

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. David Kaliba

ELEKTROFORÉZA V KRÁTKÉ KAPILÁŘE S DUÁLNÍ DETEKČÍ

Electrophoresis in short capillary with dual detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. František Opekar, CSc.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. května 2014.

podpis

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza je analytická metoda, která je hojně využívána v laboratořích při řešení řady analytických problémů. Tato diplomová práce popisuje jedno z mnoha využití kapilární elektroforézy v unikátní instrumentální sestavě tvořené krátkou kapilárou a duálním detektorem kombinujícím bezkontaktní vodivostní a optickou UV detekci v jednom místě separační kapiláry.

V první části byla laboratorní sestava testována separací jednoduchých anorganických a organických iontů. Testovány byly obě části duálního detektoru pomocí sodných, draselných, tyraminových a histidinových iontů. Experimentálně zjištěné mobility použitých iontů byly srovnány s mobilitami vypočtenými z tabelovaných hodnot.

V druhé části byla sestava vyzkoušena při analýze látek ve složitějších reálných maticích, tvořených lékovými formami Acylcoffinu a B-komplexu od společnosti Zentiva, a.s. Z každé lékové formy byl vybrán jeden analyt, kofein z Acylcoffinu a thiamin z B-komplexu, u kterého byla některou z kalibračních metod stanovena jeho koncentrace. Koncentrace vybraného analytu byla následně srovnána s deklarovanou hodnotou uvedenou výrobcem lékové formy.

Klíčová slova:

kapilární elektroforéza; krátká kapilára; bezkontaktní vodivostní detekce; UV detekce; biologicky aktivní látky.

Abstract

Capillary zone electrophoresis is an analytical method frequently used in many laboratories for solving various analytical problems. This diploma thesis describes one of many applications of capillary zone electrophoresis using a unique laboratory apparatus composed of a short capillary and dual conductivity/UV detector placed in one detection point of the separation capillary.

In the first part of this thesis, the laboratory apparatus was tested by the separation of small inorganic and organic ions. Sodium, potassium, tyramine and histidine ions were used to test the two parts of the dual detector. Experimentally obtained mobilities of these ions were compared with those calculated from the tabulated values.

In the second part, the apparatus was used for determination of analytes in samples with more complex matrixes, pharmaceuticals Acylcoffin and B-komplex produced by Zentiva, a.s. One analyte was chosen from each pharmaceutical preparation for determination of its concentration in the preparation, caffeine from Acylcoffine and thiamine from B-komplex. The concentrations were calculated using three different calibration methods and the experimentally obtained values were compared with those specified by the pharmaceuticals producer.

Key words:

capillary electrophoresis; short capillary; contactless conductometric detection; UV detection; biologically active compounds.

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval profesoru RNDr. Františku Opekarovi, CSc., školiteli této diplomové práce, nejen za odborné vedení diplomové práce, ale také za trpělivost, vstřícnost a ochotu při vypracování práce a za věnovaný čas.

Mé rodině a přítelkyni děkuji za morální podporu během studia a cenné rady hlavně při opravování stylistických nedostatků. Velké díky také patří ostatním členům profesorského sboru katedry Analytické chemie UK za vstřícnost a ochotu během mého magisterského studia.

Obsah

1	ÚVOD.....	10
1.1	Cíle práce	11
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1	Kapilární elektroforéza	12
2.2	Historie elektromigračních metod	13
2.3	Základní testované elektroforetické parametry	14
2.3.1	Elektroforetická mobilita	14
2.3.2	Separční účinnost	16
2.4	Separace látek ve složité matrici	16
2.4.1	Elektroforetické metody stanovení vitaminů skupiny B.....	21
2.5	Stanovení kofeinu.....	21
2.5.1	Charakteristika kofeinu	21
2.5.2	Metody stanovení kofeinu, popis micelární elektrokinetické chromatografie	22
2.6	Použité kalibrační metody.....	26
2.6.1	Metoda vnitřního standardu.....	26
2.6.2	Metoda kalibrační přímky	27
2.6.3	Metoda standardního přídatku	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Duální detektor.....	29
3.2	Elektroforetická sestava	31
3.3	Chemikálie a roztoky.....	32
3.3.1	Chemikálie a roztoky pro stanovení základních elektroforetických parametrů.....	32
3.3.2	Chemikálie a roztoky používané při separaci vitaminů B	33
3.3.3	Chemikálie a roztoky použité při MEKC stanovení kofeinu	33
3.4	Pracovní postupy	34
3.4.1	Pracovní postup při stanovování elektroforetických parametrů.....	34
3.4.2	Pracovní postup při separaci vitaminů B	35
3.4.3	Pracovní postup při MEKC stanovování kofeinu	37

3.5	Statistické hodnocení výsledků	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
4.1	Testování vlastností systému	41
4.2	Separace vitaminů skupiny B.....	46
4.3	MEKC separace a stanovení kofeinu v tabletě Acylcoffinu.....	51
4.3.1	Rychlost pohybu micel a elektroosmotického toku.....	51
4.3.2	Stanovení obsahu kofeinu	52
4.3.3	Výsledky stanovení kofeinu a jejich hodnocení	56
5	ZÁVĚR.....	58
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	56

Seznam zkratek a symbolů

<i>A</i>	plocha píku [mV s]
<i>A(A)</i>	plocha píku analytu [mV s]
<i>A(K)</i>	plocha píku kofeinu [mV s]
<i>A(TH)</i>	plocha píku thiomočoviny [mV s]
<i>A(VS)</i>	plocha píku vnitřního standardu [mV s]
BGE	BackGround Electrolyte – základní (separační) elektrolyt
<i>c</i>	molární koncentrace [mol l ⁻¹]
<i>c(A)</i>	molární koncentrace analytu [mol l ⁻¹]
<i>c(K)</i>	molární koncentrace kofeinu [mol l ⁻¹]
<i>c(VS)</i>	molární koncentrace vnitřního standardu [mol l ⁻¹]
C ⁴ D	Capacitively Coupled Contactless Conductometric Detector – vodivostní část detektoru
<i>D</i>	difúzní koeficient [cm ² s ⁻¹]
EOF	Elektroosmotic Flow – elektroosmotický tok
<i>F</i>	Faradayova konstanta [96 485,3 C mol ⁻¹]
<i>F</i>	koeficient odezvy detektoru
<i>H</i>	výška píku [mV]
<i>H(A)</i>	výška píku analytu [mV]
<i>H(K)</i>	výška píku kofeinu [mV]
<i>H(TH)</i>	výška píku thiomočoviny [mV]
<i>H(VS)</i>	výška píku vnitřního standardu [mV]
<i>H_t</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
<i>k</i>	směrnice kalibrační přímky
<i>l</i>	délka kapiláry k detektoru [cm]
<i>L</i>	celková délka kapiláry [cm]
<i>L_{1,2}</i>	interval spolehlivosti
LOD	Limit of Detection - limit detekce
<i>n</i>	počet měření
<i>N</i>	počet teoretických pater
<i>q</i>	úsek kalibrační přímky

R	rozpětí experimentálních hodnot použitých ke statistickému zpracování
s	směrodatná odchylka hodnot použitých ke statistickému zpracování
t	Studentův koeficient pro méně než 30 hodnot
$t_{\text{mig},i}$	migrační čas i -tého iontu [s]
u	symbol pro Lordův test
u_0	symbol pro T-test
U	vložené napětí [V]
UV/VIS	Ultra Violet/Visible – optická část detektoru
\bar{x}	aritmetický průměr použitých hodnot
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky pro jednotlivé ionty [s]
λ_i^0	limitní molární vodivost i -tého iontu [$\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$]
μ	pravá hodnota při použití T-testu
μ_i	aktuální mobilita i -tého iontu [$\text{cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$]
$\mu_{\text{eff},i}$	efektivní mobilita i -tého iontu
μ_{eof}	mobilita látek bez náboje
σ	pološířka zóny v inflexním bodě křivky

1 ÚVOD

V neustále se měnícím světě a pod tíhou nových poznatků je stále důležitější poznat pravou podstatu věcí, na které můžeme narazit téměř všude. Dnešní svět je rychlejší a tedy i nároky na přístroje, které mají objasnit problémy týkající se dnešního života, jsou mnohem vyšší. Stroje dnes musí pracovat mnohem rychleji a efektivněji, nejlépe však za polovinu sumy, která byla doposud do analýzy vkládána.

Kapilární elektroforéza je jedna z metod schopných napomoci člověku v jeho lepším poznání světa. Aby však mohla naplňovat i další podmínky pro dnešní přístroje, je nutné někde v experimentu udělat změnu oproti stávajícím pravidlům. Ve standardních komerčně dostupných aparaturách je doba separace zpravidla 5 – 60 minut. V dnešní době je však cílem zkrácení doby analýzy řádově na sekundy. Jednou z možností, jak zkrácení analýzy docílit, je zkrácení délky separační kapiláry z běžně používaných délek 50 až 100 centimetrů na jednotky centimetrů. U komerčních aparatur je možno použít dávkování do kratšího konce kapiláry, tj. konce u detektoru, v laboratoři je možno separovat látky ve specializované aparatuře s krátkou kapilárou [1]. Problémem kratších kapilár, výraznějším než při použití kapilár standardní délky, je vznikající Joulovo teplo při vyšších hodnotách procházejícího proudu. Separací napětí je tedy nutné volit tak, aby nedocházelo k tvorbě většího množství Joulova tepla a nedocházelo k výraznému ovlivnění separační účinnosti. Dalším problémem je skutečnost, že krátkou kapilárou nelze pohybovat tak, jako kapilárou standardních délek, proto musí být pro dávkování a promývání kapiláry použito speciální aparatury [2]. Zkrácení doby analýzy je však na krátkých kapilárách velice výrazné, proto se stále více vědeckých pracovníků ubírá směrem zkracování kapilár.

Detektory používané v kapilární elektroforéze jsou srovnatelné s používanými detektory v metodách kapalinové chromatografie. Ve snaze o separaci a analýzu stále komplikovanějších vzorků je nutné, aby použité detektory byly schopné detegovat jak anorganické látky, tak látky organické. Především anorganické ionty nemají potřebný chromofor a nelze je detegovat standardním spektrofotometrickým detektorem. Detegovat současně oba druhy analytů je možné za použití duálního detektoru – detektoru spojujícího, nejlépe do jednoho detekčního místa, dva detektory, kdy každý měří jinou vlastnost analyzovaného materiálu.

Duální detektor použitý v této práci je složený z laboratorní bezkontaktní vodivostní cely (detegující především malé anorganické ionty – detektor je často popisován zkratkou C⁴D, odvozenou z názvu Capacitively Coupled Contactless Conductometric Detector) a komerční spektrofotometrické UV/VIS cely (vhodné především pro organické látky schopné absorbovat záření).

1.1 Cíle práce

Cílem první části předkládané práce je testování unikátní laboratorní aparatury kombinující elektroforetickou separaci v krátké kapiláře s duálním detektorem pomocí jednoduchých anorganických a organických iontů. Tímto testováním budou ověřeny vybrané funkční parametry především detektoru, který byl zkonstruován ve spolupráci s firmou ECOM, s.r.o. novým způsobem s využitím komerčních komponent. Experimentálně zjištěné mobility použitých iontů budou srovnány s mobilitami vypočtenými z tabelovaných hodnot.

Druhá část práce má za cíl využít aparaturu pro separaci a analýzu některých složek vybraných farmaceutických preparátů – thiaminu v B-komplexu a kofeinu v tabletě Acylcoffinu, oba od společnosti Zentiva, a.s. U vybraných analytů budou stanoveny jejich koncentrace v léčivu jednou z kalibračních metod a porovnány s deklarovanou hodnotou výrobcem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Funkce jednotlivých částí laboratorní aparatury byla testována separací modelových směsí analytů a porovnáním výsledků s tabelovanými hodnotami, tam, kde to bylo možné. Pozornost byla zaměřena na proces dávkování do krátké kapiláry a na činnost kombinovaného bezkontaktního vodivostního a UV/VIS detektoru. Sledovanými a vyhodnocovanými parametry byla, kromě separační účinnosti, která může být považována za měřítko funkce dávkovací části aparatury, také elektroforetická mobilita.

2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří do rozvětvené rodiny elektromigračních separačních metod prováděných v kapilárním instrumentálním formátu.

Do této rodiny patří zónová elektroforéza (CZE), izoelektrická fokusace (CIEF), izotachoforéza (CITP), elektroforézy prováděné v síťových prostředích (agarosová a polyakrylamidová gelová elektroforéza, SDS elektroforéza) či bioafinitní elektroforéza (založená na interakci biochemicky aktivních látek např. antigen – protilátka) [3, 4]. Posledním typem jsou metody spojující elektroforetické a chromatografické principy jako micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC).

Pojmem kapilární elektroforéza nebo také vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) se dnes souhrnně označují metody dosahující stovek tisíc teoretických pater [3]. Kapilární zónová elektroforéza je experimentálně jednoduchá elektroanalytická metoda využívající rozdílné pohyblivosti iontů v roztoku nosného elektrolytu (BGE) v elektrickém poli přiváděném z externího zdroje. Pro separaci látek touto metodou je proto důležité, aby separovaný analyt byl schopný tvořit v roztoku kationt či aniont. Podobně jako v dalších elektroanalytických metodách se pohybují kationty k opačně nabitě katodě a anionty k anodě. K pohybu látek v kapiláře přispívá i elektroosmotický tok (EOF), který vzniká v nejčastěji používané křemenné kapiláře v důsledku elektrostatické interakce kationtů v roztoku s opačně nabitou stěnou kapiláry. Elektroosmotický tok přispívá k transportu

látek separační kapilárou a za určitých okolností, při dostatečné velikosti, může změnit směr pohybu látek v kapiláře [5].

Ionty jsou během pohybu separační kapilárou rozděleny na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti, která je přímo úměrná náboji a intenzitě elektrického pole v kapiláře a nepřímo úměrná velikosti iontu (včetně hydratačního obalu) a viskozitě nosného elektrolytu [3]. Rozdělené ionty dorazí k detektoru v uzavřené zóně v rozdílném čase od nástřiku. Každý z analytů nesoucí náboj, pokud nejsou elektroforeticky stejně či podobně rychlé, dorazí ve své vlastní zóně. Výjimku tvoří látky bez náboje, které dorazí ve společné zóně, jejíž pohyb v kapiláře je řízen EOF [6].

Díky své obrovské účinnosti se tyto metody dostávají na úroveň jiných analytických a doposud mnohem více rozšířených metod jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Metody HPCE jsou stále více využívány jako kontrolní či srovnávací metody k metodám chromatografickým a v neposlední řadě také jako samostatné metody, jež jsou využívány v desítkách komerčních laboratoří či podnicích po celém světě [3].

2.2 Historie elektromigračních metod

Začátky první sestavené aparatury a první experimenty elektromigračních metod se datují na začátek 19. století, kdy se několika vědcům po sobě (prvním byl F. von Reuss (1808)) podařily experimenty v U-trubici. V roce 1856 byl von Reuss následován G. Wiedemanem. Roku 1897 odvodil Friedrich Kohlraus rovnici popisující migraci iontů v elektrickém poli a elektromigrační metody se dostaly do popředí zájmu vědců z celého světa.

Na začátku 20. století se většina experimentátorů pracujících na zdokonalování elektromigračních metod zajímala o gelovou elektroforézu a izoelektrickou fokusaci na gelové matici. V roce 1937 byla sestavena švédským vědcem Arne Tiselielem první elektroforetická aparatura, využívající pohybu iontů v elektrickém poli, více popsána v [7]. Arne Tiselius zjistil, že proteiny vytvořené směsí migrují v trubici s pufrem určitým směrem na základě jejich náboje a mobility. Za svoji práci v oblasti separací získal Tiselius v roce 1948 Nobelovu cenu [4, 8].

V 2. polovině 20. století navázal na Tiseliusovu práci švédský biochemik Stellan Hjertén, který k experimentům používal rotující 1 - 3 mm trubice. Po Hjerténovi došlo k dalšímu mohutnému rozvoji, vytvoření a popsání nových elektromigračních metod jako jsou izoelektrická fokusace a izotachoforéza. V roce 1981 byla k separaci poprvé použita kapilára o průměru 75 μm Jamesem W. Jorgensonem a K. D. Lukacsem [9, 10].

Roku 1984 se japonskému vědci Shigeru Terabe povedlo separovat neutrální látky pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) využívající přísadku povrchově aktivní látky do roztoku základního elektrolytu [11, 12].

První komerčně dostupný přístroj pro CZE byl vyvinut firmou Beckman Instruments v roce 1988 [13].

2.3 Základní testované elektroforetické parametry

Prvním úkolem při použití laboratorně sestrojeného duálního detektoru bylo jeho testování pomocí jednoduchých anorganických a organických iontů. Organický iont použitý v této části by měl poskytovat odezvu v obou typech použitých detektorů, protože anorganické ionty poskytují odezvu pouze na vodivostní části.

2.3.1 Elektroforetická mobilita

Aktuální elektroforetické mobility iontů (μ_i) byly vypočítány z parametrů odečtených ze získaných elektroferogramů. Pro elektroforetickou mobilitu platí rovnice (1) [4]:

$$\mu_i = \frac{l \cdot L}{t_{\text{mig},i} \cdot U} \quad (1)$$

Z rovnice (1) platí pro experimentálně měřitelnou veličinu (migrační čas) vztah (2):

$$t_{\text{mig},i} = \frac{l \cdot L}{\mu_i \cdot U} \quad (2)$$

kde: $t_{\text{mig},i}$ - migrační čas příslušného iontu odečtený z elektroferogramu [s], μ_i - aktuální mobilita iontu [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$], l - délka kapiláry k detektoru [cm], L - celková délka kapiláry [cm] a U - použité separační napětí [V].

