

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA V ANALÝZE
BIOFLAVONOIDŮ A FYTOFARMAK**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Vedoucí katedry:

Doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.
Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2008

Bc. Martina Novotná

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne.....

.....
podpis

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vypracování diplomové práce, zejména své školitelce Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc., za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování výsledků a celé práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Janu Honegrovi, který mi předal své zkušenosti s prací v laboratoři a který mi s vypracováním této práce také velice pomohl.

Abstrakt

V této práci byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí pro současné stanovení a separaci dvou bioflavonoidů hesperidinu a diosminu v léčivém přípravku Detralex potahované tablety. Analýza byla provedena v křemenné kapiláře o délce 67,2 cm (efektivní délka 60 cm) a vnitřním průměru 50 μm . UV detekce byla provedena při vlnové délce 207 nm. Byly zjištěny optimální separační podmínky a složení pracovního elektrolytu. Optimální složení pufru bylo 10 mM fosfát, 40 mM borát, 10% MeOH, 15 mM β -CD a pH* 8,00. Analýza probíhala za konstantní teploty 25 °C a napětí +20 kV. Jako vhodný vnitřní standard byl zvolen methylparaben. Kalibrační závislost byla lineární v rozmezí 0,025-0,4 mg/ml ($R=0,9973$) pro hesperidin a 0,05-0,8 mg/ml pro diosmin ($R=0,9987$). LOD byl 30,6 $\mu\text{g/ml}$ (hesperidin) a 421,0 $\mu\text{g/ml}$ (diosmin). LOQ byl 92,9 $\mu\text{g/ml}$ (hesperidin) a 127,6 $\mu\text{g/ml}$ (diosmin). Byla zjištěna opakovatelnost ploch píků a migračních časů ($n=6$). RSD (plocha píku) je 2,13 % (hesperidin) a 3,32% (diosmin); RSD (migrační čas) je u obou analytů 0,01%.

Abstract

A method based on capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection was developed for simultaneous separation and determination of bioflavonoids hesperidin and diosmin. The analysis was performed in a fused silica capillary with effective length 60 cm and 50 μm I.D. UV detection was used at 207 nm. The optimum separation conditions were found out in this work. Samples were loaded hydrodynamically at a pressure of 50 mbar for 20 s. The background electrolyte consisted of 10 mM phosphate, 40 mM borate buffer with 10% MeOH, 15 mM β -CD (pH* 8,0) at 25 °C. The separation voltage was +20 kV. Methylparaben was chosen as an internal standard. The calibration dependences were rectilinear in the range from 0,025 to 0,4 mg/ml for hesperidin ($R=0,9973$) and from 0,05 to 0,8 mg/ml for diosmin ($R=0,9987$). The single analysis took about 15 min. The method was suitable for determining the bioflavonoids in pharmaceutical preparation Detralex capsules with RSD values 2.4 % (diosmin) and 3.1 % (hesperidin), $n=6$. The recoveries were from 93,09 to 102,30 % as found by the standard addition technique.

1. ÚVOD

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny, které jsou v přírodě široce rozšířené. Jedná se o velice důležitou skupinu sekundárních metabolitů, které jsou syntetizovány rostlinou jako výsledek jejich adaptace na biotické a abiotické stresové podmínky (infekce, zranění, vodní stres, chladový stres, světlo)¹. Jsou klasifikovány podle jejich odlišné chemické struktury na flavonoly, flavony, flavanony, isoflavony, katechiny, anthokyanidiny a chalkony. Bylo identifikováno více než 6 500 flavonoidů, které se běžně vyskytují v ovoci, zelenině a nápojích². Jedná se tedy nejčastěji o deriváty s hydroxylovými či methoxylovými skupinami v polohách 5 a 7, nebo 3,5 a 7. V rostlinách jsou vázány jako ve vodě rozpustné glykosidy.

V posledních letech se staly předmětem zájmu mnoha vědců, a to díky jejich mnoha biologickým účinkům. Mohou sloužit jako silné antioxidanty, které mohou chránit lidské tělo před volnými radikály. Mnoho epidemiologických studií také ukázalo, že spotřeba rostlin bohatých na fenolické sloučeniny je spojena s nižším rizikem degenerativních onemocnění jako rakovina, kardiovaskulární nemoci a dysfunkce imunitního systému. Nelze také opomenout jejich antivirové, protizánětlivé či protialergické účinky¹.

Pro separaci a stanovení flavonoidů byly vyvinuty metody jako spektrofotometre, TLC a HPLC. HPLC je nejvíce rozšířená metoda jak pro kvalitativní, tak i pro kvalitativní analýzu fytochemických látek. Aktuálně je RP-HPLC/MS analytická technika běžně užívaná k analýze polyfenolických sloučenin jako jsou právě flavonoidy².

CE je mikroanalytická metoda, která je použitelná pro analýzu velkého množství sloučenin zahrnující přírodní produkty jako flavonoidy a metabolity. CE poskytuje výhody v rychlosti analýz, vysoké separační účinnosti, nízké ceně a jednoduchosti².

V diplomové práci jsme se rozhodli využít právě tuto metodu pro stanovení dvou bioflavonoidů hesperidinu a diosminu.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat metodu vhodnou pro separaci a stanovení bioflavonoidů hesperidinu a diosminu pomocí kapilární elektroforézy. Dále bylo mým cílem aplikovat tuto metodu na léčivý přípravek Detralex potahované tablety.

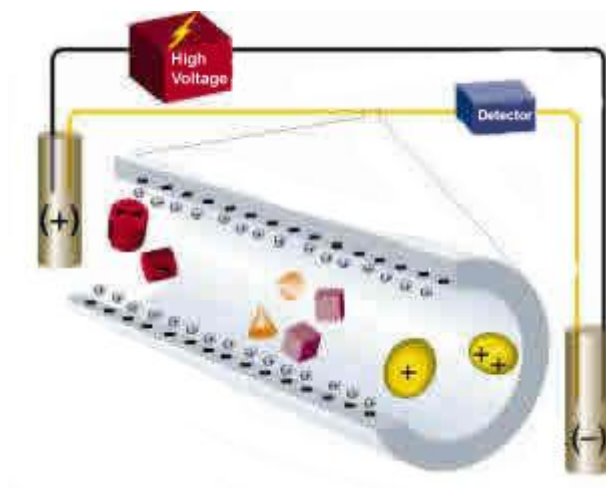
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

Základním separačním principem kapilárních elektromigračních separačních metod je rozdílná migrační rychlost elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Toto elektrické pole se vytváří vložením pozitivní (anoda) a negativní (katoda) elektrody do roztoku obsahujícího ionty. Po vložení napětí mezi tyto elektrody se ionty v roztoku s odlišným nábojem, tzn. anionty a kationty, začnou pohybovat směrem k opačně nabité elektrodě³, a to v závislosti na jejich náboji a velikosti. Brzdnou silou působící na pohyb částic je tření v kapalném prostředí, které je podmíněno jeho viskozitou.

Separace nejčastěji probíhá v kapilárách vyrobených z taveného křemene, a to díky jeho chemické a elektrické neutralitě, propustnosti UV záření, flexibilitě a nízké ceně⁴. Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí od 25 do 100 μm ID³.

Mezi výhody kapilární elektroforézy patří její vysoká efektivita, velmi nízká spotřeba vzorku, možnost automatizace a nízká spotřeba reagensů. Lze ji také využít ke kvantitativnímu stanovení⁵.



Obr. 1 Schéma základního elektroforetického systému⁵

Mezi kapilární elektromigrační separační metody řadíme tyto základní techniky, které se liší mechanismem separace:

- ◆ kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- ◆ izotachoforéza (ITP)
- ◆ micelární elektrokinetická chromatografie (MECK)
- ◆ kapilární elektrochromatografie (CEC)
- ◆ izoelektrická fokusace (IEF).

Separační principy jednotlivých variant jsou odlišné, a proto metody jako CZE, ITP a IEF lze využít pouze pro separaci iontů, kdežto metody typu MECK a CEC lze s výhodou využít i pro separaci nenabitých částic⁶. Tyto metody se široce uplatňují v chemických, farmaceutických i biologických analýzách^{7,8,9}. Dále se tyto metody mohou využít ke stanovení důležitých fyzikálně-chemických konstant, jakými jsou disociační konstanty, konstanty stability a nebo limitní pohyblivosti atd.

3.1.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

3.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Separace pomocí kapilární elektroforézy je závislá na rozdílném pohybu elektricky nabitých částic v roztoku prostřednictvím aplikovaného elektrického pole³. Migrační rychlost iontu lze vyjádřit jako:

$$v = u_e \cdot E$$

v – rychlost elektroforetického pohybu [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

u_e – elektroforetická pohyblivost [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]

E – intenzita elektrického pole [Vm^{-1}].

Elektroforetická pohyblivost je rychlost, jakou se částice v roztoku vlivem elektrického pole pohybuje⁶.

