekuronia v léčivých přípravcích.

4.3.6. Stanovení obsahu

Obsah účinných látek bromidu pankuronia a bromidu vekuronia byl stanoven v přípravcích Pavulon a Norcuron od firmy N. V. Organon, Oss (Nizozemsko). Byly připraveny dva vzorky od každého přípravku (různé pipetáže stejného objemu) o koncentraci 75 µg/ml, vzorky byly analyzovány šestkrát za optimálních podmínek v průběhu tří dnů, kdy jedna sada vialek s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz. Vzorek standardu bromidu pankuronia a bromidu vekuronia o koncentraci 75

µg/ml, byl také analyzován šestkrát v průběhu tří dnů. V každém vzorku byl vnitřní standard o koncentraci 500 µg/ml. Byl použit optimální pracovní elektrolyt. Plochy byly vyhodnoceny počítačovým programem. Výsledné plochy byly korigovány migračním časem a plochou píku IS.

Tabulka 20.: Výsledky stanovení obsahu bromidu pankuronia a bromidu vekuronia v přípravcích Pavulon a Norcuron

	Pavulon (2 mg/ml)			
	deklarovaný obsah (mg)	nalezený obsah (mg)	nalezený obsah (%)	RSD (%)
1.den	2,00	2,04	101,80	1,65
2.den	2,00	1,94	97,00	3,52
3.den	2,00	1,94	97,10	2,70
průměr	2,00	1,97	98,63	
	Norcuron (4 mg/ml)			
	deklarovaný obsah (mg)	nalezený obsah (mg)	nalezený obsah (%)	RSD (%)
1.den	4,00	4,04	101,00	0,73
2.den	4,00	4,13	103,30	1,89
3.den	4,00	3,87	96,80	2,50
průměr	4,00	4,01	100,37	

Zjištěný obsah odpovídal obsahu deklarovanému výrobcem.

5. Závěr

5.1. Shrnutí závěrů práce

Z výsledků této diplomové práce plynou tyto závěry:

- Byla vyvinuta kapilární zónová elektroforetická metoda s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení bromidu pankuronia a bromidu vekuronia ve farmaceutických přípravcích.
- Po testování několika elektrolytových systémů se jako nejvhodnější jevil systém borátový.
- Byly hledány optimální podmínky pro separaci – pH, koncentrace elektrolytu, cyklodextrin, koncentrace cyklodextrinu, organická rozpouštědla, napětí, doba a tlak nástřiku. Optimální základní elektrolyt měl složení: 50 mM borát upravený 1 M NaOH na pH 9,5, s přidavkem 12,5 mg/ml (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrinu, tlak nástřiku byl 1000 mbar a doba nástřiku 0,05 min.
- Separační křemenná kapilára měla průměr 50 μ m, celkovou délku 75 cm a efektivní délku 45 cm, bylo vkládáno napětí 30 kV při teplotě 25°C.
- Jako vnitřní standard byl zvolen jodid fenyltrimethylamonia.
- Migrační čas vnitřního standardu byl 2,0 min, PMB 2,5 min a VMB 3,0 min.
- Kalibrační závislost byla testována na šesti koncentračních úrovních (25-250 μ g/ml) vždy s koncentrací vnitřního standardu 500 μ g/ml. Kalibrační křivky jsou charakterizovány rovnicemi přímky: $y = 0,003x + 0,005$ pro PMB ($r = 0,9968$) a $y = 0,0055x + 0,033$ pro VMB ($r = 0,9992$).
- Opakovatelnost metody byla ověřena šesti nástřiky roztoků analytů při dvou koncentračních hladinách (25 a 100 μ g/ml) s koncentrací vnitřního standardu 500 μ g/ml. Relativní směrodatná odchylka migračních časů analytů byla v rozmezí 0,20 – 1,88 % a RSD jejich korigované plochy byla v rozmezí 0,90 – 2,03 %.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení obsahu pankuronia a vekuronia ve farmaceutických přípravcích Pavulon a Norcuron. Zjištěný obsah účinných látek odpovídal obsahu, který byl výrobcem deklarován. RSD se pohybovala v rozmezí 0,73 – 3,52 %.
- Správnost byla ověřena pomocí metody výtěžnosti na třech hladinách. Hodnota výtěžnosti byla pro PMB 98,77 % a pro VMB 100,1 %.

5.2. Abstrakt

Byla vyvinuta nová metoda kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení pankuronia (PM) a vekuronia (VM) ve farmaceutických přípravcích. Separace probíhala v křemenné kapiláře (vnitřní průměr 50 μm , celková délka 75 cm a efektivní délka 45 cm) při 25 °C. Optimální základní elektrolyt byl 50 mM borát o pH 9,5 s přidavkem 12,5 mg/ml 2HP- γ -CD. Jako vnitřní standard byl použit jodid fenyltrimethylamonia. Bylo použito hydrodynamické dávkování vzorku (tlak 1000 mbar a doba nástřiku 3s). Vložené napětí bylo +30 kV. Za těchto podmínek byly píky PM a VM rozděleny až na základní linii a analýza trvala méně než 4 minuty. Kalibrační závislost byla pro PM bromid i VM bromid lineární v rozsahu 25 – 250 $\mu\text{g/ml}$, s korelačním koeficientem $r > 0.9968$. LOD pro PM bromid byl 7 $\mu\text{g/ml}$ a pro VM bromid 6 $\mu\text{g/ml}$. Správnost byla testována na třech koncentračních hladinách a výsledky byly uspokojivé (Výtěžnost 95.7-102.7 %, $n=3$, RSD < 2.61 %). Metoda byla úspěšně aplikována při stanovení PM bromidu a VM bromidu v komerčních farmaceutických přípravcích.