Ze vztahu (2) platí pro převrácenou hodnotu migračního času rovnice (3):

$$\frac{1}{t_{\text{mig},i}} = \frac{\mu_i}{l \cdot L} \cdot U \quad (3)$$

z níž je zřejmé, že závislost převrácené hodnoty migračního času na separačním napětí je lineární. Aktuální elektroforetická mobilita iontu byla vypočítána ze směrnice této závislosti a ze známých hodnot délek kapiláry (4):

$$\mu_i = k \cdot l \cdot L \quad (4)$$

kde: k - směrnice regresní přímky, zbylé veličiny byly vysvětleny výše.

Podle stejného postupu byla vypočtena i pohyblivost látek bez náboje nesených elektroosmotickým tokem (EOF), kdy experimentálním údajem byla doba od nástřiku vzorku k odezvě detektoru na nástřikovou zónu (tzv. water gap), t_{eof} . Ze směrnice závislosti převrácené hodnoty této doby na separačním napětí byla určena hodnota μ_{eof} . Efektivní elektroforetická mobilita iontů ($\mu_{\text{eff},i}$) byla vypočítána podle vzorce (5) [4]:

$$\mu_{\text{eff},i} = \mu_i - \mu_{\text{eof}} \quad (5)$$

kde: μ_{eof} - mobilita zóny látek bez náboje a $\mu_{\text{eff},i}$ - efektivní mobilita iontu.

Efektivní mobilita testovaných anorganických iontů mohla být porovnána s teoretickou hodnotou efektivní mobility ($\mu_{\text{eff}(t),i}$) vypočtenou podle vzorce (6) z tabelovaných hodnot [14]:

$$\mu_{\text{eff}(t),i} = \frac{\lambda_i^0}{F} \quad (6)$$

kde: $\mu_{\text{eff}(t),i}$ - teoretická efektivní mobilita iontu, λ_i^0 - limitní molární vodivost příslušného iontu [$\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$] a F - Faradayova konstanta [$96\,485,3 \text{ C mol}^{-1}$].

2.3.2 Separáční účinnost

Podobn jako v chromatografických metodách i v CZE je separační účinnost vyjadřována počtem teoretických pater (N) nebo výškovm ekvivalentem teoretického patra (H_t). Výška patra je pomyslnou délkou separačního prostředí odpovídající určité šířce zóny analytu. Za předpokladu, že rozložení analytu v zóně lze popsat Gaussovo křivkou, platí pro výšku patra vztah $H_t = \sigma^2/L$, kde σ je pološířka zóny v inflexním bodě křivky. Mezi výškou patra a počtem pater platí vztah $N = L/H_t$ [14].

Účinnost je často vztažena na jednotkovou délku kapiláry (nejčastejši na 1 metr). Separáční účinnost kapiláry vyjádřená počtem pater byla z experimentálních údajů vypočtena podle vzorce (7) a porovnána s teoretickou hodnotou počtu teoretických pater vypočtenou podle vzorce (8) [14]:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{\text{mig},i}}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (7)$$

$$N = \frac{\mu_{\text{eff}} \cdot U \cdot l}{2 \cdot D \cdot L} \quad (8)$$

kde: $w_{1/2}$ - odečtená šířka píku v polovině výšky pro jednotlive ionty [s], D - difúzní koeficient (použitá byla hodnota $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) a N - počet teoretických pater. Ostatní veličiny byly popsány výše.

2.4 Separace látek ve složite matici

Dualní detekce je velice výhodná pokud se jedná o detekci látek ve složite matici. Jako složitá matrice byl v této diplomové práci použit multivitaminový tabletový přípravek od společnosti Zentiva, a.s., B-komplex. Vitaminy skupiny B jsou rozpustné ve vodě a některé poskytují odezvu na obou typech detektorů. Metodou kapilární

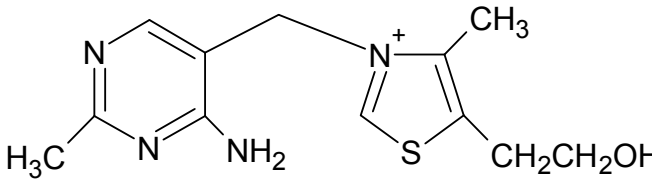
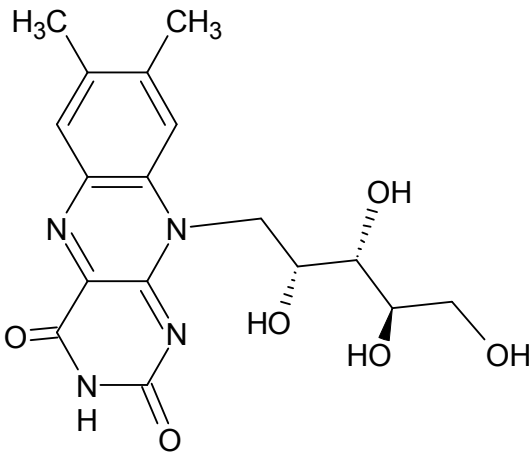
elektroforézy popsané v této práci byly separovány vitaminy thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantotenová a pyridoxin a následně stanovován thiamin. Přehled základních vlastností těchto vitamínů skupiny B uvádí tabulka 2.1 na následující straně.

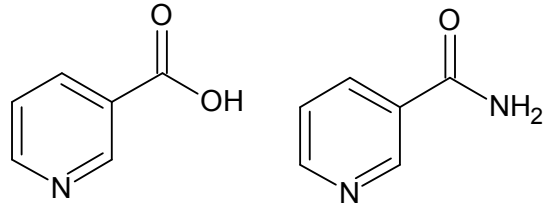
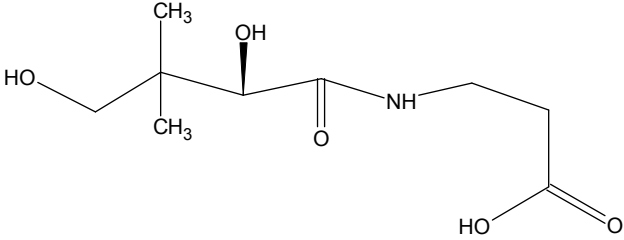
Vitaminy jsou látky důležité pro fungování enzymů, hormonů nebo k likvidaci nebezpečných volných radikálů v lidském těle. Některé vitaminy jsou často přijímány ve formě inaktivních prekurzorů – provitaminů, které se teprve působením specifických enzymů mění na účinnou látku [15]. Tyto organické většinou exogenní, esenciální, nízkomolekulární sloučeniny jsou nezbytné pro správnou činnost lidského těla a hrají důležitou roli v celé řadě fyziologických procesů, především v metabolismu tuků, cukrů a bílkovin [16, 17]. Jsou také schopné zpomalovat některé degenerativní procesy způsobené stárnutím a příznivě působí na náš imunitní systém [18].

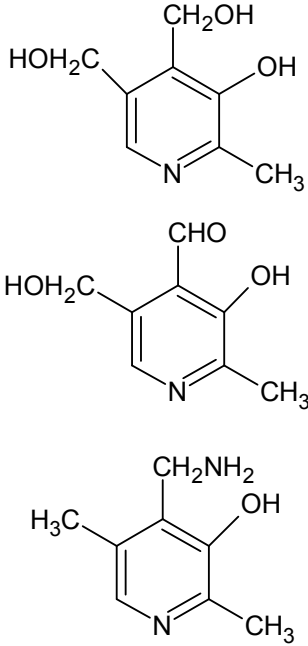
Výraz vitamin byl poprvé použit v první čtvrtině 20. století, kdy polský biochemik Kazimierz Funk objevil v otrubách rýže první vitamin skupiny B. Funk navrhl pro tuto nově nalezenou sloučeninu výraz vitamin, jako složeninu latinských slov vita a amine = „pro život důležité aminy“, což je odborné chemické označení pro velkou rodinu látek biologického původu obsahující v molekule aminoskupinu [19]. Ačkoliv podle dnešních poznatků ne všechny vitaminy mají v sobě aminoskupinu, některé nemají v molekule ani atom dusíku, tento název se ujal.

Do komplexu vitamínů B můžeme zařadit vitaminy B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin neboli kyselina nikotinová či nikotinamid), B₄ (adenin), B₅ (kyselina pantotenová), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin), B₈ (inositol), B₉ (kyselina listová), B₁₀ (kyselina para-aminobenzoová), B₁₁ bylo přiřazeno cholinu, který dnes není považován za vitamin, a B₁₂ (kobalamin) [20, 21].

Tab. 2.1 - Přehled stanovovaných vitaminů v B-komplexu, jejich vzorce, vlastnosti, metody stanovení a význam pro člověka [22-36].

Vitamin	Název	Vzorec	Význam pro člověka	Metody stanovení	Poznámky
B ₁	Thiamin	 <p>2,5-dimethyl-6-aminopyrimidin vázaný přes methyl na 4-methyl-5-hydroxyethylthiazol</p>	Podporuje růst, zlepšuje nervovou činnost, pomáhá při trávení sacharidů a potlačuje bolesti zubů	Chromatografické metody (zvláště HPLC a GC), mikrobiologickými metodami a fluorimetrickými metodami	Ve vodných roztocích málo stabilní, termolabilní, V kyselém prostředí (pH<5) je relativně stabilní, v neutrálním a alkalickém prostředí se rozkládá na pyrimidonovou a thiazolovou složku při teplotách nad 100 °C nebo při působení UV záření. Váže se na bílkoviny za vzniku složitějších komplexů
B ₂	Riboflavin	 <p>7,8-dimethyl-10-(-1-D-ribityl)-izoalloxazin</p>	Napomáhá procesu vidění, kdy převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené, pomáhá při růstu a dělení buněk, chrání kůži, nehty a vlasy, podporuje trávení bílkovin, cukrů a tuků, zmírňuje bolesti hlavy při migréně	Chromatografické metody (zvláště HPLC), fluorimetrickými metodami, mikrobiologickými metodami a při vyšších koncentracích i polarograficky	Žlutá krystalická látka, poměrně stabilní, v alkalickém a neutrálním prostředí na něj působí sluneční záření a dochází k jeho částečné degradaci na lumichrom nebo lumiflavin v závislosti na pH roztoku. Nestálý při působení silného UV záření, kdy se z molekuly odštěpuje ribitolový zbytek. Ve vodě je poměrně málo rozpustný (85 mg/l), teplotně je však velice stálý i v silně zahřátých roztocích

Vitamin	Název	Vzorec	Význam pro člověka	Metody stanovení	Poznámky
B ₃	Niacin (kyselina nikotinová)	 <p>Kyselina nikotinová (vlevo), nikotinamid (vpravo)</p>	Napomáhá odbourávání cukrů, tuků, alkoholů, aldehydů nebo karboxylových kyselin. Nezbytný pro tvorbu sexuálních hormonů, dobrou funkci centrálního nervového systému i periferních nervů, snižuje hladinu cholesterolu.	Metody kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, spektrofotometrie a kapilární elektroforéza.	Kyselina nikotinová je stabilní v kyselém i alkalickém prostředí, nikotinamid je stabilní v neutrálním prostředí. V kyselém a alkalickém prostředí se nikotinamid hydrolyzuje na kyselinu nikotinovou. Obě formy jsou termostabilní až do teploty 120 °C, dobře odolávají účinkům slunečního záření. Nepříznivě na niacin působí silná oxidační činidla a silné kyseliny.
B ₅	Kyselina pantothenová	 <p>Kyselina pantothenová</p>	V molekule koenzymu A, důležitého v syntetických reakcích mastných kyselin. Účast na tvorbě enzymů, zlepšení projevů akné a alergií, odstranění zánětů dutiny ústní a dásní nebo odstranění poruch pozornosti.	Stanovení produktů hydrolytického štěpení molekuly metodami kapalinové a plynové chromatografie a mikrobiologickými metodami.	Stabilita kyseliny pantothenové ve vodných roztocích je závislá na hodnotě pH daného roztoku. V kyselém prostředí se rozkládá na alanin a pantoovou kyselinu, v zásaditém pak na alanin a laktón pantoové kyseliny. Její stabilita při vyšších nebo vysokých teplotách je odvislá od hodnoty pH okolního roztoku, na světle je poměrně stabilní.

Vitamin	Název	Vzorec	Význam pro člověka	Metody stanovení	Poznámky
B ₆	Pyridoxin	 <p>Pyridoxin (2-methyl-3-oxy-4,5-di(oxymethyl)-pyridinin) (nahore), pyridoxal (uprostřed), pyridoxamin (dole)</p>	<p>Podílí se na přeměnách aminokyselin při glykolýze. Mezi další pozitivní vlastnosti patří posílení imunitního systému, usnadnění trávení bílkovin a tuků, podpora syntézy mastných kyselin nebo jako prevence proti ledvinovým kamenům.</p>	<p>Spektrofotometrické a chromatografické metody a v poslední době stále méně využívanými metodami mikrobiologickými.</p>	<p>Stálý v kyselých roztocích, méně pak v neutrálních a alkalických roztocích. Na světle se jeho stabilita řídí pH okolního vodného roztoku, v alkalickém prostředí světlo napomáhá jeho rychlejší degradaci. Teplotně je poměrně stabilní, rozkládat se začne při teplotách nad 90°C</p>

2.4.1 Elektroforetické metody stanovení vitaminů skupiny B

Nejčastěji jsou vitaminy jednotlivě stanovovány metodami kapalinové a plynové chromatografie, spektrofotometrickými nebo mikrobiologickými metodami (viz tabulka 2.1). Ve směsi lze vitaminy skupiny B stanovit i metodami kapilární elektroforézy. Ke společnému stanovení lze využít kapilární zónovou elektroforézu, kde se nejčastěji využívají dlouhé kolony od 50 do 100 cm, micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC) nebo mikroemulzní elektrokinetickou kapilární chromatografií (MEEKC). Detekce probíhá nejčastěji na UV detektoru s vlnovými délkami od 200 do 250 nm. Jako nosné elektrolyty jsou využívány fosfátové nebo borátové pufrы o pH v rozmezí 5 - 8 s možným přidavkem povrchově aktivní látky (nejčastěji SDS) u metod MEKC nebo MEEKC [37-43]. Mezi další možnosti stanovení B vitaminů ve směsi patří metody spektrofotometrické, chromatografické (především HPLC) a elektrochemické na iontově selektivních elektrodách nebo borem aktivovaných diamantových elektrodách. Postupy stanovení vitaminů ve směsném vzorku jsou popsány např. v dílech [44-46].

2.5 Stanovení kofeinu

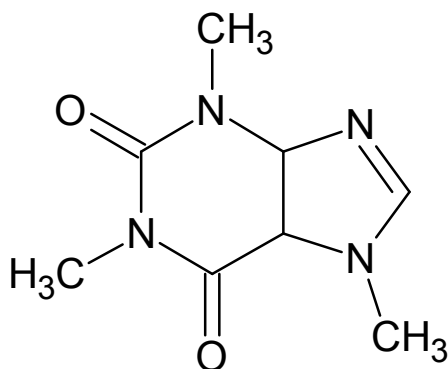
Další stanovovanou látkou ve vzorku se složitou maticí byl kofein ve vzorku Acylcoffinu. Kofein je látka schopná absorbovat UV záření a poskytovat odezvu na UV části detektoru. Jako látka neutrální však neposkytuje odezvu na vodivostní části duálního detektoru a je nerozdělitelný od neutrálních látek metodou kapilární elektroforézy, proto bylo nutné k separaci použít metody micelární elektrokinetické separace.

2.5.1 Charakteristika kofeinu

Kofein byl poprvé v čisté formě izolován v podobě bílého prášku německým chemikem Frielebem Friedrichem Rungem papírovou chromatografií v extraktu černé kávy roku 1819 [47]. Kofein patří do rodiny purinových alkaloidů odvozených

od xantinu (produkt oxidace purinu), kde je doprovázen jinými alkaloidy teobrominem nebo teofylinem [48].

Kofein (1,3,7-trimethylxanthin, viz obr. 2.1) se vyskytuje ve formě hedvábně lesklých jehlicovitých krystalků nebo jako bílý krystalický prášek bez zápachu s charakteristicky slabě hořkou chutí, díky které je přidáván jako aditivum do nejrůznějších potravin nebo energetických nápojů [49].



Obr. 2.1 - Vzorec kofeinu, podle [49].

Oblíbenost potravin s přidaným kofeinem nebo energetických nápojů vyplývá především z centrálně stimulujících účinků kofeinu. Na organismus působí analepticky, tedy poklesem únavy, zlepšením koncentrace a vnímání okolí, zlepšením nálady a zvýšením pracovní výkonnosti [50]. Kofein působí přednostně na mozkovou kůru a při nedostatku může způsobovat nežádoucí až abstinenční příznaky jako únava, bolest hlavy, úzkost, svalová ztuhlost či křeče [51].

2.5.2 Metody stanovení kofeinu, popis micelární elektrokinetické chromatografie

Kofein jako látku schopnou absorbovat UV záření je možné stanovit několika analytickými metodami. Mezi nejrozšířenější patří stanovení chromatografickými metodami, především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, plynovou chromatografií a zónovou kapilární elektroforézou.

Pomocí HPLC či RP-HPLC se kofein stanovuje nejrůznějšími postupy. Mezi ně patří pražení vzorků kávy, následná extrakce do vroucí vody, nastříknutí do kolony

se stacionární fází C18 a mobilní fází složenou z fosfátového pufru a methanolu (složení 85:15, v/v), detekce probíhá UV detektorem o vlnové délce 274 nm [52, 53]. Další postupy stanovení kofeinu metodou HPLC či RP-HPLC je možné najít v dílech [54-56].