Každý ion je charakterizován svou absolutní pohyblivostí, která popisuje jeho pohyb v nekonečně zředěném roztoku. V reálném roztoku však dochází k ovlivnění pohybu iontu, a to jejich vzájemnými interakcemi. Skutečnou

pohyblivost nabité částice v reálném roztoku lze vyjádřit pomocí tzv. efektivní pohyblivosti u_{ef} , která vykazuje nižší hodnoty než pohyblivost absolutní. Můžeme ji ovlivnit složením vnějšího prostředí, tj. složením elektrolytů migračního prostředí⁶. Efektivní pohyblivost silných elektrolytů lze považovat za stálou, ale u slabých elektrolytů je tomu jinak. Jejich efektivní pohyblivost je závislá na stupni disociace α :

$$u_{ef} = u_e \alpha.$$

Elektroosmotický tok

Pohyb roztoku směrem k detektoru je vyvolán tzv. elektroosmotickým tokem (EOF). Je také znám pod pojmem elektroosmóza a vzniká díky náboji na vnitřní straně kapiláry⁵. Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které v závislosti na pH pracovního elektrolytu disociují. Touto disociací se pak na vnitřní straně kapiláry vytváří záporný náboj. Ke stěně je pak přitažena vrstva kovových iontů základního elektrolytu a tím vzniká stabilní elektrická dvojevrstva, tzv. Sternova vrstva. U většiny elektrolytů je EOF mnohonásobně vyšší než elektroforetické pohyblivosti iontů. Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit vztahem¹⁰:

$$u_{EOF} = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta r} \cdot \text{kde}$$

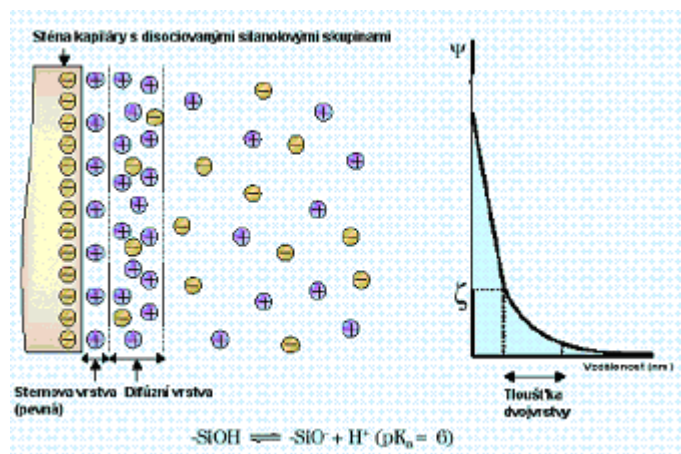
u_{EOF} - pohyblivost elektroosmotického toku

ε - permitivita základního elektrolytu

η - viskozita

ξ - zeta potenciál

r - poloměr kapilár .



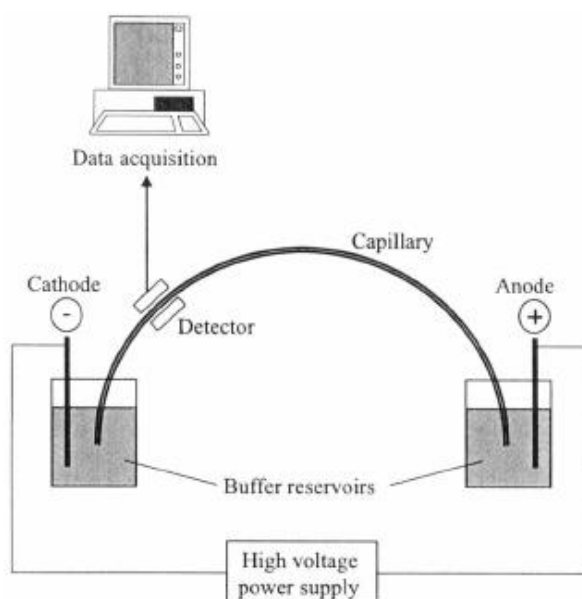
Obr. 2 Znárodnění elektrické dvojvrstvy dle Sterna a zeta potenciálu¹¹

Dle Sternova modelu se elektrická dvojvrstva skládá z úzké nepohyblivé Sternovy vrstvy a z pohyblivé difuzní vrstvy (Obr. 2). Na rozhraní těchto částí se vytváří tzv. elektrokinetický (zeta) potenciál ξ . Zeta potenciál je určován povrchovým nábojem kapilární stěny, který je silně závislý na pH⁵. Výsledkem je to, že velikost EOF je velmi závislá na pH a je vysoká při vysokých pH, kdy jsou silanolyví skupiny extrémně ionizované⁵. Velikost elektroosmotického toku je většinou mnohem vyšší než pohyblivost analytů. Výsledkem je to, že všechny analyty putují kapilárou směrem k detektoru, i když jsou přitahovány k elektrodě na opačném konci kapiláry.

I když je EOF výhodný, je ho třeba často regulovat. Při vysokých hodnotách pH je tok příliš velký, což má za následek krátký čas pro separaci analytů. Určité módy CE vyžadují jeho redukci či eliminaci. Elektroosmózu lze tedy ovlivnit úpravou složení použitého elektrolytu. Důležitými faktory jsou iontová síla a hodnota pH používaného pufru, které působí na disociační rovnováhy ionogenních látek v roztoku elektrolytu i skupin fixovaných na povrchu stěny kapiláry, čímž ovlivňují hustotu náboje v elektrické dvojvrstvě a tím následně i zeta potenciál¹². Při nízkých pH se EOF snižuje, při vysokých hodnotách naopak roste. Další možností jak EOF ovlivnit je teplota, která mění viskozitu, dále lze použít organický modifikátor, který mění zeta potenciál a viskozitu, nebo vhodný surfaktant. Ovlivnit ho lze také pomocí elektrického pole⁵.

3.1.1.2 Instrumentace

Instrumentace požadovaná pro CE je pozoruhodně jednoduchá jak ukazuje Obr.3. Konce kapiláry jsou umístěné v oddělených zásobnících pufrů, obsahujících elektrodu připojenou ke zdroji vysokého napětí. Vzorek je injikován do kapiláry dočasnou záměnou jednoho rezervoáru s pufrém za rezervoár se vzorkem a aplikací buď elektrického potenciálu a nebo tlaku. Poté je aplikován el. potenciál a uskuteční se samotná separace³.



Obr. 3 Schematické znázornění instrumentálního uspořádání při CE³

Kapiláry

Nejběžnějším používaným materiálem pro výrobu kapilár je tavený křemen, a to díky své chemické a elektrické neutralitě, propustnosti UV záření, flexibilitě a nízké ceně. Jelikož je kapilára z taveného křemene velmi křehká, bývá pokrývána vrstvou polyamidu⁵. Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí 10-100 μm , obvykle však 25-75 μm . Nejčastější vnější průměr je 350-400 μm . Běžná délka kapilár se pohybuje v rozmezí 50-75 cm.

Detekce^{13,14}

Pro detekci analytů v CE lze využít mnoho metod. Nejrozšířenější metodou je spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné (UV/VIS) oblasti. Takové

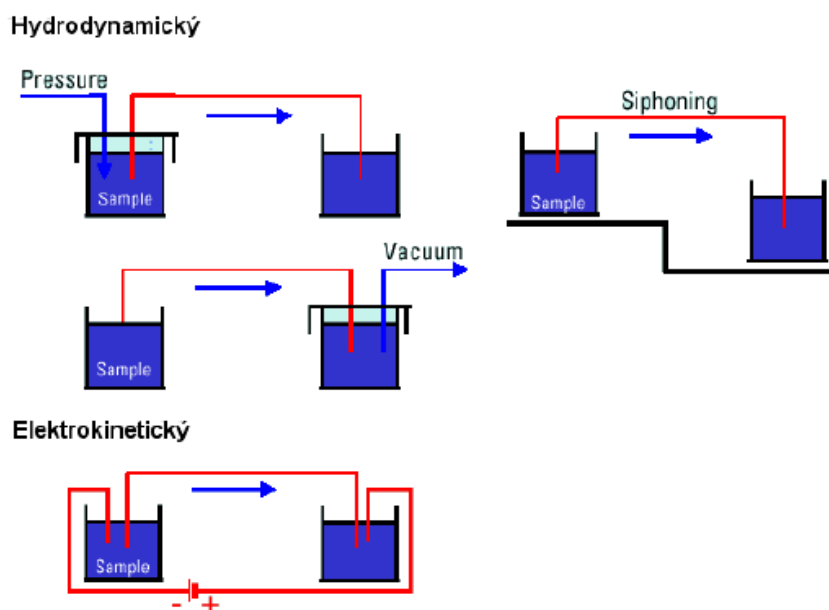
detektory zpravidla měří absorpenci při několika fixních či nastavitelných vlnových délkách, popř. lze využít detektor s diodovým polem (DAD), díky kterému lze získat absorpční spektrum roztoku. UV/VIS detekci lze úspěšně využít v módech přímé i nepřímé detekce. Další možností je využití fluorescenční detekce. Tato metoda je velice senzitivní. Dále lze využít měření elektrické vodivosti. Výhodou této detekce je její univerzálnost. V neposlední řadě je velmi citlivou metodou hmotnostní spektrometrie, LIF (laser induced fluorescence) či amperometrická detekce.

Zdroj napětí

Na elektrody se vkládá napětí z vysokonapěťového stejnosměrného zdroje. Kapilára má velký elektrický odpor a umožňuje účinný odvod tepla stěnou kapiláry, což dovoluje aplikovat napětí v řádech desítek kV. Používané zdroje napětí také umožňují měnit polaritu elektrod.

Dávkování vzorku

Dávkování vzorku se nejčastěji provádí dvěma způsoby, a to hydrodynamicky nebo elektrokineticky⁵, jak ukazuje Obr.4.



Obr.4 Způsoby dávkování vzorku v CZE¹¹

Hydrodynamické dávkování je obecně nevíce používaná technika. Není ovlivněno vodivostí pufru ani pohyblivostí analytu⁵. Provádí se několika způsoby:

- a) utěsněním prostoru nad dávkovacím koncem kapiláry a aplikací tlaku,
- b) rozdílnou výškou hladiny v nádobce se vzorkem, do které je ponořen vstupní konec kapiláry, a hladiny ve výstupní nádobce,
- c) aplikací vakua na výstupní konec kapiláry¹⁵.

Elektrokinetické dávkování je používané méně. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je přivedeno napětí. Nevýhodou je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením po dávkování, protože pohyblivějších částic migruje do kapiláry více než méně pohyblivých¹⁰.

3.1.1.3 Děje ovlivňující separaci^{5,15-19}

Disperze, která rozšiřuje zóny analytů a způsobuje tím rozšiřování a deformaci píků, vyplývá z rozdílů v rychlostech analytu uvnitř zóny. Je to důležitý faktor, který ovlivňuje citlivost a také účinnost kapilárních elektromigračních metod. Mezi nejdůležitější disperzní jevy řadíme:

- podélná molekulární difúze
- Jouleovo teplo
- adsorpce na stěnu kapiláry
- elektromigrační disperze.