A novel capillary electrophoretic method for the separation of pancuronium (PM) and vecuronium (VM) ions utilizing capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D) was devised and validated. The separation was carried out in bare fused-silica capillaries (50 μm i.d., 75/45 cm) at 25 °C. Optimal background electrolyte was 50 mM borate buffer of pH 9.5 containing 12.5 mg/ml of hydroxypropyl- γ -cyclodextrine; (phenyltrimethylammonium iodide was used as internal standard). The samples were injected hydrodynamically at 1000 mbar for 3 s. The separation was performed at +30 kV. Under such conditions the PM and VM were base-line resolved and the separation took < 4 min. Calibration curves were linear for both PM bromide and VM bromide in the range 25-250 $\mu\text{g/ml}$ with $r > 0.9968$. The limits of detection were 7 and 6 $\mu\text{g/ml}$ for PM bromide and VM bromide, respectively. The accuracy tested by recovery experiment at three concentration levels of added PM bromide and VM bromide was satisfactory (95.7-102.7 %, $n=3$, with RSD < 2.61 %). The method was successfully applied to the assay of PM bromide and VM bromide in commercial injection solutions.

6. Seznam zkratek

ACES	N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonová kyselina
ACN	acetonitril
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
FTMAI	fenyltrimethylamonium jodid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonová kyselina
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-morpholinoethansulfonová kyselina
MOPSO	3-morfolin-2-hydroxypropansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NaOH	hydroxid sodný
PMB	pankuronium bromid
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
TAPSO	3-N-tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-hydroxypropansulfonová kyselina
TBAI	tributylamonium jodid
TEAI	triethylamonium jodid
TMAI	trimethylamonium jodid
TRIS	tris[hydroxymethyl]aminomethan
UV	ultrafialová oblast spektra
VIS	viditelná oblast spektra
VMB	vekuronium bromid

7. Literatura a použité zdroje

1. Klouda, P., Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003
2. Dolník V., Úvod do kapilární elektroforézy, nakladatelství Vladislav Dolník, Brno 1994
3. Sørensen, H., Sørensen, S., Bjerregaard, C., Michaelsen, S., Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999
4. Šindelková, M., Stanovení septonexu ve farmaceutických přípravcích metodou kapilární zónové elektroforézy s vodivostní detekcí, Diplomová práce, FaF UK, Hradec Králové 2009
5. Ministerstvo zdravotnictví ČR, Český lékopis 2009, Grada Publishing, a.s, Praha 2009
6. Baker, D. R., Capillary electrophoresis, Hohn Wiley a Sons Inx New York, New York 1995
7. http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektrofor%C3%A9za#Kapil.C3.A1rn.C3.AD_g_elo.C3.A1_elektrofor.C3.A9za , 1.3.2011 16:18
8. <http://klinickafarmakologie.cz/savepdfs/far/2007/02/07.pdf>, 2.3. 14:45
9. <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/aet4-1271592875.pdf>, 2.3.2011 15:00
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin>, 2.3. 2011 15:30
11. http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf, 2.3.2011 16:00
12. http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm, 3.3.2011 16:00
13. http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf, 3.3.2011 16:15
14. Zemann, A.J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G.K., Analytical Chemistry 70 (1998) 563-567
15. Da Silva, J.A.F., do Lago, C.L., Analytical Chemistry 70 (1998) 4339-4343
16. Kubáň, P., Hauser, P. C., Electrophoresis 30 (2009) 176-188
17. Databáze léčiv AISLP, SPC přípravků Norcuron, Pavulon a Bridion, verze 2011.1
18. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing s.r.o., 2002
19. Kala, M., Lechowicz, W., Forensic Sci. Int. 2004, 143, 191-198.

20. Usui, K., Hishinuma, T., Yamaguchi, H., Saga, T., Wagatsuma, T., Hoshi, K., Tachiiri, N., Miura, K., Goto, J., *Legal Medicine* 2006, 8, 166-171.
21. Błażewicz, A., Fijałek, Z., Warowna-Grzeškiewicz, M., Banasiuk, J., *Journal of Chromatography A* 1204 (2008) 114-118
22. Ducharme, J., Varin, F., Bevau, D.R., Donati, F., Théoret, Y., *Journal of Chromatography* 579(1992) 79-86
23. Paanakker, J.E., Thio, J.M.S.L., Van den Wildenberg, H.M., Kaspersen, F.M., *Journal of Chromatography* 421 (1987) 327-335
24. Furuta, T., Canfell, P.C., Castagnoli, K.P., Sharma, M.L., Miller, R.D., *Journal of Chromatography* 427 (1988) 41-53
25. International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Q2(R1). Fed. Reg. 60, 1995, 11260 – 11262
26. Users Manual, Programmable Injector for Capillary Electrophoresis, Prince Technologies B. V., 1999
27. Quick Start Guide – User’s manual, Data Acquisition and analysis Software, PP van Mierlo, 2000

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Veronika Lužová