Kofein je možné stanovit i chromatografií plynovou. Tato metoda není pro stanovení kofeinu příliš rozšířená [57].

I když jsou při stanovování kofeinu standardně používány metody chromatografické, ukázalo se, že kofein je možné stanovit i metodami elektromigračními, především zónovou kapilární elektroforézou. Kofein je pomocí CZE nejčastěji stanovován na dlouhých kapilárách o délce od 70 do 100 cm, detekce probíhá na UV či fluorescenčních detektorech nebo hmotnostních spektrometrech, nosné elektrolyty se používají s přídavkem SDS (poté se mluví o metodě MEKC) nebo bez SDS (nejčastěji glycinové pufrů) [58]. Další metody stanovení kofeinu pomocí CZE a MEKC jsou popsány v dílech [59-64].

Mezi další metody, kterými je možné stanovit kofein ve vzorku, se řadí infračervená spektrometrie, UV/VIS spektrometrie, voltametrie a potenciometrie [65-70]. Tyto metody však dnes ke stanovení kofeinu ve vzorcích nejsou využívány.

Protože u kofeinu nedochází k vytvoření náboje na molekule v běžných elektroforetických elektrolytech, není možné molekulu kofeinu rozdělit od jiných neutrálních molekul použitím zónové kapilární elektroforézy. Z tohoto důvodu byl kofein stanovován metodou micelární elektrokinetické chromatografie.

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je elektroanalytická metoda využívající přídavku povrchově aktivní látky (detergentu) do roztoku základního elektrolytu [71]. Povrchově aktivní látka napomáhá k separaci neutrálních molekul, které by nebylo možné použitím kapilární zónové elektroforézy rozdělit. Detergent vytvoří v roztoku základního elektrolytu micely (pseudostacionární fázi). MEKC je z kapilárních elektromigračních technik nejmladší a umožňuje kromě separace iontů i separaci neutrálních (hydrofobních a hydrofilních) molekul [72].

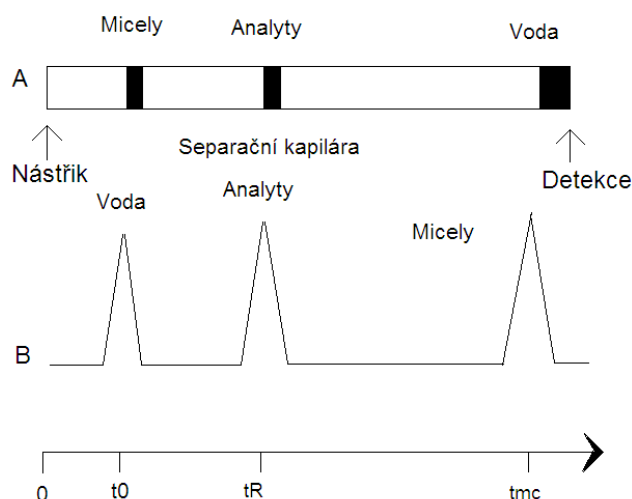
MEKC byla poprvé použita v roce 1982 (Terabe et al) jako kombinace chromatografických a elektroforetických principů a poprvé byla publikována v roce 1984 [12]. Metoda v sobě kombinuje jevy elektrokinetické (rozdělení látek v elektrickém poli) a chromatografické (rozdělení látek mezi dvě fáze).

Povrchově aktivní látka přidávaná do roztoku základního elektrolytu obsahuje hydrofilní a hydrofobní část [11]. K rozdělení analytů dochází kombinací rozdílného rozdělení mezi vodnou fází a fází tvořenou povrchově aktivní látkou a vlivem elektroforetické pohyblivosti [75]. Do vodného pufru je přidána povrchově aktivní látka v koncentraci vyšší než kritická micelární koncentrace, při níž se vytváří v pufru micely [72].

Povrchově nabitě micely migrují uvnitř pufru vlastní elektroforetickou rychlostí a unášejí separované analyty, které jsou více či méně přítomny uvnitř hydrofobních dutin micel. Všechny micely migrují stejnou rychlostí, ale stupeň solvatace molekul micelami udává rychlost unášení těchto molekul.

Protože různé molekuly mají jinou afinitu k pseudofázi vytvořené detergentem, jsou i rozdílně ovlivňovány pohybem micel, což se projeví jejich rozdílnou migrační rychlostí. Molekuly budou separovány v pořadí zvyšující se afinity k micelární fázi [3].

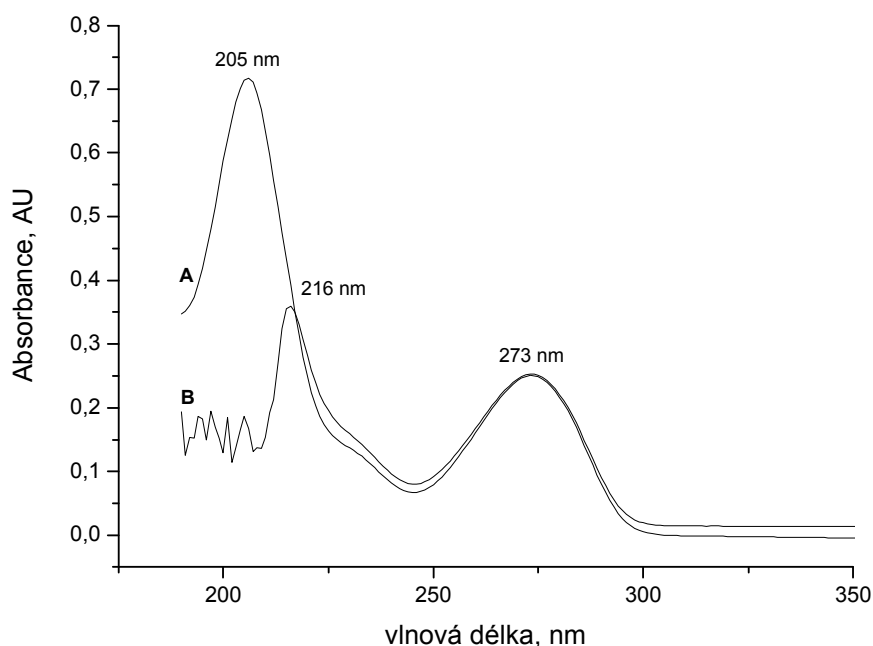
Nejčastěji používanou povrchově aktivní látkou je dodecylsulfát sodný (SDS). Základní informace o MEKC lze nalézt v literatuře, např. [76]. SDS micely jsou bezbarvé útvary mající záporný povrchový náboj nesené ke katodě elektroosmotickým tokem. V separační kapiláře tedy ke katodě nejrychleji putují neutrální látky nesené EOF bez interakce s micelami, poté neutrální látky účastnící se interakce s micelami a nakonec samotné micely (viz obr. 2.2).



Obr. 2.2 - Migrační okno v MEKC. A – Jednotlivé rozseparované zóny po nástřiku látek bez náboje do separační kapiláry; B – MEKC elektroferogram, podle [72].

Možnost detekce micel v optické části detektoru a změření rychlosti jejich migrace v kapiláře je možné pouze přidavkem sloučeniny, nejlépe barevné ve viditelné části spektra, která se na micely pevně váže. Takovou látkou může být přídavek roztoku hydrofobního barviva Sudanu III poskytující odezvu na optické části duálního detektoru. Rychlost elektroosmotického toku je možné změřit přidavkem methanolu nebo roztokem thiomocoviny, což jsou běžně používané tzv. „markery EOF“.

Kofein je schopný absorbovat procházející záření vysílané z vnějšího zdroje a poskytovat odezvu na optické části duálního detektoru. Ze spektra na obr. 2.3 je vidět, že kofein má v UV/VIS oblasti dvě maxima, přičemž v prostředí separačního pufru s SDS (spektrum B) nelze využít vlnové délky maxima v nemicelárním prostředí (spektrum A). K detekci byla použita vlnová délka 216 nm, umožňující o něco citlivější detekci než měření při 273 nm.



Obr. 2.3 - Spektrum kofeinu ve vodě (A) a v separačním pufru 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH 9,36) (B). Koncentrace kofeinu 4,96 mg l⁻¹.

2.6 Použité kalibrační metody

2.6.1 Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu spočívá v porovnání plochy (výšky) píku analytu a plochy (výšky) píku vnitřního standardu o známé koncentraci přidaného k roztoku vzorku, při znalosti koeficientu F , který charakterizuje možnou rozdílnou citlivost detektoru na analyt a vnitřní standard (koeficient odezvy detektoru). Látka použitá jako vnitřní standard nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku a musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku. Výhodou metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku.

Při známých koncentracích analytu i vnitřního standardu a známých odezvách na detektoru pro obě složky je možné určit F koeficient podle vzorce (9) [77]:

$$\frac{A(\text{VS})}{A(\text{A})} = F \cdot \frac{c(\text{VS})}{c(\text{A})} \quad (9)$$

kde: $A(\text{VS})$ - plocha píku vnitřního standardu [mV s], $c(\text{VS})$ - koncentrace vnitřního standardu [mol l^{-1}], $A(\text{A})$ - plocha píku analytu [mV s], $c(\text{A})$ - koncentrace analytu [mol l^{-1}]. Obdobná rovnice platí pro výšky píků (10), použity $H(\text{VS})$ a $H(\text{A})$ [mV]. V obou případech jsou rovnice rovnicemi přímky, jejichž směrnice je hledaný koeficient odezvy F .

$$\frac{H(\text{VS})}{H(\text{A})} = F \cdot \frac{c(\text{VS})}{c(\text{A})} \quad (10)$$

Po vypočtení F koeficientu se dosadí do stejné rovnice odečtené hodnoty ploch (výšek) píků změřených u roztoků vzorků s neznámou koncentrací $c(\text{A})$, do nichž byla přidána známá koncentrace vnitřního standardu $c(\text{VS})$. Pro výpočet neznámé koncentrace analytu $c(\text{A})$ z ploch píků platí rovnice (11). Obdobná rovnice platí pro výpočet koncentrace z výšek píků.

$$c(A) = \frac{A(A)}{A(VS)} \cdot F \cdot c(VS) \quad (11)$$

Rovnice (11) platí za předpokladu, že je úsek regresní přímky závislosti popsané rovnicemi (9) a (10) statisticky nevýznamný, tj. jeho nulová hodnota leží uvnitř intervalu spolehlivosti. Pokud je statisticky významný a nelze ho zanedbat, platí rovnice (12):

$$\frac{A(VS)}{A(A)} = q + F \cdot \frac{c(VS)}{c(A)} \quad (12)$$

kde: q – úsek. Výsledná koncentrace $c(A)$ se vypočítá podle rovnice (13):

$$c(A) = \frac{F \cdot c(VS)}{\frac{A(VS)}{A(A)} - q} \quad (13)$$

2.6.2 Metoda kalibrační přímky

Metoda kalibrační přímky spočívá v nalezení závislosti odezvy detektoru uváděné v plochách nebo výškách píků na známé koncentraci analytu. Při metodě kalibrační přímky se stanovuje přesně daný počet kalibračních roztoků o různých (ale známých) koncentracích analytu ve vzorku a odečítají se odezvové parametry detektoru. Po naměření a vyhodnocení výsledných elektroferogramů kalibračních roztoků se z naměřených hodnot vypočtou střední hodnoty, které se následně použijí k sestrojení grafu závislosti velikosti odezvy detektoru (výška, plocha píku) na koncentraci analytu ($c(A)$). Body grafu se proloží regresní přímkou, u které je vypočítána rovnice regrese (14) [77]:

$$A(A) = k \cdot c(A) + q \quad (14)$$

kde: k - směrnice regresní přímky a q – úsek regresní přímky.

Po vypočtení parametrů rovnice regrese se naměří neznámý vzorek obsahující stanovovaný analyt. Z elektroferogramu se odečte plocha píku ($A(A)$) a koncentrace se vypočítá z rovnice (15). Obdobná rovnice platí pro výpočet koncentrace z výšek píku.

$$c(A) = \frac{A(A) - q}{k} \quad (15)$$

2.6.3 Metoda standardního přídavku

Metoda standardního přídavku je další hojně využívanou kalibrační metodou. Jejím principem je přidání standardního roztoku o známé koncentraci přímo do vzorku, ve kterém se stanovuje koncentrace analytu, aby se zanedbal vliv matrice na výslednou koncentraci. Standardní roztok se z pravidla přidává ve dvou přídavcích.

Hodnoty odečítaného parametru (plocha, výška píku) se pak převedou do grafu závislosti velikosti odečítaného parametru na přidané koncentraci standardu. Výsledný graf se proloží regresní přímkou a z její rovnice je možné dopočítat hledanou koncentraci podle rovnice (16) [77]:

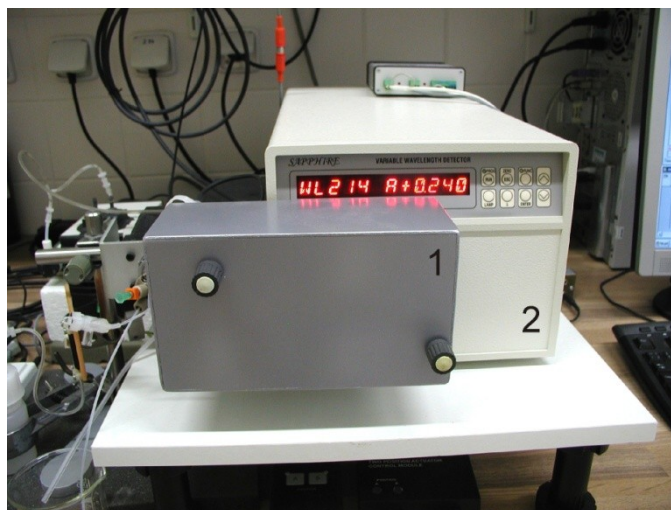
$$c(A) = \frac{q}{k} \cdot \frac{V}{V(A)} \quad (16)$$

kde: k - směrnice regresní přímky, q – úsek regresní přímky, V - celkový objem roztoku v odměrné baňce [ml] a $V(A)$ - objem roztoku vzorku vzatý k analýze [ml]. Zbylé použité symboly byly popsány výše.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Duální detektor

Použitý duální C^4D/UV detektor pro detekci při elektroforetické separaci v krátké kapiláře byl zkonstruován ve spolupráci s firmou ECOM, s. r. o. (ČR). Separační i detekční část byla vytvořena jako součást sériově vyráběného spektrofotometrického detektoru Sapphire od výše uvedené firmy. Detektor s krytem je ukázán na obr. 3.1. Separační kapilára, elektronické součásti bezkontaktního vodivostního detektoru a světlovodná vlákna jsou umístěny na čelním panelu detektoru Sapphire (2) pod opticky a elektrostaticky stínícím krytem (1).

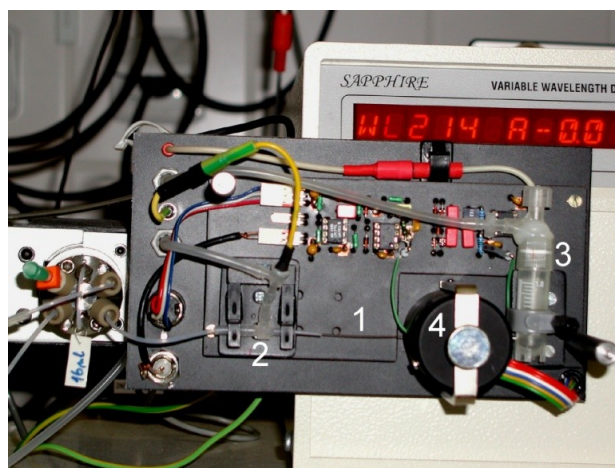


Obr. 3.1 - Celkový pohled na používanou aparaturu se separační a detekční částí umístěné pod krytem (1) na čelním panelu spektrofotometrického detektoru Sapphire (2).

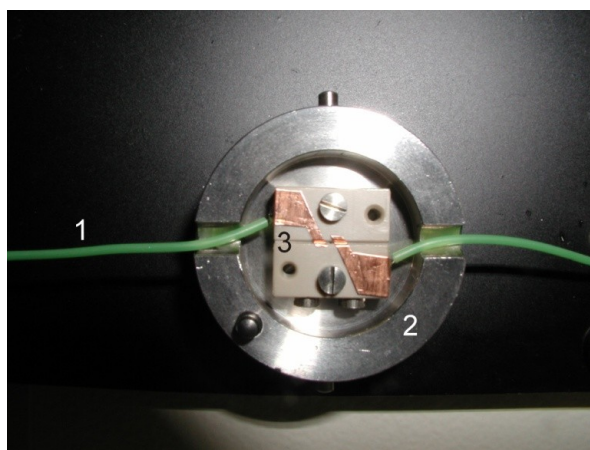
Vnitřní uspořádání separační a detekční části aparatury pod stínícím krytem je uvedeno na obr. 3.2. Na společné desce jsou umístěny součásti separační části aparatury – kapilára (1), dávkovací (2) a koncová (3) nádobka a elektronika C^4D . Detekčním elementem optického detektoru je velkoplošná fotodioda (4). Ta je umístěna na detekční cele, v níž je záření k detekčnímu okénku kapiláry přiváděno světlovodem od monochromátoru ve spektrofotometrickém detektoru. Záření je přiváděno mezi dvě semitubulární elektrody bezkontaktního vodivostního detektoru (obr. 3.3).