Podélná molekulární difúze

Molekulární difúze rozpuštěných složek při postupu kapilárou je hlavní příčinou rozšiřování, tedy rozmývání, zón. Podélná molekulární difúze je přirozenou součástí CZE a nelze ji odstranit. Je způsobena koncentračním gradientem analytu v kapiláře. Projevuje se tím více, čím delší dobu působí. Obecně lze tedy říci, že velké částice (molekuly) mají nízké difúzní koeficienty a z tohoto důvodu vykazují nižší disperzi než je tomu u malých částic. Pro tyto látky je možné dosahovat počtu teoretických pater (N) v řádu milionů, pro menší molekuly pak v řádu set tisíc. Počet teoretických pater lze vypočítat podle vztahu:

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{eo})U}{2D} = \frac{\mu_l U}{2D}$$

kde D je difúzní koeficient složky.

Jouleovo teplo

Hlavní výhoda elektroforézy prováděné v úzkých kapilárách je redukce efektů zahřívání. Zahřívání je velice problematický jev, protože způsobuje nejednotné teplotní gradienty, lokální změny viskozity a následné rozmývání zón. Zatímco absolutní vzestup teploty nemá na separaci škodlivý vliv, teplotní gradienty ale ano. Odvádění tepla kapilární stěnou vede k tomu, že v centru kapiláry je teplota vyšší. Tyto teplotní gradienty způsobují rozdíly ve viskozitě pracovního elektrolytu a způsobují deformaci zón.

Teplotní rozdíly jsou závislé na vnitřním průměru kapiláry, na tloušťce jejích stěn a tloušťce polyimidového obalu. Nejúčinnějším způsobem jak redukovat efekt Jouleova tepla je použití kapilár s malým vnitřním a velkým vnějším průměrem.

Adsorpce na stěnu kapiláry

Kapilára představuje skvělé prostředí pro elektroforetickou separaci. Ale interakce mezi analytem a stěnou kapiláry nejsou žádoucí. Mohou vést ke ztrátě rozlišení separace. V závislosti na rozsahu těchto interakcí může dojít k chvostování píků nebo se může analyt kompletně naadsorbovat na stěnu kapiláry. Nejčastější příčinou tohoto jevu jsou v případě nepokryté kapiláry interakce mezi kationty v roztoku a negativně nabitou stěnou kapiláry.

Existuje několik možností pro redukci těchto interakcí. Nejjednodušší možností je modifikace pracovního elektrolytu (např. zvýšení koncentrace snižuje interakce analytů s kapilární stěnou). Další jednoduchou možností je použití extrémních pH. Při nízkých pH jsou všechny silanolové skupiny protonizované a nenabité, což vede k prevenci iontových interakcí. Naopak při vysokých pH jsou stěny extrémně negativní a nabitě analyty budou mít sklon být také negativní. Budou se tedy navzájem odpuzovat.

Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze je dalším jevem, který může snížit účinnost separace. Způsobuje deformaci píků z Gaussovského tvaru do charakteristického trojúhelníkovitého tvaru. Příčinou elektromigrační disperze je závislost migrační rychlosti analytu na koncentraci analytu v jeho zóně. Vzniká v případě, kdy je analyt dávkován v koncentraci, která podstatně ovlivní vodivost a pH základního elektrolytu v místě zóny.

3.1.2. Izotachoforéza (ITP)^{4,10}

Na rozdíl od zónové elektroforézy, která probíhá v jediném základním elektrolytu, probíhá izotachoforéza v nespojitě soustavě dvou elektrolytů (tj. operační systém), který je tvořen vedoucím (leading, LE) a koncovým (terminator, TE) elektrolytem. LE obsahuje ionty, jejichž efektivní pohyblivost je vyšší než pohyblivost iontů vzorku a naproti tomu ionty TE mají efektivní pohyblivost nižší. V ustáleném stavu je migrační rychlost všech složek soustavy stejná. Pro tuto metodu je charakteristická diskontinualita řady parametrů jako je např. intenzita elektrického pole, koncentrace zón, elektrický odpor, teplota atd. Zóny na sebe těsně navazují a rozhraní mezi nimi jsou ostrá (samozaostřující efekt). Během jedné analýzy lze separovat buď anionty nebo kationty. Poté hovoříme buď o aniontové či kationtové izotachoforéze.

3.1.3 Micelární elektrokinetická chromatografie (MECK)

Micelární elektrokinetická chromatografie byla vyvinuta pro separaci nenabitých částic¹⁰. Pracovní elektrolyt obsahuje ionogenní smáčedlo v takové koncentraci (kritická micelární koncentrace), při které dojde k vytvoření micel. Na povrchu mají záporný elektrický náboj (jsou hydrofilní) a uvnitř jsou naopak hydrofobní části, které tvoří tzv. pseudostacionární fázi. Mezi nejčastěji používaná smáčedla patří SDS (dodecylsulfát sodný) a cetyltrimethylamonium-bromid⁶. Složky směsi se separují mezi pseudostacionární fázi v micelách a vodný pufr.

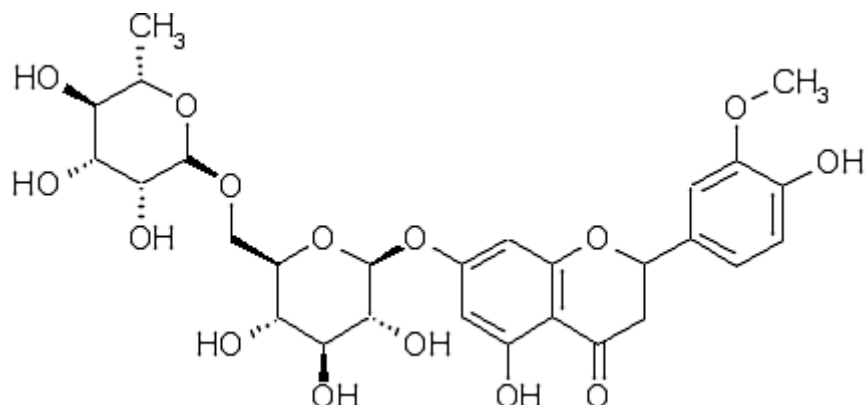
3.1.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC)¹⁰

CEC je hybridní technologie kombinující principy kapilární elektroforézy a HPLC. Jako kolony jsou používány kapiláry (50-100 μm I.D), které jsou plněny mikročásticemi stacionární fáze o rozměrech 1,5-5 μm . Pro posun mobilní fáze kolonou není používáno čerpadlo, jako je tomu u HPLC, ale aplikace stejnosměrného napětí, které vyvolá EOF. V koloně probíhá separace na stejných principech jako v HPLC. CEC je separační metoda vhodná pro separaci neutrálních částic, ale i pro separaci nabitých částic různé chemické povahy.

3.1.5 Izoelektrická fokusace (IEF)

IEF je metoda, která slouží pro separaci amfolytů (aminokyseliny, peptidy, proteiny), které existují ve formě kationtů, aniontů nebo elektroneutrálních látek v závislosti na pH prostředí. Při izoelektrické fokusaci dochází k oddělení látek v migračním prostředí s pH gradientem na základě rozdílných hodnot isoelektrických bodů. V místě, kde je pH prostředí rovno pI analytu se látka stane elektroneutrální, dál se v elektrickém poli nepohybuje. Tvoří zakoncentrované zóny, fokusuje⁶.

3.2 HESPERIDIN²⁰



Hesperidinum

$C_{28}H_{34}O_{15}$

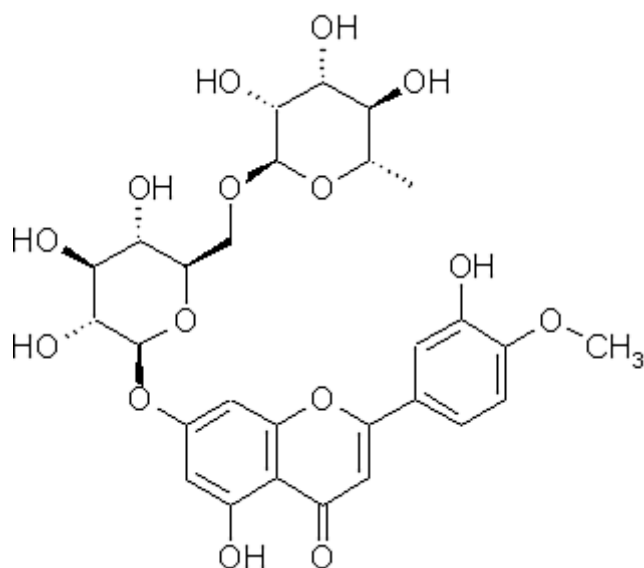
$M_r = 610,57$

$pK_a = 7,15$

Hesperidin je flavonoid, který se hojně nachází v citrusovém ovoci. Jeho aglykon se nazývá hesperetin. Hraje důležitou roli při obraně rostliny, kde uplatňuje svoji antioxidační aktivitu, jak ukázaly některé in vitro studie²¹. V lidském organismu přispívá ke zlepšení integrity cév.

Provedené studie odhalily jeho farmakologické vlastnosti. Hesperidin redukuje hladinu celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů a naopak zvyšuje hladinu HDL cholesterolu²². Dále také může zlepšit krevní tlak, zvýšit mikrocirkulaci, asistuje při hojení vředů a také se používá při léčbě chronické žilní insuficience. Díky těmto svým pozitivním účinkům na lidský organismus se stal součástí některých léčivých přípravků, jako je např. Detralex.

3.3 DIOSMIN²⁰



Diosminum

$C_{28}H_{32}O_{15}$

$M_r = 608,55$

$pK_a =$ nenalezeno

Diosmin se stejně jako hesperidin řadí mezi bioflavonoidní látky. Využívá se k léčbě žilních onemocnění jako je chronická žilní insuficience a k léčbě hemeroidů.

Prodlužuje vazokonstrikční účinek noradrenalinu na žilní stěnu, zvyšuje žilní tlak a tím redukuje žilní odpor, roztažitelnost a městnání. Tímto způsobem pak zvyšuje žilní návrat, redukuje vysoký žilní tlak u pacientů trpících chronickou žilní insuficiencí.

Diosmin dále zlepšuje odtok lymfy zvýšením frekvence a intenzity stahů lymfatických cév. Dále redukuje expresi některých adhezivních proteinů (VCAM-1, ICAM-1) a tím inhibuje adhezi, migraci a aktivaci leukocytů. To vede ke sníženému uvolňování mediátorů zánětu, hlavně volných kyslíkových radikálů a prostaglandinů.

3.4 METODY STANOVENÍ HESPERIDINU DIOSMINU

Existuje hned několik metod, které byly použity pro separaci a stanovení hesperidinu a diosminu. Tyto analyty jsou nejčastěji stanovovány v různých druzích citrusových plodů a šťáv.

HPLC je hojně používaná metoda. Provádí se v různých módech s využitím různých způsobů detekce. Pro HPLC s UV detekcí byla využita kolona LiChrospher®100 RP 18 e, 5 μ m, 4,00 mm I.D. Jako mobilní fáze byla použita 2% octová kyselina a 0,5% octová kyselina-ACN (50:50 v/v). Eluce byla gradientová^{23,24,25}. Jako mobilní fáze byly také použity ACN-1% octová kyselina (35/65 v/v) a methanol-ACN-1% octová kyselina (17/26/57)²⁶. Další použitou kolonou byla Zorbax SB C18, 5 μ m, 250x4,6 mm s izokratickou elucí. Jako mobilní fáze byla využita kombinace methanol-voda (0,2% mravenčí kyselina), 60:40 v/v²⁷ a nebo ACN a 0,05% mravenčí kyselina upravená triethylaminem na pH 5,0²⁸.

Pro RP-HPLC byla použita kolona LiChrosorb RP-18 a jako MF methanol-voda (60:40, v/v) s UV detekcí při 345 nm²⁹. Jiným způsobem detekce je použití hmotnostní spektrometrie, která využívá různých způsobů ionizace. Mezi ně patří např. ESI (ionizace elektrosprayem)³⁰.

Dalším možnou metodou pro analýzu HE a DI je kapilární elektroforéza, která nejčastěji využívá elektrochemickou detekci. Provádí se v kapilárách dosahující délky 40 - 75 cm s vnitřním průměrem 25 μ m a vnějším průměrem 360 μ m^{1,2,31,32}. Elektrochemická cela je tvořena třemi elektrodami: pracovní (uhlíkový disk o průměru 300 μ m), pomocná (platinová) a referenční (srovnávací, nasycená kalomelová) v kombinaci s BAS LC-4C amperometrickým detektorem^{1,31,32}.

Jako pracovní elektrolyt se nejčastěji používá borátový pufr o různé síle, a to buď 50 mM³² nebo 60 a 80 mM^{1,31}. Nebo lze využít zcela jiný pufr, např. chromátový 1,0 a 5,0 mM². Nejběžnější hodnotou pH je 9,0 popř. 8,45.

Jinou, ale méně používanou metodou je TLC s UV detekcí (286 nebo 344 nm), prováděnou na silikagelu s MF chloroform-methanol-voda (23/12/2 v/v)^{33,34}.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 ROZTOKY A CHEMIKÁLIE

4.1.1 CHEMIKÁLIE

tetraboritan sodný p.a., Sigma-Aldrich Praha, s.r.o., (Mr=381,7)
dihydrogen-fosforečnan sodný p.a., Dr. Kulich Pharma, s.r.o., (Mr=156,008)
 α -cyklodextrin p.a., Sigma-Aldrich Praha, s.r.o. (Mr= 972,86)
 β -cykloextrin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr= 1137,01)
 γ -cyklodextrin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o. (Mr=1297,1)
methanol p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o. (Mr=32,04)
ethanol p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=46,07)
dimethylsulfoxid p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o.(Mr=78,13)
methylparaben p.a., Dr. Kulich Pharma s.r.o.
sodium dodecyl sulfát p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=288,38)
diosmin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=608,56)
hesperidin p.a., Fluka (Mr=610,57)
hydroxid sodný p.a., Penta a.s., Praha (58,44)
kyselina boritá p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=61,83)
sulfatovaný β -cykloextrin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o
(2-hydroxypropyl)- β -cykloextrin p.a., Fluka (Mr=1380,0)
2,6-Di-O-methyl- β -cykloextrin p.a., Fluka (Mr=1331,39)
apigenin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=270,24)
1-nitroso-2-naftol p.a., Chemapol (Mr=173,17)
kyselina ferulová p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr= 194,18)
kyselina naftylodctová p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=186,21)
kyselina tolfenamová p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr=261,7)
tricin p.a., Sigma-Aldrich Praha s.r.o (Mr= 79,17)

4.1.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Na přípravu pracovních roztoků jsem použila vodu připravenou zařízením Millipore MileQRG.

4.1.2.1 Příprava pracovních elektrolytů

Pro přípravu základního elektrolytu jsem podle požadované koncentrace nejdříve navážila odpovídající množství tetraboritanu sodného, který jsem rozpustila v redestilované vodě na ultrazvukové lázni, přidala jsem odpovídající množství methanolu a upravila jsem pH* kyselinou boritou na požadovanou hodnotu.

Podobným způsobem jsem připravovala i další roztoky elektrolytů, které jsem vyzkoušela při hledání vhodného pracovního elektrolytu.

4.1.2.2 Roztoky standardů pro optimalizaci metody

Do 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 50 mg diosminu, který jsem na ultrazvukové lázni rozpustila ve 25 ml DMSO a následně doplnila vodou po rysku. Do další 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 50 mg hesperidinu, který jsem na ultrazvukové lázni rozpustila v 5 ml DMSO a následně doplnila vodou po rysku.

Dále jsem oba roztoky smíchala v poměru 1:1. Zásobní roztok tedy obsahoval 30% DMSO, 25% EtOH a 45% MeOH. Koncentrace analytů v měřeném roztoku byla 0,5 mg/ml.

4.1.2.3 Hledání vhodného vnitřního standardu

Navážila jsem odpovídající množství zkoušených vnitřních standardů (apigenin, 1-nitroso-2-naftol, kyselina ferulová, kyselina naftyloctová, kyselina tolfenamová, methylparaben, propylparaben, triclin) a rozpustila je ve 2 ml zásobního roztoku standardů. Koncentrace IS měřeného roztoku byla 0,5 mg/ml.

4.1.2.4 Kalibrační roztoky

Do 25 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 20 mg diosminu a přesně asi 10 mg hesperidinu, které jsem na ultrazvukové lázni rozpustila v 7,5 ml DMSO. Následně jsem přidala 6,25 ml EtOH a doplnila po rysku MeOH (11,25 ml).

Dále jsem si do další 25 ml odměrné baňky připravila ředící roztok smícháním 7,5 ml DMSO, 6,25 ml EtOH a 11,25 ml MeOH. Ředící roztok tedy obsahoval 30 % DMSO, 25 % EtOH a 45 % MeOH.

Smícháním těchto dvou roztoků v příslušném poměru (viz.Tab.1) jsem získala sérii pěti kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 0,05-0,8 mg/ml pro diosmin a 0,025-0,4 mg/ml pro hesperidin. Koncentrace vnitřního standardu byla ve všech roztocích shodná, tedy 0,5 mg/ml.

Tab. 1 Ředění kalibračních roztoků (ml ZR + doplnění po rysku ředícím roztokem)

bod číslo	1	3	2	4	5
ZR (ml)	0,3125	0,625	1,25	3,125	1
ŘR (ml)	4,6875	4,375	3,75	1,875	0
c DI (mg/ml)	0,05	0,1	0,2	0,5	0,8
c HE (mg/ml)	0,025	0,05	0,1	0,25	0,4
c IS (mg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4.1.2.5 Příprava vzorku z tablety

Pět tablet Detralexu jsem rozetřela v třecí misce. Poté jsem do 50 ml odměrné baňky navážila průměrnou hmotnost jedné tablety, tedy přesně asi 0,700 g prášku z tablet, který jsem rozpustila asi ve 40 ml DMSO. Toto jsem nechala 30 min na ultrazvukové lázni, zchladila na laboratorní teplotu a poté doplnila DMSO po rysku. Takto získaný roztok jsem přefiltrovala přes běžný papírový filtr.

Dále jsem do 25 ml odměrné baňky pomocí automatické pipety přenesla 1 ml filtrátu, ke kterému jsem přidala 5 ml DMSO, 5 ml EtOH a doplnila MeOH po rysku (9 ml). Filtrát jsem tedy zředila 20x. Koncentrace diosminu, resp. hesperidinu byla 0,45 mg/ml, resp. 0,05 mg/ml.

4.2 PŘÍSTROJE

Při práci na této diplomové práci jsem používala tyto přístroje:

- Kapilární elektroforetický systém Prince CEC 750, Holandsko
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31, Německo
- Digitální pH metr PHM 220, Francie (kalibrace přístroje pomocí technických pufrů WTW)
- Kombinovaná pH elektroda Red Rod
- Magnetická míchačka

Kapilární elektroforetický systém Prince

Tento přístroj je vybaven PDA (photo diode-array) detektorem (UV detektor). Separace probíhala v křemenné kapiláře, potažené vrstvou polyimidu o celkové délce 67,2 cm a efektivní délce 60 cm. Vnitřní průměr kapiláry byl 50 μm . Ovládání a komunikace s přístrojem byla zajištěna pomocí počítačového softwaru DAX 3D.

4.3 PRACOVNÍ POSTUP

Na počátku každého dne jsem nejdříve spustila počítač a poté samotný elektroforetický systém. Dále jsem nastavila promývání kapiláry na 10 min 1 M NaOH, 10 min 0,1 M NaOH a 10 min vodou, a to vše při tlaku 2000 mbar. Pro zajištění lepší reprodukovatelnosti a lepší separační účinnosti jsem systém promývala mezi každou analýzou 2 min 0,1 M NaOH, 2 min vodou a 3 min pracovním elektrolytem, a to při tlaku 1500 mbar.