Elektrody vodivostní části detektoru byly vystříženy ze samolepící měděné fólie o tloušťce 35 μm (ELCHEMCo, s.r.o.; ČR); šířka elektrod je 1,7 mm, mezera mezi nimi 0,85 mm. Struktura detekční cely umístěné pod velkoplošnou fotodiódou je vidět na obr. 3.3.

Princip duálního $\text{C}^4\text{D}/\text{UV}$ detektoru, popis elektroniky vodivostní části detektoru a výhody využití jsou blíže popsány v práci [78]. Princip bezkontaktní vodivostní detekce v separačních metodách je popsán např. v práci [79].



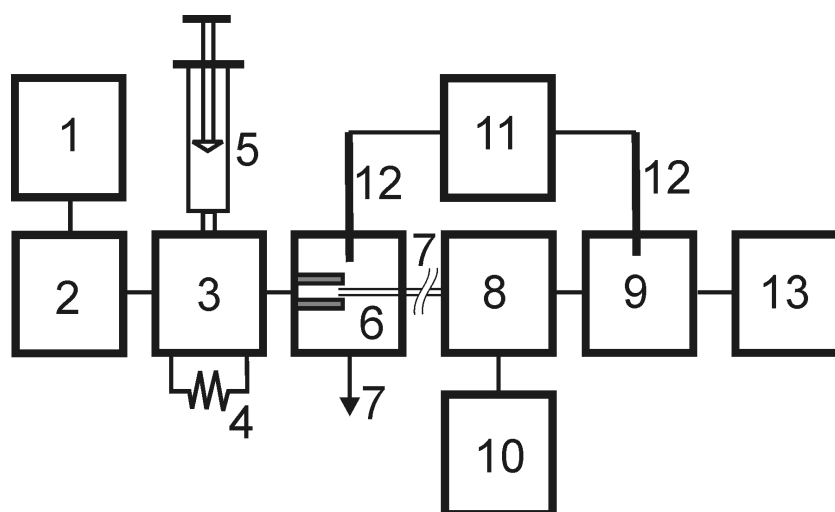
Obr. 3.2 - Separační a detekční části aparatury pro separace v krátké kapiláře s duální $\text{C}^4\text{D}/\text{UV}$ detekcí po odstranění krytu. (1) separační kapilára, (2) dávkovací nádobka, (3) koncová nádobka, (4) velkoplošná dioda – optická část duální detekční cely.



Obr. 3.3 - Detekční cely po odstranění velkoplošné fotodiody. (1) přívody k elektrodám, (2) držák velkoplošné fotodiody, (3) drážka pro vložení kapiláry.

3.2 Elektroforetická sestava

Elektroforetická aparatura je schematicky naznačena na obr. 3.4. Dávkování vzorku do kapiláry a její promývání bylo uvedeno v práci [2], kde jsou také uvedeny podrobnosti k jednotlivým částem aparatury. Drobnými změnami oproti popsané aparatuře je použití šesticestného elektromagneticky ovládaného dávkovacího ventilu VALCO (VICI Valco Instruments) místo ventilu C102M (Labio; ČR) a dvoukanálového AD převodníku ORCA 2000 (ECOM, s.r.o.; ČR) místo jednocanálového převodníku Panther od téže firmy.



Obr. 3.4 - Blokové schéma aparatury pro separace v krátké kapiláře. (1) zásobník separačního pufu, (2) piezoelektrická pumpa, (3) šesticestný dávkovací ventil, (4) dávkovací smyčka plněná vzorkem pomocí injekční stříkačky (5), (6) dávkovací nádobka, (7) separační kapilára, (8) duální detektor, (9) koncová nádobka, (10) zpracování a registrace signálu z detektoru, (11) vysokonapěťový zdroj, (12) elektroforetické elektrody, (13) promývací membránová pumpa, podle [78].

Separací kapilára, použitá k dalším popsaným měřením měla tyto charakteristiky: vnitřní průměr 50 μm , celková délka $L = 10,5$ cm, délka k detektoru $l = 8$ cm. Použitým detektorem by duální detektor; UV detektor měřil při vlnové délce 210, 212 a 216 nm (viz dále u popisu pracovního postupu při provádění jednotlivých úloh), vodivostní C^4D detektor měřil vždy při sinusovém signálu o frekvenci 450 kHz a amplitudě ± 17 V. Dávkování vzorku probíhalo klasickým šesticestným ventilem, dávkovací smyčka měla vnitřní objem 16 μl , vzorek byl do dávkovací smyčky plněn injekční stříkačkou

o objemu 1 ml. Nosný elektrolyt byl do systému přiváděn piezopumpou. Separáční napětí bylo voleno v rozsahu 1 až 6 kV. Aparatura byla ovládána programem vytvořenm v prostředí LabView (National Instruments; USA), elektroferogramy byly registrovány programem ECOMAC (ECOM, s.r.o.; ČR) a vyhodnocovány programem CSW (Data Apex) a Microsoft Excel.

3.3 Chemikálie a roztoky

Všechny dále uvedené roztoky byly připravovány s použitm deionizovan vody (Milli-Q Plus, Millipore; USA) a roztoky analytů byly uchovávány v chladničce.

3.3.1 Chemikálie a roztoky pro stanoven základních elektroforetických parametrů

- Tyramin hydrochlorid (98%, SIGMA-ALDRICH)
- MES (kyselina 2-(N-morpholino)-ethansulfonov, >99%, MERCK)
- LiOH.H₂O (pro analýsi, MERCK)
- H₃BO₃ (for electrophoresis, SIGMA-ALDRICH)
- L-histidin (>99%, MERCK)
- Kyselina octov (ist, LACHEMA BRNO)
- TRIS (Trizma base, minimum 99,9 %, SIGMA-ALDRICH)
- Hydroxid sodný (≥98%, SIGMA-ALDRICH)
- Roztok tyraminu (připraven ze zásobního 0,1 mol l⁻¹ roztoku)
- Ekvimolrn směs K⁺, Na⁺ a tyramin (koncentrace všech složek 0,1 mol l⁻¹, připraveno ze zásobního 1 mol l⁻¹ roztoku)
- 20 mmol l⁻¹ MES + 5 mmol l⁻¹ LiOH o pH = 5,9
- 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH o pH = 9,2
- 0,1 mmol l⁻¹ histidin v 50 mmol l⁻¹ kyseliny octov + 20 mmol l⁻¹ TRIS o pH = 4,5
- 0,1 mmol l⁻¹ histidin v H₂O
- 1 mmol l⁻¹ histidin v 50 mmol l⁻¹ kyseliny octov + 20 mmol l⁻¹ TRIS o pH = 4,5
- 1 mmol l⁻¹ histidin v H₂O
- 50 mmol l⁻¹ kyseliny octov + 20 mmol l⁻¹ TRIS o pH = 4,5

3.3.2 *Chemikálie a roztoky používané při separaci vitaminů B*

- Kyselina chlorovodíková (35% p.a., LACHNER NERATOVICE)
- Acetonitril (pro HPLC ≥ 99 , 8%, PENTA)
- Pyridoxin hydrochlorid (SIGMA-ALDRICH)
- Thiaminiumdichlorid (98,5%, MERCK)
- Kyselina nikotinová (SIGMA-ALDRICH)
- Riboflavin (99,1 %, pracovní standard Zentiva, a.s.)
- Kyselina pantothenová (97,7 %, pracovní standard Zentiva, a.s.)
- Hydroxid sodný ($\geq 98\%$, SIGMA-ALDRICH)
- 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH o pH = 9,14
- 0,01 mol l⁻¹ HCl
- tableta B – Komplex Forte (Zentiva, a.s.) složení dle výrobce: sacharosa, laktosa monohydrát, nikotinamid (50 mg/tab), kukuřičný škrob, talek (protispékavá látka), D-pantothenan vápenatý, riboflavin (15 mg/tab), thiamin hydrochlorid (15 mg/tab), pyridoxin hydrochlorid (10 mg/tab), oxid titaničitý (barvivo), triglyceridy železa, stearan vápenatý (protispékavá látka), včelí vosk (leštící látka), karboxymethylcelulosa (stabilizátor), oxid křemičitý (protispékavá látka), karnaubský vosk (leštící látka)

3.3.3 *Chemikálie a roztoky použité při MEKC stanovení kofeinu*

- CHES (2-(cyklohexylamino)-ethansulfonová kyselina, $\geq 99\%$, ROTH)
- SDS (dodecylsulfát sodný, $\geq 99\%$, SIGMA CHEMICAL CO.)
- Kofein (SANITAS S.P.)
- Sudan III (SOJUZREAKTIV, SSSR)
- Thiomočovina (p.a., LACHEMA)
- Hydroxid sodný ($\geq 98\%$, SIGMA-ALDRICH)
- 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS o pH = 9,30
- Roztok kofeinu (1 mg ml⁻¹) v H₂O
- 0,1 mmol l⁻¹ NaOH
- Tableta Acylcoffin (Zentiva, a.s.) složení dle výrobce: Acidum acetylsalicylicum (450 mg/tab.), Coffeinum anhydricum (50 mg/tab.), bramborový škrob, mastek

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Pracovní postup při stanovování elektroforetických parametrů

Testovacím vzorkem byl vodný roztok ekvimolární směsi sodných, draselných a tyraminových iontů o koncentraci všech složek $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$. Draselný a sodný kationt poskytovaly odezvu na vodivostním detektoru. Tyramin jako slabá aminokyselina poskytoval odezvu na obou detektorech.

Měření elektroforetické mobility sodných, draselných a tyraminových iontů probíhalo v borátovém pufru (20 mmol l^{-1} kyselina boritá + 10 mmol l^{-1} hydroxid lithný o $\text{pH} = 9,2$). Analýzy byly prováděny při vloženém napětí od 2000 V do 5000 V po kroku 1000 V . Procházející proud byl od 5 do $8 \text{ }\mu\text{A}$. Před začátkem měření byla kapilára propláchnuta deionizovanou vodou po dobu 2 minut a roztokem základního elektrolytu po dobu 2 minut. Po každém měření byla kapilára propláchnuta roztokem základního elektrolytu po dobu 20 vteřin.

Při každé hodnotě napětí byly proměřeny tři elektroferogramy zaznamenávající odezvu obou detektorů, které byly ukončeny po odeznění odezvy na nástřikovou zónu. Během měření se ukázala nutnost provedení minimálně dvou analýz testovací směsi po každé změně napětí k ustálení podmínek v kapiláře, teprve poté byly získány opakovatelné výsledky. UV detekce probíhala při 210 nm .

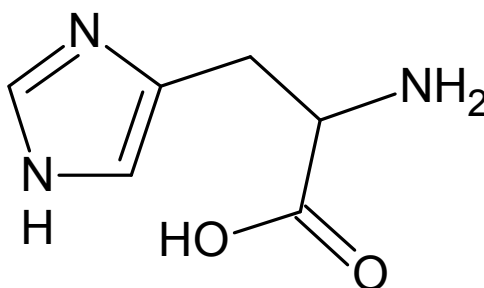
Z jednotlivých elektroferogramů byly odečteny hodnoty migračních časů testovaných iontů a nástřikové zóny, výšky píků, plochy píků a šířka v polovině výšky píku. Výpočty elektroforetických mobilit analyzovaných iontů a separační účinnost kapiláry probíhaly v programu Microsoft Excel.

Aktuální mobility byly vypočítány odečtením směrnic z grafů závislostí převrácené hodnoty migračního času iontu na vloženém napětí, kdy hodnota μ_i je rovna směrnici příslušné přímky vynásobené součinem efektivní a celkové délky kapiláry, viz rovnice (4). Pro každý iont byly změřeny tři směrnice ze tří po sobě jdoucích měření. Stejným způsobem byla získána mobilita látek bez náboje, charakterizující EOF. Z těchto hodnot byly počítány efektivní mobility dle vztahu (5).

Teoretické hodnoty efektivní mobility draselného a sodného iontu byly počítány dle vztahu (6) s použitím hodnot limitních iontových vodivostí, kdy pro draselný iont byla použita hodnota 73,5 a pro sodný iont 50,1 S cm² mol⁻¹[14].

Podle vzorce (7) byly vypočítány separační účinnosti vyjádřené počtem teoretických pater, pro každý jednotlivý iont zvlášť při každém vloženém napětí.

Separační účinnosti počítané z odezev obou detektorů byly rovněž porovnány měřeními roztoku histidinu o koncentracích 0,1 a 1 mmol l⁻¹. Vzorec histidinu je znázorněn na obrázku 3.5. Nosným elektrolytem byl roztok 50 mmol l⁻¹ kyseliny octové (HAc) a 20 mmol l⁻¹ TRIS o pH = 4,5. UV část duálního detektoru měřila při 212 nm, kdy histidin absorbuje nejvíce procházejícího záření. Procházející proud měl hodnotu 14 - 18 μA.



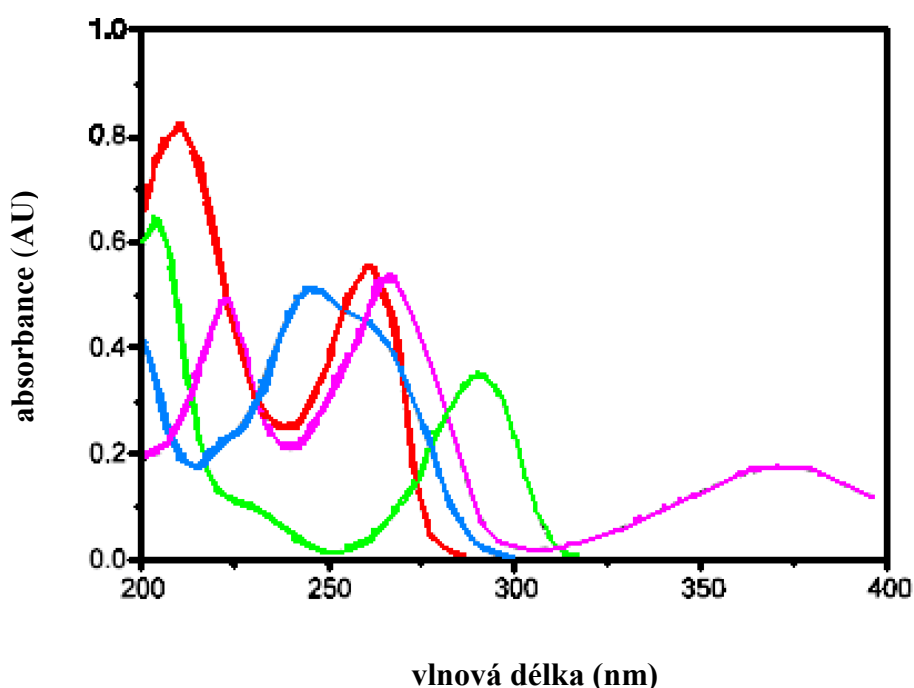
Obr. 3.5 – Vzorec histidinu, podle [80].

Výsledné hodnoty separačních účinností pro jednotlivé druhy roztoků byly vztaheny na 1 m kapiláry.

3.4.2 Pracovní postup při separaci vitamínů B

Vitamíny byly stanovovány v tabletě B-komplex od společnosti Zentiva, a.s. Kapilára byla aktivována před měřením každý měřící den 10 minut 0,1 mol l⁻¹ hydroxidem sodným, 3 minuty deionizovanou vodou a 2 minuty roztokem pufru při vloženém napětí 5 nebo 6 kV. Po aktivaci elektrody byly provedeny tři nástřiky kontrolního roztoku ekvimolární směsi sodných a draselných iontů o koncentraci obou

složek $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$. Po každém měření byla kapilára propláchnuta 40 vteřin roztokem pufru. Detekce probíhala na obou typech detektorů, protože některé ze stanovovaných vitaminů skupiny B mají v molekule chromofory a jsou schopny absorbovat procházející záření. Vlnová délka byla na UV detektoru nastavena na 216 nm, protože při této vlnové délce je absorbance UV záření všech stanovovaných vitaminů vhodná ke společnému stanovení (viz obr. 3.6). Základním elektrolytem použitým při všech měřeních byla směs 20 mmol l^{-1} kyseliny borité s 10 mmol l^{-1} hydroxidem lithným o $\text{pH} = 9,14$. Měření probíhala při 5 a 6 kV, protékající proud byl v rozmezí $3 - 5 \text{ }\mu\text{A}$.



Obr. 3.6 - Absorpční spektrum thiaminu (modrá), riboflavinu (fialová), niacinu (zelená) a pyridoxinu (červená), podle [81].

K přípravě vzorku bylo použito 5 tablet, které byly rozetřeny v třecí misce pomocí tloučku a rozpuštěny v 50ml odměrné baňce v roztoku $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové a 20% (v/v) acetonitrilu a doplněny po rysku tímto roztokem. Doplněný roztok obsahující tablety byl 5 minut sonifikován v ultrazvukové lázni. Následně byly odebrány 3 ml pomocí injekční stříkačky s nasazeným membránovým filtrem s $0,45 \text{ }\mu\text{m}$

póry do kádinky. Z přefiltrovaného roztoku byly odebrány 2 ml automatickou pipetou do 10ml odměrné baňky a doplněny po rysku roztokem pufru.

K identifikaci jednotlivých vitaminů obsažených v tabletě B-komplexu byly použity modelové roztoky obsahující vždy jen jeden vitamin nebo směsný roztok obsahující všechny vitamíny, které jsou v B-komplexu. Standardní roztoky vitaminů byly připraveny navážením 250 mg standardu každého vitaminu na analytických vahách a rozpuštěním v 50ml odměrné baňce v deionizované vodě. Z takto připraveného zásobního roztoku byl odebrán 1 ml automatickou pipetou do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku roztokem pufru. Koncentrace vitaminů v těchto roztocích byla $500 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Z vitaminů v tabletě B-komplexu bylo možno jednoduše stanovit pouze thiamin, viz dále. K jeho stanovení byla použita metoda standardního přídávku.