Po promytí jsem nastavila parametry měření a měřicí sekvenci a spustila jsem analýzu. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 20 s. Přístroj byl temperován na 25 °C. Samotná separace probíhala při napětí 20 kV. Detekce probíhala při třech vlnových délkách 207, 270 a 284 nm.

Před každou analýzou jsem pracovní elektrolyt a vzorek odplynila na 5 min na ultrazvukové lázni.

Na konci dne po ukončení všech měření jsem spustila promývací sekvenci stejnou jako na začátku dne.

4.4 VÝPOČTY

4.4.1 Kalibrační závislost

Na změření kalibrační závislosti jsem použila celkem pět kalibračních roztoků. Jejich koncentrace popisuje tabulka č.2:

Tab. 2 Koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků (mg/ml)

bod č.	c (DI) mg/ml	c (HE) mg/ml	c (IS) mg/ml
1	0,05	0,025	0,5
2	0,1	0,05	0,5
3	0,2	0,1	0,5
4	0,5	0,25	0,5
5	0,8	0,4	0,5

Provedla jsem celkem tři měření s každým kalibračním roztokem. Každý z nich obsahoval stejnou koncentraci vnitřního standardu methylparabenu. Kalibrační závislost byla zhodnocena metodou lineární regrese pomocí PC, v programu Excel. Jako vstupní parametry jsem zadávala poměr plochy píku k ploše píku vnitřního standardu a odpovídající koncentraci analytu v mg/ml.

4.4.2 Limit detekce a limit kvantifikace³⁵

Limit detekce (LOD) je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat, ale ne kvantifikovat. Jedná se o test limitu, který specifikuje, zda analyt je či není nad nebo pod určitou hodnotou. Vyjadřuje se jako koncentrace analytu při daném poměru signálu k šumu, většinou 3:1.

Limit kvantifikace (LOQ) je definován jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být stanovena s přijatelnou přesností a správností při stanovených provozních podmínkách dané metody.

Pro vlastní výpočet limitů detekce a limitů kvantifikace jsem využila následující vztahy:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot (\text{SD}/S)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot (\text{SD}/S),$$

kde SD označuje směrodatnou odchylku úseku na ose Y a S směrnici rovnice regresní přímky.

4.4.3 Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem použila roztoky standardů o koncentracích 0,1 mg/ml HE a 0,2 mg/ml DI. Koncentrace vnitřního standardu ve vzorku byla 0,5 mg/ml. Celkem jsem provedla šest měření. Z výsledných hodnot jsem vypočítala jejich průměr, směrodatnou a relativní směrodatnou odchylku (RSD). Výpočty jsem provedla podle následujících vztahů:

Průměrná hodnota výsledků \bar{x}

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Relativní směrodatná odchylka

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{x} \cdot 100$$

Pro všechny uvedené vzorce platí, že n je počet měření a hodnota x_i označuje jednotlivé výsledky měření.

4.4.4 Rozlišení³⁶

Rozlišení (R_S) mezi píky dvou složek s podobnými výškami se vypočítá pomocí vztahu:

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

kde $t_{R2} > t_{R1}$,

v němž značí t_{R1} a t_{R2} migrační časy nebo vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků a w_{h1} a w_{h2} šířky píků v polovině jejich výšky.

4.4.5 Počet teoretických pater (účinnost separace)³⁶

Počet teoretických pater (N) se vypočítá pomocí vztahu:

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

v němž značí t_r migrační čas nebo vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu sledovaného píku a w_h označuje šířku píku v polovině jeho výšky.

Výškový ekvivalent teoretického patra (HETP)

Hodnotu výškového ekvivalentu teoretického patra lze vypočítat ze vztahu:

$$\text{HETP} = \frac{l}{N}$$

v němž l značí efektivní délku kapiláry.

4.4.6 Ověření správnosti metody

Pro ověření správnosti metody jsem využila metodu standardního přídatku. Nejdříve jsem do 50 ml odměrné baňky navážila přesně asi 680,4 mg prášku získaného rozdrčením pěti tablet Detralexu a následně jsem k tomuto množství ještě navážila přesně asi 303,9 mg diosminu a 33,3 mg hesperidinu. Toto jsem rozpustila asi ve 40 ml DMSO a nechala 30 min na ultrazvukové lázni. Poté jsem tento roztok ochladila na laboratorní teplotu a doplnila DMSO po rysku. Dále jsem tento roztok přefiltrovala. Odebrala jsem 1 ml filtrátu do 20 ml odměrné baňky a přidala jsem dalších 5 ml DMSO, 5 ml EtOH a doplnila MeOH po rysku (filtrát jsem naředila 20x). Výsledná měřená koncentrace byla teoreticky 0,75 mg/ml diosminu (vložen 0,304 mg/ml) a 0,083 mg/ml hesperidinu (vložen 0,0333 mg/ml).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK A STANOVENÍ DIOSMINU A HESPERIDINU

5.1.1 Volba vhodné vlnové délky pro detekci

Nejdříve bylo třeba zjistit optimální vlnovou délku pro detekci, a to proměřením UV spekter standardů DI a HE. Pro měření jsem standardy rozpustila v pracovním elektrolytu (50 mM borát, pH 9) s přídavkem 25 % MeOH. Jako blank jsem použila BGE s 25% MeOH. Měření jsem prováděla v rozmezí 200 až 400 nm. Obě látky vykazovaly tři absorpční maxima. Diosmin vykazoval maxima v okolí 207, 261 a 350 nm, hesperidin nejvíce absorboval při 201, 284 a 332 nm. Po zhodnocení těchto údajů jsem pro detekci vybrala tři vlnové délky, a to 207, 270 a 284 nm. Výsledky jednotlivých analýz jsem pak hodnotila při vlnové délce 207 nm.

5.1.2 Volba vhodného pracovního elektrolytu

Při volbě nejvhodnějšího pracovního elektrolytu bylo nejdůležitější zvolit ten, ve kterém dojde za stanovených podmínek k rozdělení všech látek, které se mohou následně stanovit. Vyzkoušela jsem tyto následující elektrolytové systémy:

- borátový pufr
- fosfátový pufr
- kombinace fosfátového a borátového pufru
- tricinový pufr.

Téměř ve všech případech došlo k separaci jednotlivých složek. Nejdříve putoval hesperidin a poté diosmin.

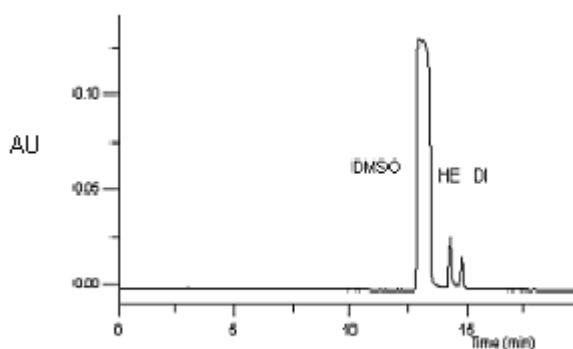
V případě borátového pufru došlo k úplnému oddělení obou analytů, symetrie píků nebyla zcela optimální, rozlišení bylo ale dobré. Délka analýzy se

v jednotlivých pokusech pohybovala v rozmezí 10 až 15 min, což svědčilo o ne příliš stabilním elektroosmotickém toku.

Fosfátový pufr se projevil jako ne příliš optimální. Nedošlo k úplnému rozdělení obou látek. Tvar a rozlišení pík bylo nedostatečné. Délka analýzy byla delší než 15 min.

V případě tricínového pufru se analyty od sebe neoddělily vůbec. Nebylo možné od sebe jednotlivé píky rozeznat. Tento pufr jsem tedy vyloučila.

Jako optimální jsem zvolila kombinaci borátového a fosfátového pufru. Jednotlivé píky se od sebe rozdělily, jejich symetrie a rozlišení bylo dobré. Proto jsem si ho také vybrala pro další práci. Pro ilustraci zde uvádím příklad elektroforeogramu standardů.



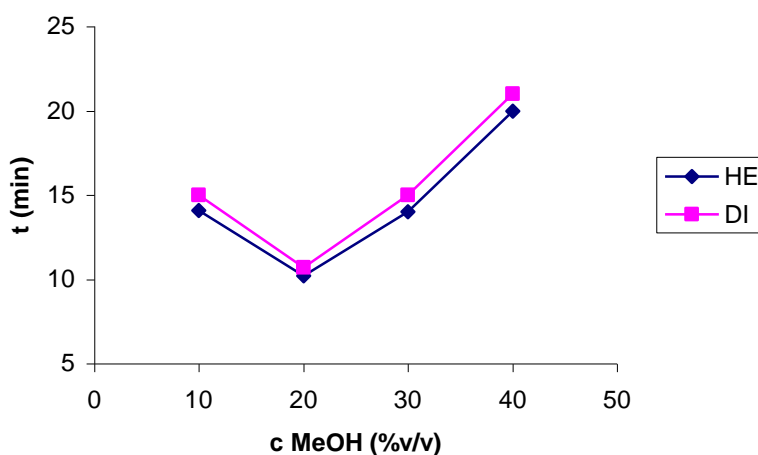
Obr.5 Elektroforeogram standardů HE a DI, 10 mM fosfát, 40 mM borát, 10% MeOH, 15 mM β -CD, pH* 8,00, λ = 207 nm

Dále jsem vyzkoušela vliv organického rozpouštědla MeOH na separaci, vliv různých druhů cyklodextrinů (α -, β -, γ -CD, sulfatovaný β -CD, (2-hydroxypropyl)- β -CD, 2,6-Di-O-methyl- β -CD) v koncentracích 5 a 10 mM. Zkoušela jsem také vliv surfaktantu SDS. Také jsem zjišťovala vliv pH* a koncentrace pracovního elektrolytu a v neposlední řadě bylo mým cílem nalézt také vhodný vnitřní standard.

5.1.3 Vliv organického rozpouštědla

Velmi důležitým jevem při elektroforetické separaci je elektroosmotický tok. Mnohdy ale dochází k potížím při snaze EOF udržet a kontrolovat ho. Tyto problémy se dají řešit např. potažením nebo derivatizováním kapilár, přidavkem různých surfaktantů či organických rozpouštědel³⁷. Organická rozpouštědla mění zeta potenciál a viskozitu. Obvykle EOF snižují⁵.