Z roztoku rozpuštěných tablet B-komplexu byly odpipetovány třikrát 2 ml do tří 10ml odměrných baněk, přičemž do první nebyl přidán standardní roztok thiaminu, do druhé byl přidán 1 ml standardního roztoku thiaminu a do třetí 2 ml roztoku thiaminu o koncentraci $500 \mu\text{g ml}^{-1}$. Následně bylo proměřeno 5 elektroferogramů každého připraveného roztoku. Z výsledných elektroferogramů byla programem CSW odečtena plocha píků thiaminu na obou typech detektorů. Z hodnot ploch píků byly sestrojeny závislosti plochy píku thiaminu na koncentraci přidaného standardního roztoku thiaminu k roztoku B-komplexu. Výsledné grafy byly proloženy regresní přímkou a z jejich rovnic byla vypočtena koncentrace thiaminu ve vzorku B-komplexu podle vzorce (16). Z vypočtených koncentrací byly vypočítány průměry a intervaly spolehlivosti.

3.4.3 Pracovní postup při MEKC stanovování kofeinu

Koncentrace kofeinu v lékové formě Acylcoffin byla změřena metodou micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Základním elektrolytem použitým při kalibračních měřeních i při měření analytu ve vzorku byl roztok 40 mmol l^{-1} CHES + 15 mmol l^{-1} NaOH + 50 mmol l^{-1} SDS o pH = 9,30. Kapilára byla aktivována před každou sérií měření roztokem $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ hydroxidu sodného po dobu 10 minut. Následně byla vyplachována po dobu 5 minut deionizovanou vodou a 10 minut

roztokem základního elektrolytu při přiváděném napětí 6 kV z vnějšího zdroje. Poté byly provedeny tři nástřiky roztoku kofeinu o libovolné koncentraci do systému na ustálení podmínek v kapiláře.

Před měřením koncentrace kofeinu byla změřena rychlost pohybu micel a rychlost elektroosmotického toku. Pohyb micel byl určen použitím přídavku barevné látky (Sudan III) do roztoku základního elektrolytu. Jako markery elektroosmotického toku byly použity roztoky thiomocoviny a methanolu. Roztok Sudanu III o koncentraci 2 mg ml^{-1} byl připraven rozpuštěním navážky pevného Sudanu III v methanolu. K měřením byl z tohoto zásobního roztoku odpipetován 1 ml automatickou pipetou do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku roztokem základního elektrolytu.

Zásobní roztok thiomocoviny o koncentraci 2 mg ml^{-1} byl připraven rozpuštěním navážky pevné thiomocoviny v deionizované vodě. Z takto připraveného zásobního roztoku thiomocoviny bylo odpipetováno 0,1 ml do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku roztokem základního elektrolytu.

Nejprve byly proměřeny pouze čisté roztoky Sudanu III a thiomocoviny o koncentraci 0,2 respektive $0,02 \text{ mg ml}^{-1}$, následně byl vytvořen směsný vzorek Sudanu III a thiomocoviny o totožných koncentracích jako u čistých roztoků. Jako poslední byly k roztoku Sudanu III přidány 2 ml roztoku kofeinu o koncentraci 2 mg ml^{-1} . Všechny popsané roztoky byly připraveny v 10ml odměrných baňkách a doplněny po rysku roztokem základního elektrolytu.

Všechny roztoky byly opakovaně proměřeny 7x při přiváděném napětí 5 a 6 kV. Používána byla pouze UV detekce při vlnové délce 216 nm. Z jednotlivých elektroferogramů měření byly odečteny migrační časy jednotlivých analytů. Stanovení koncentrace kofeinu v tabletě bylo prováděno metodou kalibrační přímky a metodou vnitřního standardu.

Při metodě kalibrační přímky byly ke kalibračním měřením použity roztoky kofeinu o koncentracích 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 a $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Byly připraveny ředěním vypočteného objemu zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 1 mg ml^{-1} základním elektrolytem v odměrných baňkách o objemu 10 ml. Ke každému kalibračnímu roztoku kofeinu bylo přidáno 0,05 ml roztoku thiomocoviny ze zásobního roztoku o koncentraci 2 mg ml^{-1} . Bylo tak možno kontrolovat EOF a z příslušných elektroferogramů mohl být

určen koeficient odezvy detektoru F pro kalibrační metodu vnitřního standardu, viz dále.

Tableta Acylcoffinu obsahující dle výrobce 50 mg kofeinu byla rozpuštěna v 50ml odměrné baňce v deionizované vodě. Odměrná baňka byla doplněna po rysku, čímž se získala předpokládaná koncentrace kofeinu 1 mg ml^{-1} . Roztok vzorku byl filtrován membránovým filtrem o velikosti pórů $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ nasazeným na injekční stříkačku pro odstranění nežádoucích složek tablety. Z takto připraveného zásobního roztoku vzorku byl odpipetován 1 ml do 10ml odměrné baňky, do níž bylo dále přidáno $0,05 \text{ ml}$ roztoku thiomočoviny o koncentraci 2 mg ml^{-1} jako vnitřního standardu. Poté byla baňka doplněna po rysku roztokem základního elektrolytu. Takto připraveným roztokem byla pomocí injekční stříkačky plněna dávkovací smyčka dávkovacího šesticestného ventilu a vzorek dávkován do kapiláry.

Měření probíhala při přiváděném napětí 6 kV a při vlnové délce 216 nm . Proud procházející kapilárou byl v rozmezí $36 - 41 \text{ } \mu\text{A}$. Každý kalibrační roztok byl proměřen $7x$. Z elektroferogramů byly odečteny migrační časy kofeinu a thiomočoviny, plochy a výšky píků a šířka píku v polovině výšky píku pro analyt i vnitřní standard. Z odečtených dat bylo možné vypočítat střední hodnoty plochy a výšky píku u jednotlivých kalibračních roztoků a sestavit kalibrační grafy závislosti výšky píku respektive plochy píku na koncentraci kofeinu. Body v grafech byly proloženy regresními přímkami, z nichž byly vypočítány rovnice regrese a korelační koeficienty. Rovnice kalibračních regresních přímek byly použity pro výpočet koncentrace kofeinu v tabletě dle rovnice (15).

Metoda vnitřního standardu využila přidavku stejné koncentrace thiomočoviny do kalibračních roztoků. K výpočtu F koeficientu (popsán blíže v kapitole 2.6.1) byly použity stejné elektroferogramy jako u metody kalibrační přímky. Z elektroferogramů byly odečteny výšky a plochy píků, vypočteny střední hodnoty pro jednotlivé koncentrace a dosazeny do rovnice (9). Podle rovnice (9) a (10) byly sestrojeny grafy závislosti $A(\text{TH})/A(\text{K})$, respektive $H(\text{TH})/H(\text{K})$ na $c(\text{TH})/c(\text{K})$. Body grafu byly proloženy regresní přímkou, u níž byla vypočtena rovnice regrese. Z parametrů regresní rovnice a odečtených hodnot ploch či výšek píků z elektroferogramů vzorku byla vypočtena koncentrace kofeinu v tabletě. Jelikož nebylo možné statisticky zanedbat úsek, byla koncentrace kofeinu vypočítána podle rovnice (12), respektive (13).

3.5 Statistické hodnocení výsledků

Z výsledků jednotlivých měření byl určen medián a pro statistické vyhodnocení a vypočítání intervalu spolehlivosti ($L_{1,2}$) byly použity následující vztahy (17) a (18) [82, 83]:

$$R = x_{i,max} - x_{i,min} \quad (17)$$

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm s \cdot \frac{t}{\sqrt{n}} \quad (18)$$

kde: R - rozpětí, \bar{x} - aritmetický průměr z použitých hodnot, t - Studentův koeficient pro méně než 30 hodnot pro příslušný počet měření a stupeň volnosti, n - počet měření a s - směrodatná odchylka použitých hodnot.

Výsledné koncentrace stanovované látky v tabletě získané z dat z obou detektorů a za použití různých kalibračních metod byly statisticky porovnány za pomoci Lordova testu, rovnice (19) [82]:

$$u = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{R_1 + R_2} \quad (19)$$

kde: \bar{x}_1 a \bar{x}_2 - střední hodnoty (průměry) koncentrací získaných dvěma metodami stanovení a R_1 a R_2 - rozpětí jednotlivých koncentrací.

Lordův test měl ukázat, zda dosažené výsledné koncentrace pomocí různých metod jsou statisticky shodné nebo se od sebe statisticky liší.

Shodnost dosažených výsledných koncentrací byly dále porovnány s pravou hodnotou koncentrace metodou T-testu podle vzorce (20) [82]:

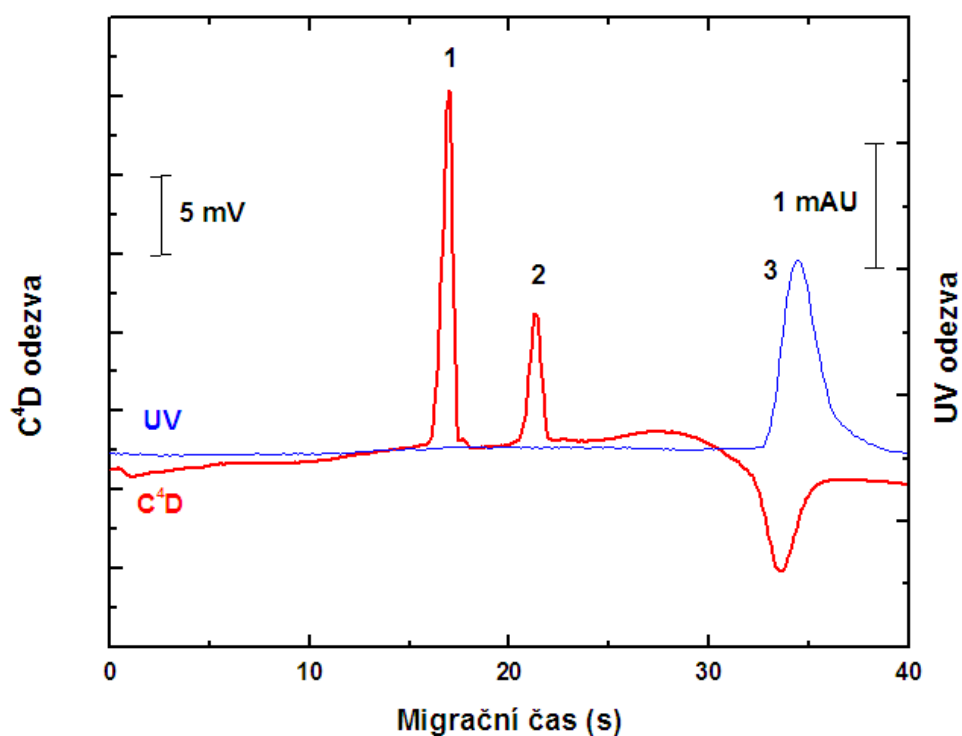
$$u_0 = \frac{|\bar{x} - \mu|}{R} \quad (20)$$

kde: \bar{x} - střední hodnota vypočtených koncentrací stanovované látky v tabletě, μ - pravá hodnota koncentrace v tabletě (zde deklarovaná hodnota výrobcem), R - rozpětí dosažených koncentrací.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

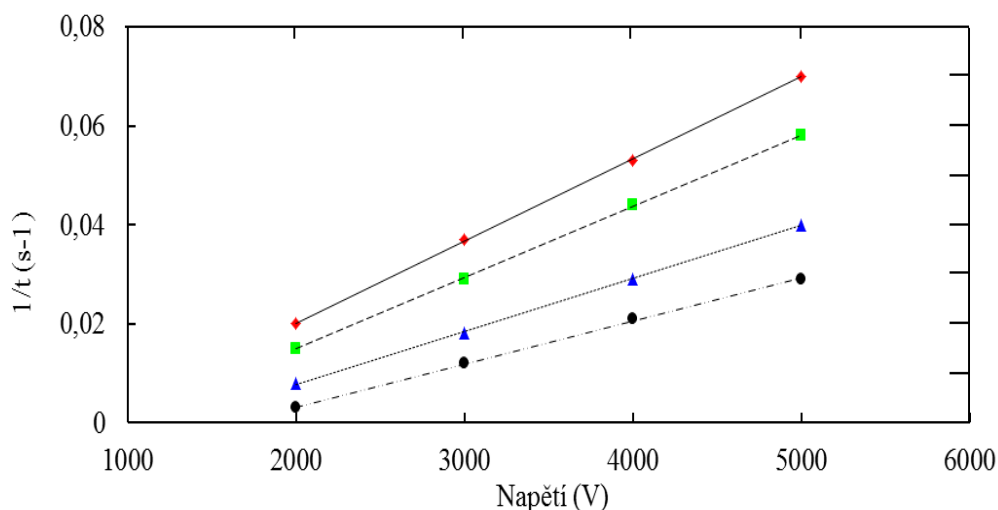
4.1 Testování vlastností systému

Prvním sledovaným parametrem je elektroforetická mobilita testovaných iontů. Elektroferogram je na obr. 4.1. Obr. 4.2 ukazuje závislost převrácené hodnoty migračního času na separačním napětí pro všechny testované ionty. Aktuální mobility iontů a mobilita látek bez náboje nesených EOF, které byly vypočítány ze směrnic přímků těchto závislostí a délky kapiláry včetně intervalů spolehlivosti, jsou uvedeny v tabulce 4.1.



Obr. 4.1 – Elektroferogram testované směsi draselného, sodného a tyraminové iontu o koncentraci všech složek $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ BGE: $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3 + 10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ LiOH}$ (pH = 9,2). Separační napětí 5kV, procházejí proud $8 \text{ } \mu\text{A}$, UV detekce při 210 nm. Píky identifikovány jako draselný iont (1), sodný iont (2) a tyraminový iont (3).

Jednotlivé píky na obrázku 4.1 byly identifikovány jako: draselný iont (1), sodný iont (2) a tyraminový iont (3). Tyraminový iont podle předpokladů poskytoval odezvu na obou typech detektorů.



Obr. 4.2 - Graf závislosti převrácené hodnoty migračního času na vloženém napětí pro jednotlivé testované ionty. Draselný iont (červená), sodný iont (zelená), tyraminový iont C⁴D (modrá), EOF (černá). BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,2). Separační napětí 5kV, procházejí proud 8 μA, UV detekce při 210 nm.

Tab. 4.1– Experimentální hodnoty aktuální mobility (μ_i) testovaných iontů vypočítané dle vztahu (4). Vypočtené teoretické ($\mu_{\text{eff}(t),i}$) a naměřené hodnoty efektivní elektroforetické mobility ($\mu_{\text{eff},i}$) jednotlivých iontů doplněné o intervaly spolehlivosti. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,2). Separační napětí 5kV, procházejí proud 8 μA, UV detekce při 210 nm.

iont	$\mu_i \cdot 10^{-3}$ [cm ² s ⁻¹ V ⁻¹]	$\mu_{\text{eff},i} \cdot 10^{-4}$ [cm ² s ⁻¹ V ⁻¹]	$\mu_{\text{eff}(t),i} \cdot 10^{-4}$ [cm ² s ⁻¹ V ⁻¹]
K ⁺	1,41±0,21	7,01±1,81	7,62
Na ⁺	1,21±0,16	4,99±1,33	5,19
Tyramin (C ⁴ D)	0,89±0,07	1,88±0,44	-
Tyramin (UV)	0,87±0,05	1,63±0,22	-
EOF	0,71±0,03	0	-

Z aktuální mobility iontů byla vypočítána efektivní mobilita analyzovaných iontů podle vzorce (5). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.1 společně s hodnotami teoretických mobilit draselného a sodného iontu vypočítaných z limitních iontových vodivostí dle vztahu (6). Pro tyraminový iont nebylo možné vypočítat teoretickou mobilitu z důvodu neznalosti limitní iontové vodivosti.

Porovnáním vypočítaných a naměřených hodnot efektivních mobilit analyzovaných iontů (tab. 4.1) je patrná dobrá shoda mezi oběma skupinami těchto hodnot. Efektivní mobility tyraminu stanovené měřením s oběma detektory jsou v mezích intervalu spolehlivosti stejné.

Dalším sledovaným parametrem je separační účinnost. Z odečtených hodnot migračních časů a šířek píku v poloviční výšce při různých separačních napětích byly vypočítány počty teoretických pater podle vzorce (7) a v hodnotách vztažených na 1 m kapiláry jsou uvedeny v tabulce 4.2 pro jednotlivé testované ionty. Pro draselný iont byla vypočítána hodnota teoretického počtu pater i podle vzorce (8), výsledky jsou v tabulce 4.3.

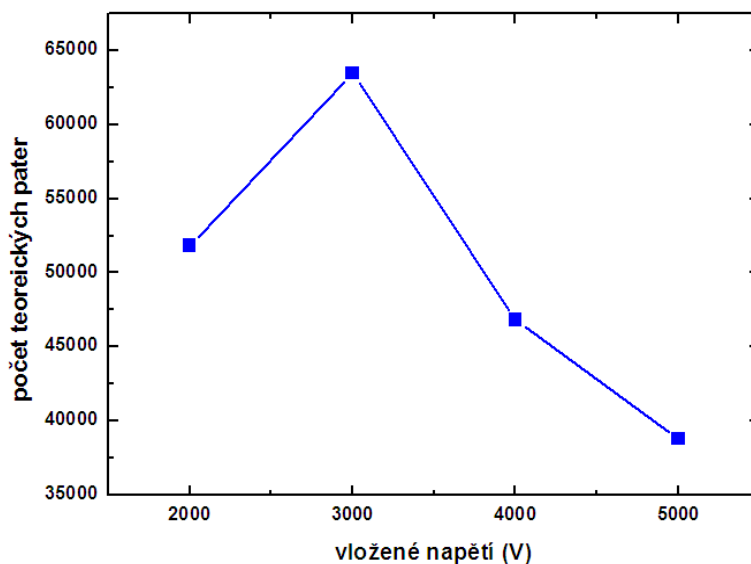
Tab. 4.2 - Experimentálně zjištěné počty teoretických pater (vztažené na 1 m kapiláry) pro jednotlivé ionty v závislosti na vloženém napětí. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,2). Separací napětí 5kV, procházejí proud 8 μA, UV detekce při 210 nm.