Rozhodla jsem se tedy zjistit, jaký vliv má na elektroforetickou separaci MeOH. Připravila jsem si sérii čtyř pufrů stejného složení, ke kterým jsem postupně přidávala methanol tak, že první pufr obsahoval 10 % MeOH, druhý 20 %, třetí 30 % a čtvrtý 40 % MeOH. Při hodnocení výsledků jsem se zaměřila na sledování délky analýzy a na kvalitu samotné separace. Na následujícím obrázku jsem zobrazila vliv koncentrace MeOH na délku analýzy.



Obr.6 Vliv koncentrace methanolu na migrační časy HE a DI; BGE: 50 mM borát, pH* 8,00, Napětí 20 kV

Z výše uvedeného grafu je zřejmé, že nejrychleji analýza probíhala při přidavku 20 % methanolu, migrační čas analytů se pohyboval v okolí 10 min. Migrační čas však při výběru vhodného množství methanolu nebyl rozhodujícím parametrem, protože rychlost analýzy měla také velký vliv na kvalitu separace. V případě 20,30 a 40 % MeOH nebyly tvary (symetrie) píků a ani jejich rozlišení dostatečné. Rozhodla jsem se tedy zvolit variantu s obsahem 10 % MeOH v BGE. Tvar, symetrie i rozlišení píků byly velmi dobré.

5.1.4 Ovlivnění separace pomocí cyklodextrinů

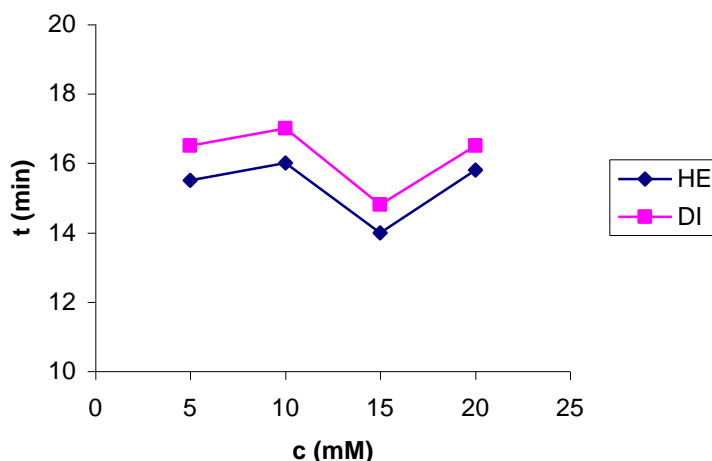
Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z několika α -1,4-D-glukopyranosových jednotek, vznikající enzymatickou degradací škrobu. Takto vzniká směs cyklických a lineárních oligosacharidů, které nejčastěji obsahují šest až osm glukózových jednotek. Podle jejich počtu jednotek rozlišujeme α -, β -, γ -CD a mnohé další. Cyklodextriny mají schopnost tvořit inkluzivní komplexy, a to díky svému speciálnímu tvaru (tvoří dutinky neboli kavity). Do těchto kavit mohou být inkludovány organické nebo anorganické molekuly³⁸. Tímto jevem mohou selektivně ovlivnit rychlost migrace dané látky.

Vyzkoušela jsem následující typy cyklodextrinů:

- α -CD
- β -CD
- γ -CD
- sulfatovaný β -CD
- (2-hydroxypropyl)- β -CD
- 2,6-Di-O-methyl- β -CD

Všechny tyto typy cyklodextrinů jsem vyzkoušela v koncentraci 5 a 10 mM. V případě použití α -CD nedošlo k žádnému zlepšení oproti klasickému pufru, stejně jako u hydroxypropyl β -CD a methyl- β -CD. Píky byly neostré a nesymetrické, migrační časy se pohybovaly kolem 16 min. Při použití γ -CD se píky od sebe vůbec neoddělily. Jako nejoptimálnější jsem zvolila samotný β -CD, při jehož použití kvalita separace nabyla výrazného zlepšení. Tvar i symetrie píků byly mnohem lepší, než při použití elektrolytového systému bez přidání CD. Jen migrační časy se asi o minutu prodloužily.

Dále bylo mým cílem zjistit nejvhodnější koncentraci β -CD. Připravila jsem si tedy sérii pufrů o koncentracích β -CD 5, 10, 15 a 20 mM. S rostoucí koncentrací tohoto CD se kvalita separace zvyšovala. Píky byly čím dál víc symetričtější, vyšší i ostřejší. Došlo i ke zkrácení analýzy, a to přibližně na 15 min. Tento trend ale platil pouze do koncentrace 15 mM. Koncentrace 20 mM už nepřinesla žádné další zlepšení, spíše se kvalita separace začala zhoršovat. Proto jsem vyšší koncentrace β -CD netestovala. Jako optimální jsem tedy zvolila koncentraci 15 mM.



Obr. 7 Vliv koncentrace β -CD na migrační časy analytů DI a HE; BGE: 50 mM borát, 10% MeOH, pH* 8,00

5.1.5 Optimalizace pH*

Velmi důležitým parametrem při optimalizaci složení pracovního elektrolytu je správná volba pH*. pH* kontroluje jak počet negativně nabitých silanolových skupin na vnitřní straně kapiláry, ale také určuje stupeň disociace analytů. V případě flavonoidů HE i DI se jedná o slabé kyseliny, a to díky přítomnosti fenyl-hydroxylové skupiny. Jejich zdánlivý náboj tedy závisí na jejich pK_a a pH* elektrolytu (pK_a HE = 7,15 a pK_a DI nebylo v literatuře nalezeno)².

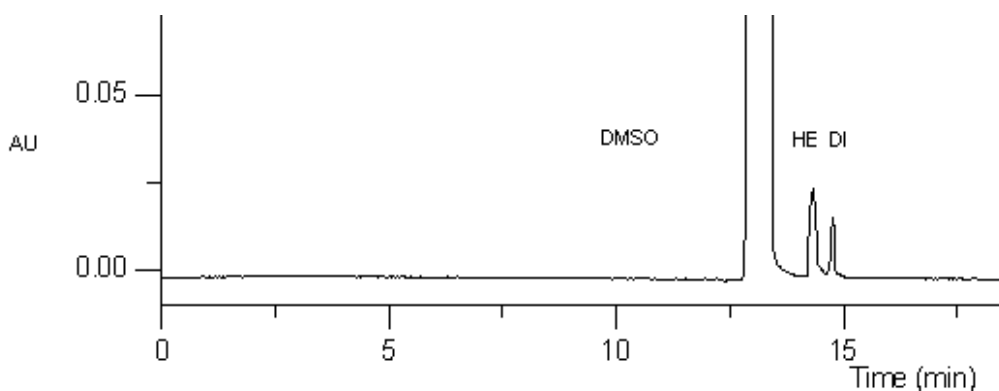
Sledovala jsem vliv pH pracovního elektrolytu v rozmezí pH od 7,5 do 8,5. Při nižších hodnotách pH* nebyla kvalita separace uspokojivá, migrační časy obou analytů se sice zkrátily, ale nedošlo k dokonalému rozdělení obou píků (analytů). Stejně tomu bylo i při vyšších hodnotách pH*. Jako nejoptimálnější hodnotu jsem si vybrala pH* 8,00. Délka analýzy byla 15 min a kvalita píků byla také uspokojivá.

5.1.6 Vliv koncentrace základního elektrolytu

Mým cílem bylo zjistit vliv koncentrace tetraboritanu v základním elektrolytu na délku a kvalitu analýzy. Testovala jsem následující elektrolytové systémy o koncentraci tetraboritanu 50, 60, 70 a 80 mM.

Z dostupné literatury jsem zjistila, že nejvhodnější koncentrace tetraboritanu by měla být 50 mM. Tento předpoklad se mi při testování jednotlivých systémů potvrdil. Při zvyšující se koncentraci se doba analýzy prodlužovala a přesáhla hodnotu 20 min. Vysoké koncentrace měly také negativní vliv na samotnou separaci. Píky se od sebe vzdalovaly, jejich symetrie se zhoršovala. Pro další analýzy jsem tedy zvolila systém 50 mM borát.

Dále mě zajímalo, jaký vliv na analýzu má použití elektrolytového systému fosfát-borát v koncentraci 40 mM borát a 10 mM fosfát. Zjistila jsem, že jeho použití přineslo ještě další zlepšení kvality analýzy (obr.8). Pro další analýzu jsem se tedy rozhodla využít tento systém.



Obr. 8 Elektroforeogram standardů HE a DI; BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 15 mM β -CD, pH* 8,00, 10 % MeOH, λ = 207 nm, teplota 25°C, napětí 20 kV

5.1.7 Volba vnitřního standardu

Při hledání vhodného vnitřního standardu jsem vyzkoušela tyto látky:

- apigenin
- 1-nitroso-2-naftol
- kyselina ferulová
- kyselina naftyloctová

- kyselina tolfenamová
- methylparaben
- propylparaben

Všechny zkoušené látky jsem použila v koncentraci 0,5 mg/ml. Zkoušené IS migrovaly až na konci, tedy až za oběma analyty. Většina z nich byla dobře oddělena, ale zpožděna za píky analytů zhruba o 5 min. Jejich píky byly zdeformované, nesymetrické. Jako optimální vnitřní standard jsem si vybrala methylparaben ($c = 0,5$ mg/ml). Jeho pík migroval jako poslední, ale byl dobře oddělen (cca 0,5 min), byl ostrý a symetrický a o jeho plocha i výška byly o něco vyšší nežli píky analytů.

5.1.8 Vliv SDS

Jako další možnost jsem vyzkoušela do už optimalizovaného systému přidat detergent SDS, a to v koncentracích 10, 20 a 30 mM. Jak se ukázalo, tento krok nebyl správný. Jeho přidání do systému velice negativně ovlivnilo výsledek celé analýzy (v případě všech tří koncentrací). Doba analýzy se prodloužila (cca na 20 min a více), píky nebyly rozlišeny. Rozhodla jsem se tedy od této varianty ustoupit.

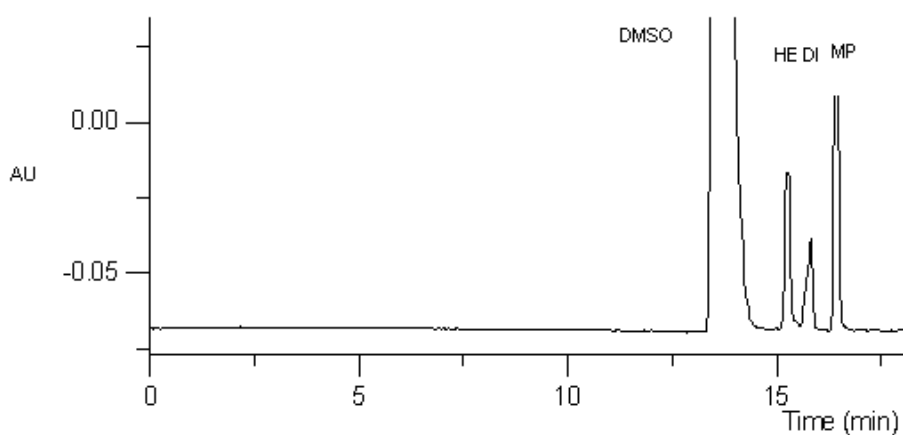
5.1.9 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky separace

Po vyhodnocení všech naměřených údajů jsem zjistila optimální složení pracovního elektrolytu. To je uvedeno v Tab.3.

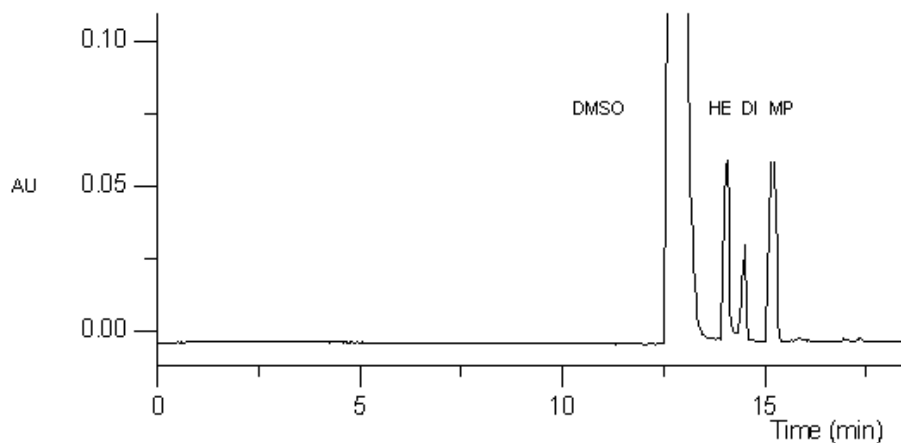
Tab.3 Optimální podmínky separace a složení pracovního elektrolytu

1. složka pufru	40 mM borát
2. složka pufru	10 mM fosfát
rozpouštědlo	10 % methanol
aditivum	15 mM β -CD
pH*	8,00
teplota	25 °C
napětí	20 kV
detekce	207, 270, 284

Na následujících obrázcích uvádím dva elektroforeogramy standardů hesperidinu, diosminu a methylparabenu (IS) získané při použití optimálního pracovního elektrolytu a za optimálních podmínek. Jako první migruje DMSO (jako indikátor EOF), následuje hesperidin, diosmin a na konci methylparaben.



Obr. 9 Elektroforeogram standardů HE, DI a IS; BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 15 mM β -CD, 10 % MeOH, pH* 8,00, t = 25°C, napětí 20 kV, $\lambda = 207$



Obr. 10 Elektroforeogram standardů HE, DI a IS; BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 15 mM β -CD, 10 % MeOH, pH* 8,00, $t = 25^\circ\text{C}$, napětí 20 kV, $\lambda = 207$

5.1.10 Účinnost separace

Pro výpočet účinnosti separace jsem využila vztahy ze str. 27. Lze ji vyjádřit buď pomocí počtu dosažených teoretických pater a nebo pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra.

Tab. 4 Účinnost separace analytů HE a DI

Analyt	N	HETP (μm)
hesperidin	2704	22,19
diosmin	1082	55,45

5.1.11 Rozlišení

Pro výpočet rozlišení jsem využila vzorec uvedený na str. 27.

Tab. 5 Rozlišení analytů HE, Di a IS (methylparabenu)

Analyty	Rozlišení R_s
hesperidin-diosmin	0,968
diosmin-methylparaben	0,984

5.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA A JEJÍ VÝSLEDKY

Pro měření kalibrační závislosti jsem využila optimální pracovní elektrolyt. Jako kvantitativní parametr jsem použila hodnoty ploch píku vztažené k ploše vnitřního standardu. Tyto hodnoty (velikosti ploch píků) jsem získala ze záznamu automaticky vyhodnocovaném počítačem. Provedla jsem tři měření pro každou koncentraci. Do grafu jsem poté vynášela závislost průměrné hodnoty poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci analytu v mg/ml. Tuto kalibrační závislost jsem zpracovala v počítačovém programu Excel metodou lineární regrese.

Výsledné hodnoty jsem získala ve tvaru:

$$y = kx + q \text{ (obecná rovnice přímky)}$$

y – plocha píku analytu / plocha píku IS

x – koncentrace látky (mg/ml)

k – směrnice přímky

q – absolutní člen (posunutí)

5.2.1 Kalibrační závislost pro diosmin

Koncentrace, které jsem použila pro změření kalibrační závislosti diosminu jsou uvedeny v Tab. 6

Tab. 6 Koncentrace použité pro změření kalibrační závislosti DI

měření č.	koncentrace (mg/ml)
1	0,05
2	0,1
3	0,2
4	0,5
5	0,8

Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky $y = 0,1516x + 0,0901$

k - 0,1516

q - 0,0901

korelační koeficient: 0,9987

reziduální odchylka: 0,0028

hodnota F-statistiky: $1,1651 \cdot 10^3$

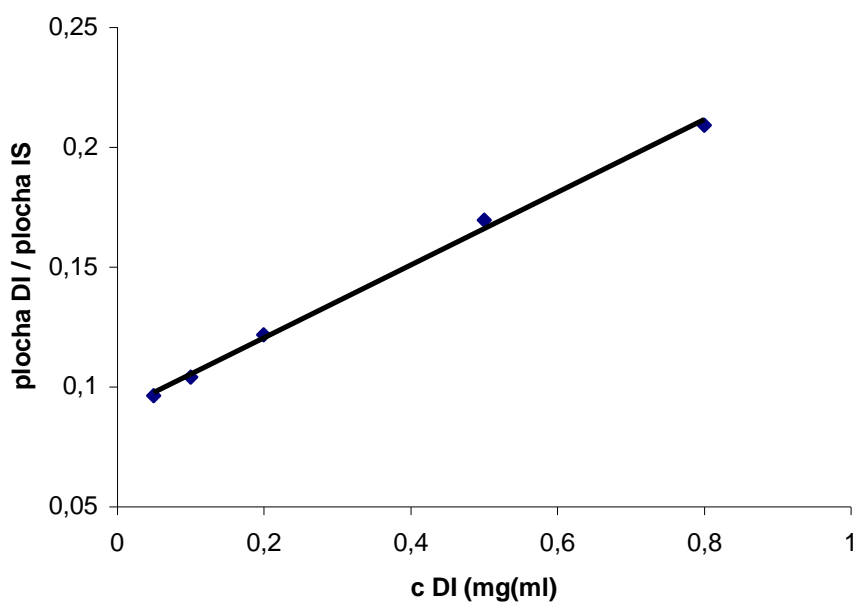
další parametry:

$s_k - 0,0044$

$s_q - 0,0019$

$r^2 - 0,9974$

počet stupňů volnosti 3



Obr. 11 Kalibrační závislost pro diosmin; BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 10 % MeOH, 15 mM β -CD, pH* 8,00

Kalibrační závislost je ve sledované koncentraci diosminu lineární (korelační koeficient 0,9987).

5.2.2 Kalibrační závislost pro hesperidin

Koncentrace, které jsem použila pro změření kalibrační závislosti diosminu jsou uvedeny v Tab. 7

Tab. 7 Koncentrace použité pro změření kalibrační závislosti HE

měření č.	koncentrace (mg/ml)
1	0,025
2	0,05
3	0,1
4	0,25
5	0,4

Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky $y = 0,6992x - 0,0022$

k - 0,6992

q - -0,0022

korelační koeficient: 0,9973

reziduální odchylka: 0,0094

hodnota F-statistiky: $0,545 \cdot 10^3$

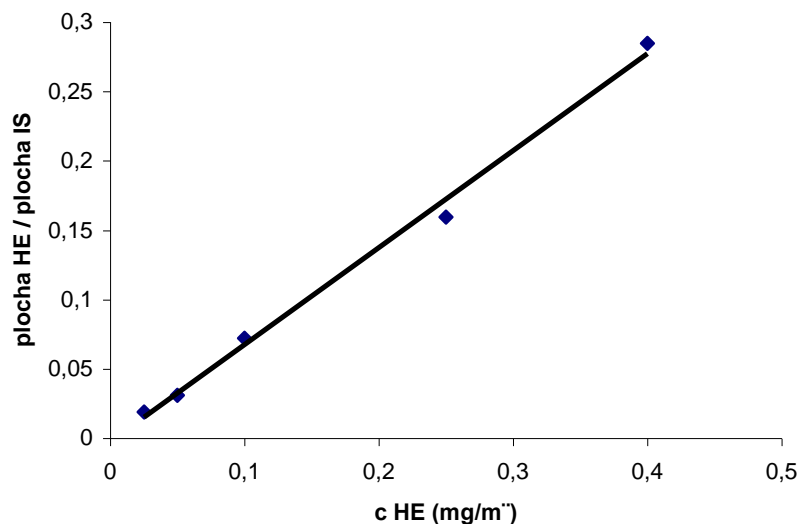
další parametry:

$s_k - 0,0299$

$s_q - 0,0065$

$r^2 - 0,9945$

počet stupňů volnosti 3



Obr. 12 Kalibrační závislost pro hesperidin; BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 10 % MeOH, 15 mM β -CD, pH* 8,00

Kalibrační závislost je ve sledovaném rozmezí koncentrací lineární (korelační koeficient 0,9973).