U [V]	$N_{K^+} \cdot 10^4$	$N_{Na^+} \cdot 10^4$	$N_{\text{tyramin}} (C^4D) \cdot 10^4$	$N_{\text{tyramin}} (UV) \cdot 10^4$
5000	6,079±0,001	4,410±0,001	3,622±0,003	1,890±0,003
4000	6,281±0,001	4,969±0,001	3,072±0,007	1,989±0,012
3000	6,344±0,003	4,453±0,011	2,129±0,075	1,666±0,157
2000	5,182±0,034	3,234±0,018	2,098±0,459	2,225±1,070

Tab. 4.3 - Porovnání separační účinnosti experimentálně zjištěné a teoretické pro draselný iont vztažené na 1 m kapiláry doplněné o intervaly spolehlivosti. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,2). Měřeno při napětí 5kV, procházejí proud 8 μA, UV detekce při 210 nm.

U [V]	$N_{\text{vypočtená}} \cdot 10^4$	$N_{\text{teoretická}} \cdot 10^7$
5000	6,079±0,001	1,682
4000	6,281±0,001	1,334
3000	6,344±0,003	1,012
2000	5,182±0,034	0,692

Z vypočtených hodnot uvedených v tabulce 4.3 byl sestrojen graf závislosti počtu teoretických pater na vloženém napětí pro draselný kationt (obr. 4.3). Z grafu je patrné, že hodnota separační účinnosti v souladu s rovnicí (8) s rostoucím vloženým napětím rostla až do hodnoty 3000 V. Po dosažení této hodnoty proudu začala separační účinnost klesat nejspíše vlivem vznikajícího Joulova tepla. Pokles však nebyl příliš markantní, proto byla rychlost separace nadřazena separační účinnosti a všechny další separace se prováděly při napětí 5000 V.



Obr. 4.3 - Závislost počtu teoretických pater (vztažené na 1 m kapiláry) na vloženém napětí pro draselný iont. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,2). Měřeno při napětí 2 – 5 kV, procházejí proud 5 - 8 μA, UV detekce při 210 nm.

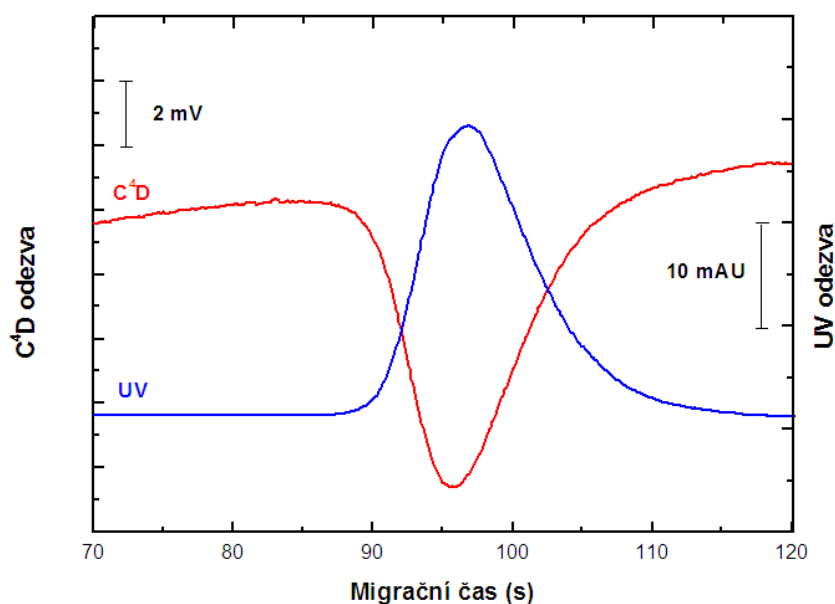
Z tabulky 4.3 je patrné, že teoretická hodnota separační účinnosti je řádově větší, než byla dosažena při měření reálných vzorků. Snížení reálné hodnoty separační účinnosti může být způsobeno neidealitami systému především vznikajícím Joulovým teplem.

Separací účinnost z obou odezev duálního detektoru byla zjišťována i pomocí další organické látky poskytující odezvu na obou typech detektorů, histidinem. Histidin byl dávkován v rozdílných maticích, podle čehož také poskytoval odezvy. Nejvýhodnější se ukázaly roztoky ve vodě. Roztoky histidinu rozpuštěného v pufru neposkytovaly vysoké odezvy na detektoru, i separační účinnost byla nižší. Nejhorší výsledky byly dosaženy u roztoku pufru obsahujícího histidin o koncentraci $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$, kde odezva byla minimální a proto nebyly elektroferogramy použity k dalšímu zpracování.

Separací účinnost byla počítána podle vzorců (7) a (8), odečítáno bylo z výsledných elektroferogramů uvedených na obrázku 4.4. Vypočtené separační účinnosti pro jednotlivé roztoky histidinu ve vodě nebo v pufru jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tab. 4.4 – Experimentální počty teoretických pater určené z odezev obou detektorů vztažené na 1 m kapiláry pro jednotlivé koncentrace histidinu dávkovaného v různých maticích doplněné o intervaly spolehlivosti. BGE: 50 mmol l^{-1} TRIS + 20 mmol l^{-1} HAc (pH = 4,5). Měřeno při napětí 5 kV, procházející proud $14 \text{ }\mu\text{A}$, UV detekce při 212 nm.

Detektor	$0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ v H_2O	1 mmol l^{-1} v H_2O	1 mmol l^{-1} v BGE
UV	7962±328	7507±325	5177±432
C ⁴ D	8049±946	8152±438	5749±455



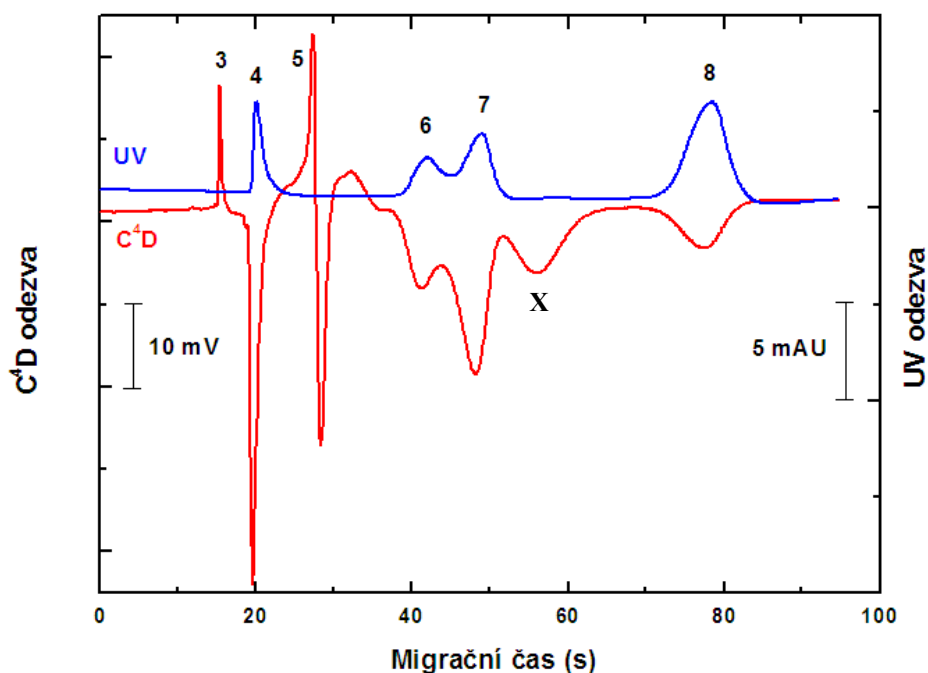
Obr. 4.4 – Elektroferogram vzorku histidinu pro oba typy detektorů. BGE: 50 mmol l⁻¹ TRIS + 20 mmol l⁻¹ HAc (pH = 4,5). Měřeno při napětí 5 kV, procházející proud 14 μA, UV detekce při 212 nm.

Separční účinnosti vypočítané z odezev vodivostního detektoru jsou ve všech případech u vzorků histidinu vyšší než účinnost vypočítaná z odezev UV detektoru. Vysvětlení může být v nedokonalé fokusaci světelného záření vycházejícího ze zdroje světla. Optická detekční cela je tak větší než vodivostní cela, jejíž velikost je přesně definována elektrodami. Světlo tedy může mít větší rozptyl, a proto jsou změřené šířky píků větší než u vodivostní detekce.

Z výsledků měření byla dokázána použitelnost systému pro separace v krátké kapiláře v kombinaci s duálním C⁴D/UV detektorem. Duální detektor ukázal schopnost detekce malých anorganických iontů, stejně jako organických iontů současně v jednom analyzovaném vzorku.

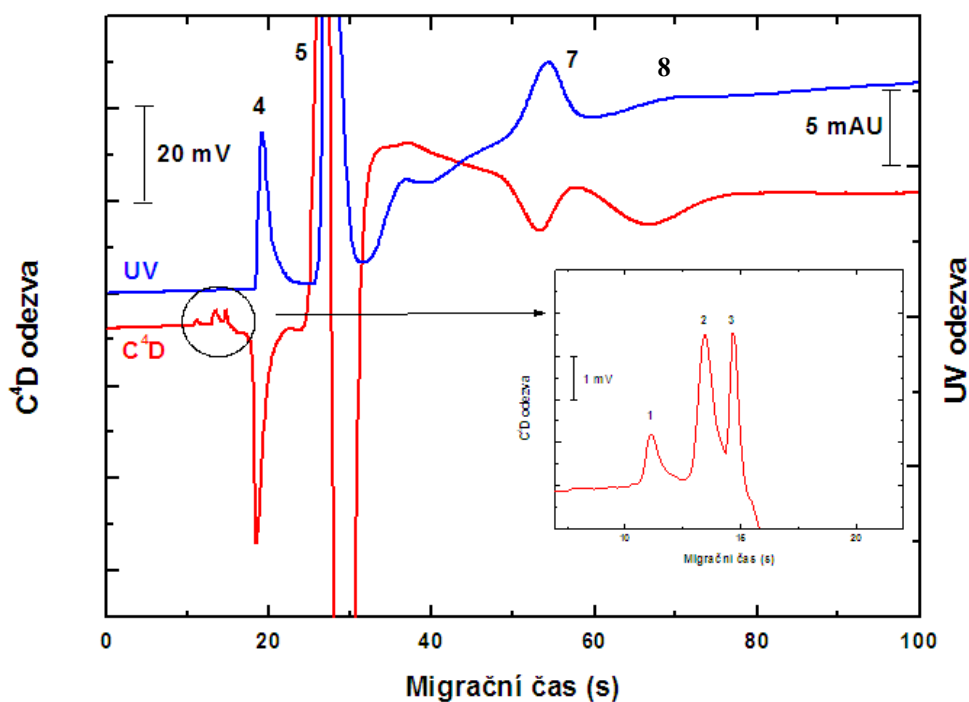
4.2 Separace vitaminů skupiny B

Výsledné elektroferogramy B-komplexu a modelového vzorku připraveného ze zásobních roztoků jednotlivých vitaminů včetně identifikace vitaminů jsou uvedeny na obrázcích 4.5 a 4.6.



Obr. 4.5 - Elektroferogram modelové směsi vzorku vitaminů. Identifikace píků: vápenatý iont (3), thiamin (4), kyselina pantothenová (5), riboflavin (6), pyridoxin (7) a niacin (8). Pod symbolem X jsou pravděpodobně chloridové ionty. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,14). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 4 μA, UV detekce při 216 nm.

Jednotlivé píky na obrázku 4.5 byly identifikovány jako: vápenatý iont (3), thiamin (4), kyselina pantothenová (5), riboflavin (6), pyridoxin (7) a niacin (8). Pod symbolem X by se mohly vyskytovat chloridové ionty doprovázející thiamin (thiamin se nejčastěji vyskytuje ve formě thiamin hydrochloridu). Neoznačený negativní pík detegovaný C⁴D za kyselinou pantothenovou (pík 5) odpovídá pohybu neutrálních molekul, v našem případě molekulám vody použitých k rozpuštění jednotlivých vitaminů, tzv. water gap. Vápenaté ionty se do roztoku dostaly společně s kyselinou pantothenovou, která se v B-komplexu vyskytuje ve formě vápenaté soli. Z elektroforegramu je patrné, že některé vitaminy poskytují odezvu na obou typech detektorů, mají tedy v molekule obsažený chromofor schopný absorbovat procházející UV záření.

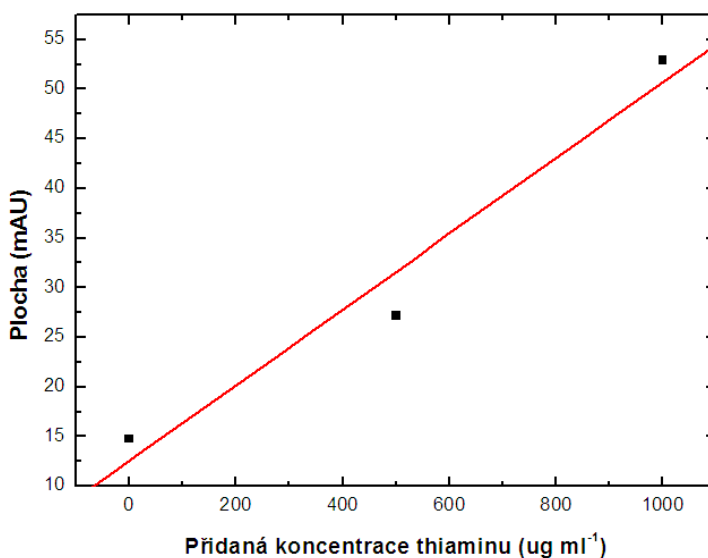


Obr. 4.6 - Elektroferogram roztoku připraveného z tablety B-komplexu. Identifikace píků: draselný iont (1), sodný iont (2), vápenatý iont (3), thiamin (4), kyselina pantothenová (5), pyridoxin (7) a niacin (8). BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,14). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 4 μA, UV detekce při 216 nm.

Jednotlivé píky vzorku tablety B-komplexu na obr. 4.6 byly identifikovány jako: draselný iont (1), sodný iont (2), vápenatý iont (3), thiamin (4), kyselina pantothenová (5), pyridoxin (7) a niacin (8). Další vitaminy obsažené v tabletách B-komplexu nebyly rozděleny nejspíše z důvodu interference či adsorpce některé z pomocných látek na stěnu kapiláry. Sodné a draselné ionty se do roztoku dostaly nejspíše jako doprovodné látky v tabletě, vápenatý iont se do roztoku dostal jako součást kyseliny pantothenové. Negativní pík na vodivostní části detektoru za píkem kyseliny pantothenové (5) odpovídá zóně nenabitých molekul, v našem případě rovněž zóně molekul vody použité k rozpuštění tablety B-komplexu. Pozitivní UV odezva (u píku 5) odpovídá zóně acetonitrilu, který byl použit při rozpouštění tablety. V důsledku složité matrice tablety B-komplexu, viz jeho složení uvedené v experimentální části, kap. 3.3.2, byla řada píků deformována natolik, že je nebylo možno kvantitativně vyhodnotit. K jejich stanovení by bylo zřejmě nutno použít složitější předúpravu vzorku. Pouze

thiamin (pík 4) byl díky svým dobře odečitatelným píkům na obou typech detektorů použit k dalšímu stanovení; použita byla metoda standardního přidavku.

Deklarovaná koncentrace thiaminu v jedné tabletě B-komplexu je podle výrobce 15 mg/tab. S touto hodnotou také byly srovnávány výsledky dosažené metodou standardního přidavku pomocí T-testu. Ilustrační graf závislosti plochy píku thiaminu na přidané koncentraci thiaminu pro UV detektor, včetně regresní přímky, sloužící k vypočtení thiaminu ve vzorku B-komplexu je ukázán na obr. 4.7. Stejný graf byl zkonstruován i pro vodivostní část detektoru.



Obr. 4.7 - Ilustrační graf závislosti plochy píku na přidané koncentraci thiaminu pro UV část detektoru. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,14). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 4 - 5 μA, UV detekce při 216 nm.

Koncentrace thiaminu ($c(\text{TH})$ v [mg/tab]) byly počítány z rovnice (16), která po dosazení zjištěných regresních parametrů kalibrační přímky a zředovacího faktoru měla tvar (21) a (22):

a) pro odezvu UV detektoru

$$c(\text{TH})[\text{mg/tab}] = 5 \cdot \frac{11,658}{39} \quad (21)$$

b) pro odezvu z vodivostního detektoru

$$c(\text{TH})[\text{mg/tab}] = 5 \cdot \frac{39,602}{146} \quad (22)$$

Číselná hodnota 5 zohledňuje ředění vzorku.

Výsledné koncentrace thiaminu včetně intervalů spolehlivosti vypočtené metodou standardního přídávku pro oba typy detektorů jsou uvedeny v tabulce 4.5. Výsledné hodnoty koncentrace thiaminu v tabletě byly porovnány mezi sebou pomocí Lordova testu, který by měl odhalit, zda jsou dosažené výsledky odečtené z obou detektorů od sebe statisticky rozlišitelné či nikoliv, rov. (19), a s pravou hodnotou (15 mg/tab) metodou T-testu, rov. (20). Výsledky Lordova i T-testu včetně kritických hodnot jsou uvedeny v tabulkách 4.6.

Tab. 4.5 - Výsledné koncentrace thiaminu ve vzorku B-komplexu (v mg ml⁻¹) doplněné o intervaly spolehlivosti pro oba typy detektorů. BGE: 20 mmol l⁻¹ H₃BO₃ + 10 mmol l⁻¹ LiOH (pH = 9,14). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 4 - 5 μA, UV detekce při 216 nm.

Detektor	Koncentrace thiaminu (mg ml ⁻¹)
UV	15,1±2,2
C ⁴ D	13,8±1,2

Tab. 4.6 – Vypočtené hodnoty T-testu a Lordova testu pro oba typy detektorů včetně kritické hodnoty pro 5 opakovaných měření. Hodnoty vychází z tabulky 4.5.

Detektor	T-test, u_0	T-test $u_0(\text{krit.},5)$	Lordův test, u	Lordův test $u(\text{krit.},5)$
UV	0,025			
C ⁴ D	0,454	0,507	0,199	0,306

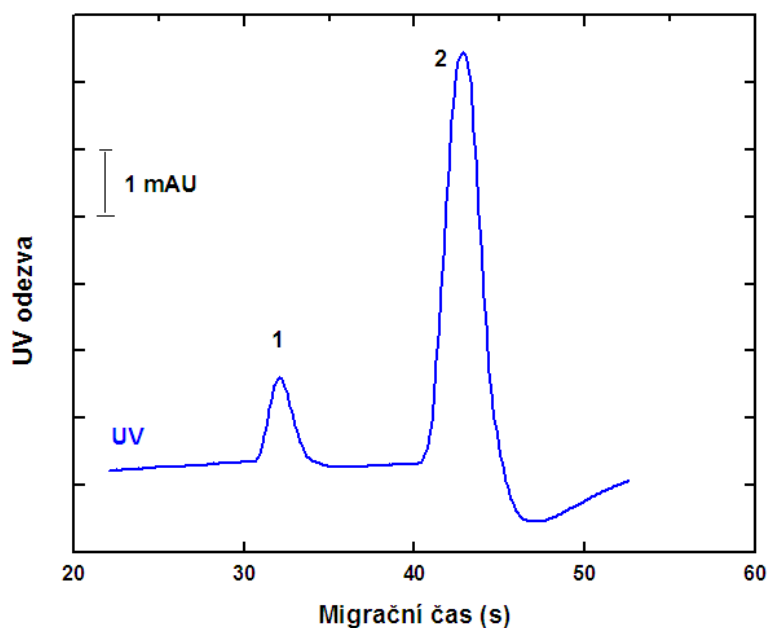
Z tabulky 4.5 je patrné, že výsledná koncentrace vypočtená z odezvy UV detektoru se více přiblížila deklarované koncentraci výrobce lékové formy B-komplexu (15 mg/tab), přestože přesnější podle intervalu spolehlivosti je koncentrace vypočtená

z odezvy vodivostní části detektoru. Lordův test ukázal, že výsledné koncentrace získané z odezvy obou detektorů jsou statisticky nerozlišitelné. T-test ukázal, že přes určité odchýlení výsledné koncentrace určené z odezvy vodivostního detektoru od deklarované hodnoty výrobcem, poskytují obě detekční metody statisticky shodné výsledky.

4.3 MEKC separace a stanovení kofeinu v tabletě Acylcoffinu

4.3.1 Rychlost pohybu micel a elektroosmotického toku

Pohyb micel a EOF byl měřen při vloženém napětí 5 a 6 kV z vnějšího zdroje. Z výsledných elektroferogramů (ilustrační elektroferogram je na obr. 4.8) byly odečítány hodnoty migračního času. Výsledné hodnoty migračního času markerů i analytu včetně intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 4.7.



Obr. 4.8 – MEKC elektroferogram pro určení rychlosti pohybu micel a EOF. Identifikace píků: thiomocovina (1), kofein (2). BGE: 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 39 μA, UV detekce při 216 nm.

Tab. 4.7 – Doby průchodu testovaných molekul kapilárou v sekundách doplněné o intervaly spolehlivosti v závislosti na vloženém napětí. BGE: 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 5 a 6 kV, procházející proud 31 - 39 μA, UV detekce při 216 nm.

U [V]	Kofein [s]	Sudan III [s]	Thiomočovina [s]	Methanol [s]
5000	76,2±3,7	103,2±8,5	49,1±1,6	51,1±2,6
6000	41,1±1,2	83,9±1,3	31,3±1,1	33,2±5,1

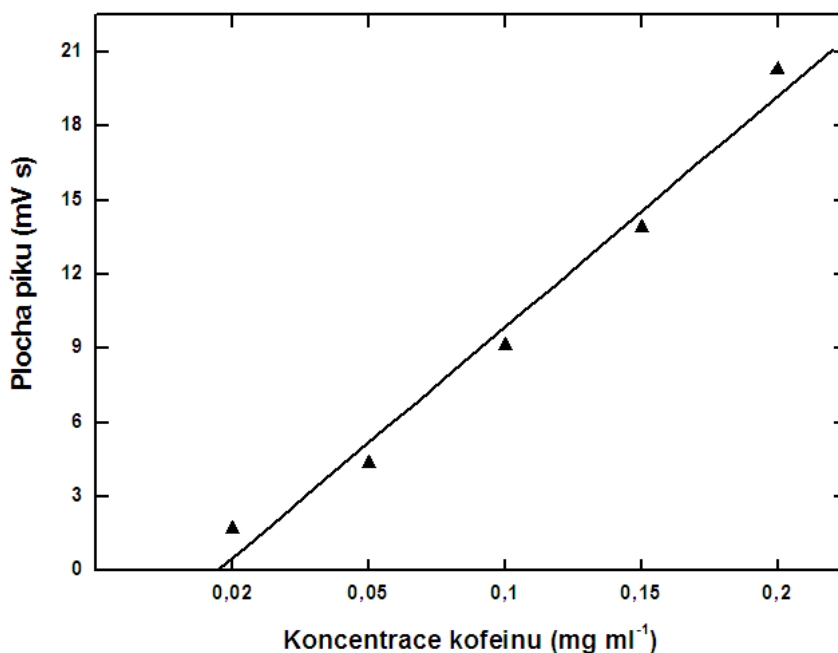
Tabulka 4.7 ukazuje vhodnost thiomočoviny a methanolu jako markerů pohybu EOF, protože jejich migrační časy se od sebe příliš nelišily. Rozdílné výsledky v pohyblivostech kofeinu a Sudanu III jsou způsobeny rozdílnou velikostí molekul a rozdílnou afinitou látky k micelám. Rychlost pohybu molekul jednotlivých látek kapilárou je dána podílem délky kapiláry k detektoru (zde 8 cm) a příslušné doby průchodu.

4.3.2 Stanovení obsahu kofeinu

Stanovení koncentrace kofeinu v lékové formě Acylcoffinu bylo založeno na metodě kalibrační přímky a metodě vnitřního standardu. Thiomočovina byla v koncentraci 0,01 mg/l přidávána do všech kalibračních roztoků i do roztoku vzorku. Byla využita jednak jako indikátor EOF a jednak jako vnitřní standard. Elektroferogram vzorku s thiomočovinou se nelišil od elektroferogramu umělé směsi na obr. 4.8.

Metoda kalibrační přímky

Metodou kalibrační přímky byly nejprve proměřeny kalibrační roztoky, z jejich elektroferogramů byly odečteny plochy a výšky píků, ze kterých byly následně sestrojeny grafy závislostí plochy nebo výšky píku kofeinu na koncentraci kofeinu (viz obr. 4.9). Kalibrační závislost byla lineární, parametry rovnic regresních přímek pro oba odečítané parametry jsou uvedeny v tabulce 4.8.



Obr. 4.9 – Graf závislosti plochy píku na koncentraci kalibračního roztoku kofeinu. BGE: 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 37 – 41 μA, UV detekce při 216 nm.

Tab. 4.8 - Parametry lineární kalibrační závislosti při kalibraci metodou kalibrační přímky. Koncentrace kofeinu $c(K)$ v intervalu 0,02 až 2 mg ml⁻¹. V závorkách jsou hodnoty směrodatných odchylek. BGE: 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 37 – 41 μA, UV detekce při 216 nm. Limit detekce (LOD) byl určen ze vztahu $LOD = 3sd/k$.

Parametr	Z plochy píku	Z výšky píku
Rozsah koncentrací, [mg ml ⁻¹]	0,02 – 0,2	0,02 – 0,2
Úsek (q), [mV s]	-0,724 (0,095)	-0,502 (0,067)
Směrnice (k), [mV s]; [mg ml ⁻¹]	101,84 (1,087)	46,69 (0,265)
Korelační koeficient	0,996	0,995
Standardní chyba (sd), [mAU]	1,160	0,584
Počet kalibračních bodů	5	5
Limit detekce, [mg ml ⁻¹]	$3,42 \cdot 10^{-2}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$

S použitím parametrů kalibrační závislosti byly pro koncentraci kofeinu ($c(K)$) v tabletě Acylcoffinu určeny rovnice (23) a (24), číselný koeficient 500 v rovnicích je faktor zohledňující ředění vzorku:

a) pro stanovení z ploch píků analytu, $A(A)$ [mAU]

$$c(K)[\text{mg/tab}] = 500 \cdot \frac{A(A) + 0,724}{101,84} \quad (23)$$

b) pro stanovení z výšek píků analytu, $H(A)$ [mAU]

$$c(K)[\text{mg/tab}] = 500 \cdot \frac{H(A) + 0,502}{46,69} \quad (24)$$

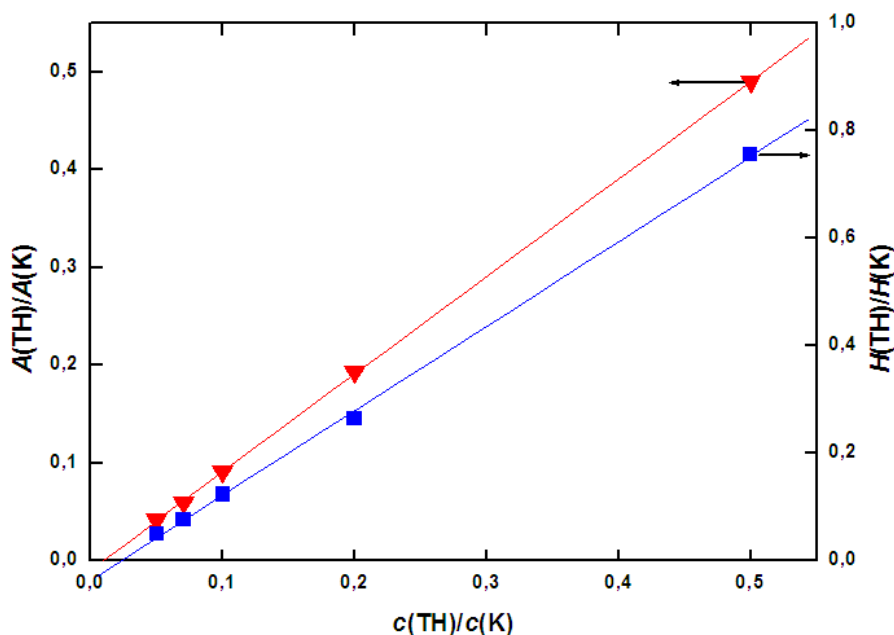
Za použití uvedených rovnic byly vypočteny koncentrace kofeinu z jednotlivých měření, z nich určeny střední hodnoty doplněné o intervaly spolehlivosti. Výsledky koncentrací kofeinu (v mg/tab) v lékové formě stanovené touto kalibrační metodou jsou uvedeny v tabulce 4.10.

Metoda vnitřního standardu

Z elektroferogramů změřených metodou kalibrační přímky byly odečteny nejen plochy a výšky píků kofeinu, ale i plochy a výšky píků thiomčoviny. Experimentální data byla zpracována dle rovnic (9) a (10) do grafu (obr. 4.10) pro určení koeficientu odezvy detektoru, F . Parametry příslušných regresních rovnic jsou v tabulce 4.9. Koncentrace kofeinu v tabletě byla vypočítána podle rovnice (25) a (26), které jsou odvozeny s použitím těchto parametrů. Číselná hodnota 500 je do rovnice přiřazena z důvodu zohlednění ředění vzorku. Koncentrace thiomčoviny je dosazena do rovnic (25) a (26) jako číselná hodnota 0,01.

Tab. 4.9 - Parametry regresních přímek pro určení koncentrace kofeinu metodou vnitřního standardu. V závorkách jsou hodnoty směrodatných odchylek. Koncentrace thiomochoviny $c(\text{TH}) = 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$, koncentrace kofeinu $c(\text{K})$ v intervalu 0,02 až 2 mg ml^{-1} . BGE: 40 mmol l^{-1} CHES + 15 mmol l^{-1} NaOH + 50 mmol l^{-1} SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 37 – 41 μA , UV detekce při 216 nm. Limit detekce (LOD) byl určen ze vztahu $\text{LOD} = 3sd/k$.

Parametr	Z plochy píku	Z výšky píku
Rozsah koncentrací, [mg ml^{-1}]	0,02 - 2	0,02 - 2
Úsek (q), [mAU]	-0,007 ($5,94 \cdot 10^{-4}$)	-0,033 (0,067)
Směrnice (k), [mAU; mg ml^{-1}]	0,994 (0,0022)	1,567 (0,027)
Korelační koeficient	0,999	0,999
Standardní chyba (sd), [mAU]	0,0014	0,0099
Počet kalibračních bodů	5	5
Limit detekce, [mg ml^{-1}]	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$1,89 \cdot 10^{-2}$



Obr. 4.10 - Závislost $A(\text{TH})/A(\text{K})$ a $H(\text{TH})/H(\text{K})$ na $c(\text{TH})/c(\text{K})$ dle rovnice (9) a (10) pro určení koeficientu F . Koncentrace thiomochoviny $c(\text{TH}) = 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$, koncentrace kofeinu $c(\text{K})$ v intervalu 0,02 až 2 mg ml^{-1} . BGE: 40 mmol l^{-1} CHES + 15 mmol l^{-1} NaOH + 50 mmol l^{-1} SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 37 – 41 μA , UV detekce při 216 nm.

a) pro stanovení z ploch píků

$$c(K)[\text{mg/tab}] = \frac{0,994 \cdot 500 \cdot 0,01}{\frac{A(\text{TH})}{A(K)} - 0,007} \quad (24)$$

kde: $c(K)$ - hledaná koncentrace kofeinu v jedné tabletě vzorku [mg/tab], $A(\text{TH})$ - plocha píku thiomocoviny [mAU] a $A(K)$ - plocha píku kofeinu [mAU].

b) pro stanovení z výšek píků

$$c(K)[\text{mg/tab}] = \frac{1,567 \cdot 500 \cdot 0,01}{\frac{H(\text{TH})}{H(K)} - 0,033} \quad (25)$$

kde: $H(\text{TH})$ - výška píku thiomocoviny [mAU], $H(K)$ - výška píku kofeinu [mAU].

4.3.3 Výsledky stanovení kofeinu a jejich hodnocení

Výsledky stanovení koncentrace kofeinu $c(K)$ v tabletě Acylcoffinu v mg/tab oběma kalibračními metodami jsou v tabulce 4.10.

Tab. 4.10 – Výsledné koncentrace (v mg/tab) kofeinu v tabletě Acylcoffinu doplněné o intervaly spolehlivosti rozdělené do skupin podle použité kalibrační metody a odečítaného experimentálního parametru. BGE: 40 mmol l⁻¹ CHES + 15 mmol l⁻¹ NaOH + 50 mmol l⁻¹ SDS (pH = 9,3). Měřeno při napětí 6 kV, procházející proud 37 – 41 μA, UV detekce při 216 nm.

Kalibrační metoda	$c(K)$, z ploch píků [mg/tab]	$c(K)$, z výšek píků [mg/tab]
Kalibrační přímka	49,0±1,9	46,2±1,6
Vnitřní standard	49,6±2,7	48,2±1.1

Výrobce lékové formy Acylcoffin deklaruje množství kofeinu 50 mg na 1 tabletu. Této koncentraci se více přiblížily výsledky vypočtené z ploch píků odečtených z jednotlivých elektroferogramů nezávisle na použité metodě kalibrace.

Výsledné koncentrace kofeinu zjištěné oběma kalibračními metodami byly statisticky srovnány mezi sebou i s pravou (deklarovanou) hodnotou koncentrace kofeinu za použití Lordova testu, rovnice (19), a T-testu, rovnice (20). Výsledné hodnoty T-testu, u_0 , včetně kritických hodnot pro příslušný počet měření jsou v tabulce 4.11.

Tab. 4.11 – Vypočtené hodnoty T-testu pro obě kalibrační metody a oba odečítané experimentální parametry včetně kritické hodnoty pro příslušný počet měření. Hodnoty vychází z tabulky 4.10.

Kalibrační metoda	u_0 - plochy píků	u_0 - výšky píků	$u_0(krit,9)$
Kalibrační přímka	0,139	0,609	0,255
Vnitřní standard	0,007	0,468	

T-test (tabulka 4.11) ukazuje, že statisticky nerozlišitelné výsledné hodnoty koncentrace od deklarované koncentrace byly vypočítány při použití obou kalibračních metod z ploch píků, $u_0 < u_0(krit)$. Koncentrace určené z výšek píků jsou při použití obou kalibračních metod podle T-testu statisticky odlišné od deklarované hodnoty koncentrace, $u_0 > u_0(krit)$, a proto ke stanovení koncentrace kofeinu ve vzorku není v použitém uspořádání metoda kalibrační přímky vhodná.

Výsledky koncentrací zjištěných oběma kalibračními metodami při použití ploch píků jako analytického signálu byly testovány Lordovým testem, kdy vypočítaná hodnota $u = 0,034$ je menší než hodnota kritická, $u(krit,9) = 0,17$. Z toho plyne, že obě kalibrační metody poskytují statisticky shodné výsledky.

5 ZÁVĚR

Cíle vytyčené v úvodu diplomové práce byly dva. Prvním cílem bylo testování vhodnosti nově sestrojeného přístroje s duálním detektorem k detegování malých anorganických a organických molekul, měření jejich mobilit a porovnání s teoretickými hodnotami vypočtenými z tabelovaných hodnot. Druhým cílem bylo využití přístroje a duálního detektoru k měření analytů ve složité matrici tvořené v obou případech lékovou formou od společnosti Zentiva, a.s.

První cíl byl splněn a při porovnání vypočtených mobilit testovaných iontů s teoretickými hodnotami je patrná shoda mezi oběma hodnotami. Duální detektor se ukázal jako vhodný pro měření malých anorganických iontů (měřených na vodivostní části) a organických molekul (optická část). U použité organické molekuly (tyramin) nebylo možné porovnat vypočtenou mobilitu s teoretickou z důvodu chybějících tabelovaných hodnot. Separační účinnost přístroje byla testována pomocí histidinu v různých matricích..

Druhým cílem bylo stanovení kofeinu a vitaminů skupiny B ve složitých matricích. Vitaminy skupiny B byly stanovovány v lékovém preparátu B-komplex. U roztoku připraveného rozpuštěním tablet se ukázala jako problém absorpce některé pomocné látky na stěnu kapiláry, díky čemuž bylo možné detegovat pouze některé z vitaminů obsažených v tabletě. Tento problém by se dal vyřešit případnou předúpravou tablety. Nejlépe vyhodnotitelné píky poskytovat vitamin thiamin, který byl následně použit k dalšímu stanovení. Koncentrace thiaminu v tabletě se stanovila metodou standardního přídatku a výsledná koncentrace vypočtená z odezev obou detektorů byla porovnána s deklarovanou koncentrací od výrobce. Jako bližší deklarované hodnotě (15 mg/tab) se ukázaly hodnoty z odezev UV části duálního detektoru ($15,1 \pm 2,2$ mg/tab), nicméně i hodnoty z odezev vodivostní části ($13,8 \pm 1,2$ mg/tab) se v rozsahu intervalu spolehlivosti dostaly na úroveň deklarované koncentrace.

Kofein byl stanoven micelární elektrokinetickou chromatografií z důvodu neschopnosti molekuly kofeinu vytvořit si v měřícím pufru náboj. Vypočtená hodnota koncentrace (byly použity dvě kalibrační metody kalibrační přímky a vnitřního standardu a odečítány dva parametry z elektroferogramů) kofeinu v lékové formě byla porovnána s deklarovanou hodnotou od výrobce. K malému odchýlení od deklarované

hodnoty došlo u koncentrace kofeinu vypočtené z výšek píků ($46,2 \pm 1,6$ a $48,2 \pm 1,1$ mg/tab), při odečítání ploch píků nastala shoda mezi vypočtenou ($49,0 \pm 1,9$ a $49,6 \pm 2,7$ mg/tab) a deklarovanou hodnotou koncentrace kofeinu v tabletě (50 mg/tab). Při porovnání kalibračních metod byla přesnější metoda vnitřního standardu při odečítání obou paramerů oproti metodě kalibrační přímky.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Opekar, F.; Coufal, P.; Štulík, K.: Rapid capillary zone electrophoresis along short separation pathways and its use in some hyphenated systems: a critical review. *Chem. Rev.* **109**, 4487-4499 (2009)
- [2] Opekar, F.: Aparatura pro elektroforetické separace v krátkých kapilárách. *Chem. Listy* **106**, 289-292 (2012)
- [3] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, *Chem. Listy* **91**, 320 – 329 (1997)
- [4] Pazourek, J.: *Moderní elektroforetické analytické metody*. Skripta: Elektroforetické analytické metody. (2003)
- [5] Altria, K. D.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography. A* **856**, 443 – 463 (1999)
- [6] Monnig, C. A.; Kennedy, R. T.: Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **66**, 280R-314R (1994)
- [7] Tiselius, A.: A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans. Faraday. Soc.* **33**, 524 (1937)
- [8] Jálová, V.: *Použití elektromigračních separačních technik při identifikaci mikroorganismů*, Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta (2006)
- [9] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* **53**, 1298-1302 (1981)
- [10] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Capillary zone electrophoresis, *Science* **222**, 266-272 (1983)
- [11] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal. Chem.* **57**, 834–841 (1985)
- [12] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* **56**, 111–113 (1984)
- [13] Coufal, P.: *Capillary Electro-separations*. Dostupné z URL <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html>> [cit. 14.3.2014]

- [14] Praus, P.; Plachá, D.: *Vybrané kapitoly z instrumentální analýzy*. Studijní opora, Ostrava, VŠB-TUO (2009)
- [15] Hopfenzit, P.: *Minerální látky*. 1. vyd. Praha, Euromedia Group – Ikar, ISBN 978-80-244-2171-1 (1999)
- [16] Panek, J.; Pokorný, J.; Dostálová, J.; Kohout, P.: *Základy výživy*. 1.vyd. Praha, Svoboda servis, ISBN 978-80-86320-23-6 (2002)
- [17] Hlúbik, P.; Opltová, L.: *Vitamíny*. 1.vyd. Praha, Jinočany: H&H, ISBN 80-247-0373-4 (2004)
- [18] Madžuková, J.: *Léčivá síla vitamínů, minerálů a dalších látek: praktický domácí rádce*. 1. vyd. Benešov, Start, ISBN 80-86231-36-4 (2005)
- [19] Fořt, P.: *Zdraví a potravní doplňky: encyklopedie potravních doplňků pro racionální výživu a péči o zdraví*. Vyd. 1. Praha, Euromedia Group – Ikar, ISBN 80-249-0612-0 (2005)
- [20] Mindell, E.; Mundisová, H.. *Nová vitaminová bible*. 2. vyd. Praha, Ikar, ISBN 80-249-0744-5 (2006)
- [21] Hoza, I.; Krmářová, D.; Budínský, P.: *Potravinářská biochemie II*. 1.vyd. Zlín: UTB, ISBN 80-7318-395-1 (2006)
- [22] El-Arab, A. E.; Ali, M.; Hussain, L.: Vitamin B1 profile of the Egyptian core foods and adequacy of intake. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**, 81-97 (2004)
- [23] Jakobsen, J.: Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and riboflavin in food symplex by use of HPLC. *Food Chemistry* **106**, 1209-1217 (2008)
- [24] Sikorska, E.; Gliszczynska-Swiglo, A.; Insinska-Rak, M.; Khmelinskii, I.; De Keukeleire, D.; Sikorski, M.: Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. *Analytical Chimica Acta* **613**, 207-217 (2008)
- [25] Russell, L. F.; Brooks, L.; McRae, K. B.: Development of robotic-HPLC determination of riboflavin vitamers in food. *Food Chemistry* **63**, 125-131 (1998)

- [26] Andrés-Lacueva, C.; Matrici, F.; Tonon, D.: Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector. *Journal of Chromatography A* **823**, 355-363 (1998)
- [27] Ndaw, S.; Bergaentzlé, M.; Aoudé-Werner, D.; Hasselmann, C.: Enzymatic extraction procedur efor the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry* **78**, 129-134 (2002)
- [28] Windahl, K. L.; Trenerry, V. C.; Ward, C. M.: The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction. *Food Chemistry* **65**, 263-270 (1998)
- [29] Rose-Sallin, Ch.; Blake, Ch.J.; Genoud, D.; Tagliaferri, E.G.: Comparasion of microbiological and HPLC – fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chemistry* **73**, 473-480 (2001)
- [30] Gonthier, A.; Fayol, V.; Viollet, J.; Hartmann, D. J.: Determination of pantothenic acid in foods: influence of extraction method. *Food Chemistry* **63**, 287-294 (1998)
- [31] Kall, M. A.: Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry* **82**, 315-327 (2003)
- [32] Lebidzinska, A.; Marszall, M. L.; Kuta, J.; Szefer, P.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the qualification of vitamins B1 (thiamine), B6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B12 in animal and plant food. *Journal of Chromatography A* **1173**, 71-80 (2007)
- [33] Van der Berg, H.; Van Schaik, F.; Finglas, P. M.; de Froidmont-Görtz, I.: Third EU MAT intercomparasion on methods for determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food. *Food Chemistry* **57**, 101-108 (1996)
- [34] Blake, Ch. J.: Analytical procedures for water-soluble vitamins on foods and dietary supplements: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 63-76 (2007)
- [35] Hálková, J.; Rumíšková, M.; Riegrova, J.: *Analýza potravin*. 1.vyd. Újezd u Brna, Straka Ivan, ISBN 80-902-7753-5 (2000)
- [36] Davídek, J.; Velíšek, J.: *Analýza potravin*. 2.vyd. Praha: VŠCHT, ISBN 80-7080-163-8 (1992)

- [37] Fotsing, L.; Fillet, M.; Bechet, I.; Hubert, Ph.; Crommen, J.: Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **15**, 1113-1123 (1997)
- [38] Huopalahti, R.; Sunell, J.: Use of capillary zone electrophoresis in the determination of B vitamins in pharmaceutical products. *Journal of Chromatography* **636**, 133-135 (1993)
- [39] Boonkerd, S.; Detaevenier, M. R.; Michotte, Y.: Use of capillary electrophoresis for the determination of vitamins of the B group in pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography A* **670**, 209-214 (1994)
- [40] Castro-Puyana, M.; Garcia-Canas, V.; Simó, C.; Cifuentes, A.: Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis* **33**, 147-167 (2012)
- [41] Simionato, A. V. C.; Lancas, F. M.: Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography in pharmaceutical samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **29**, 349-363 (2006)
- [42] Gomis, D. B.; González, L. L.; Álvarez, D. G.: Micellar electrokinetic chromatography analysis of water-soluble vitamins. *Analytical Chimica Acta* **396**, 55-60 (1999)
- [43] Aurora-Prado, M. S.; Silva, C. A.; Tavarez, M. F. M.; Altria, K. D.: Rapid determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in commercial formulations by MEEKC. *Chromatographia* **72**, 687-694 (2010)
- [44] Wojciechowski, C.; Dupuy, N.; Ta, C. D.; Huvenne, J. P.; Legrand, P.: Quantitative analysis of water-soluble vitamins by ATR-FTIR spectroscopy. *Food Chemistry* **63**, 133-140 (1998)
- [45] Gentili, A.; Caretti, F.; D'Ascenzo, G.; Marchese, S.; Perret, D.; Di Corcia, D.; Rocca, L. M.: Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2029-2043 (2008)
- [46] Antal, I. P.; Bazel, Y. R.; Kormosh, Z. A.: Electrochemical methods for determining group B vitamins – review. *Journal of Analytical Chemistry* **68**, 565-576 (2013)

- [47] Klosterman, L.: *The Facts about Caffeine*. New York, Marshall Cavendish, ISBN 978-0-7614-2242-6 (2006)
- [48] Velišek, J.; Hajšlová, J.: *Chemie potravin II*. 3.vyd. Tábor, OSSIS, ISBN 978-80-86659-16-9 (2009)
- [49] Heckman, M. A.; Weil, J.; De Mejia, E. G.: Caffeine (1,3,7-trimethylxantine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety and regulatory matters. *Journal of Food Science* **75**, R77-R87 (2010)
- [50] Lullmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha, Grada Publishing a.s., ISBN 80-247-0836-1., Dostupne z URL: <<http://books.google.cz>> [cit. 17.3.2014] (2004)
- [51] Grundmann M.: *Lékové interakce s kofeinem*. Skripta pro předmět: Klinické farmakologie, Ústav klinické farmakologie FNŠP a Zdravotně sociální fakulty OU Ostrava (2001)
- [52] Holland, D. T.; Godfredsen, K. A.; Page T.; Connor J. D.: Simple high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of serum caffeine and paraxanthine following rapid sample preparation. *Journal of Chromatography B* **707**, 105-110 (1998)
- [53] Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y.: Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* **57**, 307-316 (2002)
- [54] Brunetto, M. R.; Gutiérrez, L.; Delgado, Y.; Gallignani, M.; Zambrano, A.; Gómet, A.; Ramos, G.; Romero, C.: Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry* **100**, 459-467 (2007)
- [55] Rostagno, M. A.; Manchón, N.; D'Arrigo, M.; Gullamón, E.; Villares, A.; García-Lafuente, A.; Ramos, A.; Martínez, J. A.: Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta* **685**, 204-211 (2011)

- [56] Schneider, H.; Ma, L.; Glatt, H.: Extractionless method for the determination of urinary caffeine metabolites using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography B* **789**, 227-237 (2003)
- [57] Zou, J.; Li, N.: Simple and environmental friendly procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of caffeine in beverages. *Journal of Chromatography A* **1136**, 106-110 (2006)
- [58] Maeso, N.; Castillo, C.; Cornejo, L.; García-Acicollar M.; Alguacil, L. F.; Barbas, C.: Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1095-1100 (2006)
- [59] Horie, H.; Mukai, T.; Kohat, K.: Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **758**, 332-335 (1997)
- [60] Zhao, Y.; Lunte C. E.: Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **668**, 265-274 (1997)
- [61] Hyötyläinen, T.; Sirén, H.; Riekkola, M. L.: Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *Journal of Chromatography A* **735**, 439-447 (1996)
- [62] Emre, D.; Özaltın, N.: Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B* **847**, 126-132 (2007)
- [63] Walker, J. C.; Zaugg, S. E.; Walker, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* **781**, 481-485 (1997)
- [64] Injac, R.; Srdjenovic, B.; Prijatelj, M.; Boskovic, M.; Karljikovic-Rajic, K.; Strukelj, B.: Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **46**, 137-143 (2008)

- [65] Paradkar, M. M.; Irudayaraj, J.: Rapid determination of caffeine in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry* **78**, 261-266 (2002)
- [66] Bouhsain, Z.; Garrigues, J. M.; Garrigues, S.; De la Guardia, M.: Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee. *Vibrational Spectroscopy* **21**, 143-150 (1999)
- [67] Najafi, N. M.; Hamid, A. S.; Afshin, R. K.: Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression. *Microchemical Journal* **75**, 151-158 (2003)
- [68] Belay, A.; Ture, K.; Redi, M.; Asfaw, A.: Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometr. *Food Chemistry* **108**, 310-315 (2008)
- [69] Aklilu, M.; Tessema, M.; Redi-Abshiro, M.: Indirect voltammetric determination of caffeine content in coffee using 1,4-benzoquinone modified carbon paste electrode. *Talanta* **76**, 742-746 (2008)
- [70] Hassan, S. S. M.; Saoudi, M. M.: A new liquid membrane electrode for selective determination of caffeine. *Qatar Univ. Sci. Bull.* **4**, 45-55 (1984)
- [71] El Deeb, S.; Abu Iriban, M.; Gust, R.: MEKC as a powerful growing analytical technique. *Electrophoresis* **32**, 166-183 (2011)
- [72] Terabe, S.: Capillary separation: Micellar electrokinetic chromatography. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2**, 99-120 (2009)
- [73] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* **56**, 111-113 (1984)
- [74] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal. Chem.* **57**, 834-841 (1985)
- [75] Shpak, A. V.; Pirogov, A. V.; Shpigun, O. A.: Micellar electrokinetic chromatography with polyelectrolyte complexes as micellar pseudo-stationary phases. *Journal of Chromatography B* **800**, 91-100 (2004)
- [76] Hancu, G.; Simon, B.; Rusu, A.; Mircia, E.; Gyeresi, A.: Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis, *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **3**, 1-8 (2013)
- [77] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Skripta. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum (2003)

- [78] Novotný, M.; Opekar, F.; Jelínek, I.: Kombinovaný detektor pro kapilární elektroforézu. *Chem. Listy* **99**, 132-136 (2005)
- [79] Opekar, F.; Štulík, K.: Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok – znovuzrození bezkontaktních impedančních metod. *Chem. Listy* **104**, 1148-1154 (2010)
- [80] Hohenester, U. M.; Ludwig, K.; Krieglstein, J.; König, S.: Stepchild phosphohistidine: acid-labile phosphorylation becomes accessible by functional proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3209-3212 (2010)
- [81] Lopéz-de-Alba, P. L.; Lopéz-Martínez, L. L.; Cerdá, V.; Amador-Hernández, J.: Simultaneous Determination and Classification of Riboflavin, Thiamine, Nicotinamide and Pyridoxine in Pharmaceutical Formulations, by UV-Visible Spectrophotometry and Multivariate Analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **17**, 715-722 (2006)
- [82] Pavelka, F.; Klímek, P.: *Aplikovaná statistika*. Skripta. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta managementu a ekonomiky ve Zlíně. ISBN 80-214-1545-2 (2000)
- [83] Otyepka, M.; Banáš, P.; Otyepková, E.: *Základy zpracovní dat*. Skripta. 1.vyd. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. ISBN 978-80-244-3636-4 (2007)