5.2.3 Limit detekce a limit kvantifikace

Pro výpočet limitů detekce a kvantifikace jsem využila vztahy uvedené na str.26, tj. založené na výpočtu z parametrů kalibrační závislosti.. Výsledky jsou uvedeny v Tab.8.

Tab. 8 Limity detekce a kvantifikace pro DI a HE

Analyt	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
hesperidin	0,03	0,09
diosmin	0,04	0,12

U hesperidinu vyšel limit detekce i kvantifikace vyšší než byla nejnižší koncentrace při měření kalibrační závislosti., která byla 0,025 mg/ml. Stejně tak u diosminu byl limit kvantifikace vyšší než jeho nejnižší měřená koncentrace, tj. 0,05 mg/ml. Obě kalibrační závislosti vyšly v testovaném rozmezí lineární.

5.3 OPAKOVATELNOST METODY

Pro zjištění opakovatelnosti metody (plochy píků, migrační časy) jsem provedla celkem šest měření pro koncentraci 0,1 mg/ml hesperidinu a 0,2 mg/ml diosminu. Výpočet směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsem provedla podle vztahů uvedených na straně 26 a 27. Výsledky jsou uvedeny v Tab.9 a 10.

Tab. 9 Opakovatelnost plochy píků k ploše piku methylparabenu (IS), n = 6

Analyt	Plocha píku / plocha MP (IS)	s	RSD (%)
hesperidin	0,0711086	0,0015159	2,13
diosmin	0,126068	0,004187	3,32

Tab. 10 Opakovatelnost migračních časů HE a DI, n = 6

Analyt	t _m (min)	s	RSD (%)
hesperidin	11,335	0,14914	1,32
diosmin	11,595	0,15553	1,34

5.4 ANALÝZA HVLP

Provedla jsem analýzu léčivého přípravku Detralex, a to metodou, kterou jsem předtím vypracovala. Tuto analýzu jsem provedla celkem šestkrát pro navážku standardů a šestkrát pro navážku léčivého přípravku. Výpočet množství stanovovaných látek jsem vypočítala podle vztahů:

$$m(x) = \frac{A_{vz} \cdot c_{st} \cdot 1000 \cdot \phi m_{tab}}{A_{st} \cdot m_{HVLP}}$$

m (x) - hmotnost stanovované látky (mg)

A_{vz} - plocha píku vzorku

A_{st} - plocha píku standardu

c_{st} - koncentrace standardu (mg/ml)

$\phi_{m_{tab}}$ - průměrná hmotnost tablety (g)

m_{HVLP} - navážka léčivého přípravku (g)

$$\% = \frac{m(x) \cdot 100}{m}$$

% - procenta deklarovaného obsahu

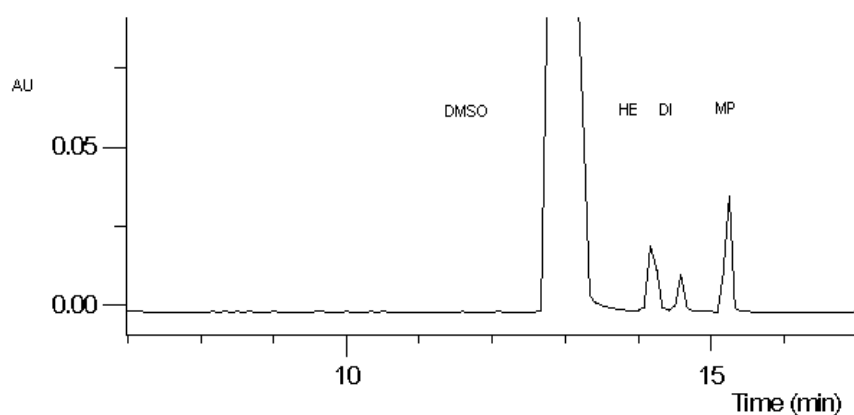
m - deklarovaný obsah (mg)

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 11:

Tab. 11 Analýza léčivého přípravku Detralex metodou CE, n = 6

Analyt	Deklarovaný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)	s	s_r (%)
hesperidin	50	98,38	0,00133	3,13
diosmin	450	97,00	0,01853	2,40

Pro ilustraci zde uvádím příklad elektroforeogramu Detralexu:



Obr. 13 Analýza HVLP za optimálních podmínek: BGE: 40 mM borát, 10 mM fosfát, 10 % MeOH, 15 mM β -CD, pH* 8,00, $\lambda=207$ nm, napětí 20 kV

5.5 OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY S PŘÍDAVKEM STANDARDNÍCH LÁTEK

Pro ověření správnosti metody jsem použila metodu analýzy s přidavkem standardních látek. Postup přípravy vzorku uvádím v Experimentální části na str.28. Pro výpočet recovery jsem použila vztah:

$$x = \frac{C_{zjištěji} \cdot 100}{C_{vložená}} \%$$

Výsledky analýzy jsem uvedla v Tab.12:

Tab. 12 Analýza léčivého přípravku Detralex-správnost metody

Analyt	C_{zjištěná} (µg/ml)	C_{vložená} (µg/ml)	Recovery (%)
hesperidin	31	33,3	93,09
diosmin	311	304	102,30

Z naměřených hodnot jsem vypočítala recovery. V případě diosminu je hodnota 102,30 % a v případě hesperidinu 93,09%. Z těchto získaných výsledků jsem usoudila, že jsem vypracovala správnou metodu pro současnou separaci a stanovení HE a DI v léčivém přípravku Detralex.

6. ZÁVĚR

V diplomové práci byly pomocí kapilární elektroforézy analyzovány bioflavonoidy hesperidin a diosmin. Bylo nalezeno a následně ověřeno optimální složení pracovního elektrolytu. Jako nejvhodnější byla zvolena kombinace fosfátového (10 mM) a borátového pufru (40 mM) s přidavkem methanolu a β -cyklodextrinu. Byl také nalezen vhodný vnitřní standard (methylparaben).

Pro každý analyt byla změřena kalibrační závislost. Dále byla ověřena účinnost separace, opakovatelnost a správnost metody. Byly stanoveny limity detekce a kvantifikace. Délka analýzy se pohybovala okolo 15 min.

Na základě všech měření a získaných hodnot lze říci, že byla vypracována metoda pro analýzu hesperidinu a diosminu v léčivém přípravku Detralex potahované tablety.

7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ACN	acetonitril
BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DI	diosmin
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
EtOH	ethanol
HE	hesperidin
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
ID	vnitřní průměr
IEF	izoelektrická fokusace
IS	vnitřní standard
ITP	izotachoforéza
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MECK	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MP	methylparaben
N	počet teoretických pater
pKa	negativní logaritmus acidické termodynamické disociační konstanty

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
TLC	tenkovrstevná chromatografie

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Peng Y., Liu F., Ye J.: *J. Chromatogr. B*, 2006, 830, 224-230
2. Bachman S., Huck D.Ch., Bakry R., Bonn K. G.: *Electrophoresis*, 2007, 28, 799-805
3. <http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/BK9780854044924/BK9780854044924-00001.pdf> (18.02.08)
4. *Příprava na praktická cvičení z instrumentální analýzy*, Faf UK HK, 2005/2006
5. http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography (18.02.08)
6. Pospíšilová M.: přednáška *Separací metody*, 2005/2006, Faf UK HK
7. Tanaka Y., Naruishi N., Fukuya H., Sakata J., Saito K., Wakida S. : *J. Chromatogr. A*, 2004, 1051, 193-197
8. Mikuš P., Valášková I., Havránek E.: *Talanta* 2005, 65, 1031-1037
9. Shabangi M., Sutton J.A.: *J. Pharm. Biomed. Ana.* 2005, 38, 66-71
10. Klouda P., *Moderní analytické metody*, 2003, nakladatelství P. Klouda, Ostrava
11. <http://analyt.wz.cz/capillary/capillary1.pdf> (15.03.08)
12. Corrandini D., Cogliandro E., D'Alessandro L., Nicoletti I.: *J. Chromatogr. A*, 2003, 1013, 221-232
13. http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/detectors.htm (18.02.08)
14. Heiger N.D. : *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*, Hewlett-Packard, Waldbronn 1999
15. Li S. F. Y.: *Capillary electrophoresis - Principles, Practice, Applications*, Elsevier, Amsterdam 1992
16. Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897
17. Gaš B., Štědrý M., Kenndler E.: *Electrophoresis* 1997, 18, 2123-2133
18. Ackermans M. T.: *Electrophoresis in open Capillaries*, Eindhoven 1992
19. Heiger N. D. : *High performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*, Hewlett- Packard, Waldbronn
20. http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis (21.04.08)

21. Hirata A., Murakami Y., Shoji M., Kadoma Y., Fujisawa S., *Anticancer Research*, 2005, 25, 3367-74
22. Monforte M.T., Trovato A., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Galati F.M., Le Curto F.B., *Farmaco*, 1995, 50, 595-599
23. Wang Y.C., Chuang Y.C., Ku Y.H., *Food Chem.*, 2007, 102, 1163-1171
24. Wang Y.C., Chuang Y.C., Ku Y.H., *Food Chem.*, 2008, 106, 277-274
25. Atli O., Ergun B., Atliokka G.: *Toxicology letters*, 2007, 172, S222
26. Yang C.Y., Tsai S.Y., Chao P.D.L., Yen H.F., Chien T.M., Hsiu S.L.: *J. Food Drug Anal.*, 2002, 10, 143-148
27. Xu F.G., Liu Y., Zhang Z., et al.: *Chromatographia*, 2007, 66, 763-766
28. Liu R., Zhang J., Liang M., Zhang W., Yan S., Lin M.: *J. Pharm. Biomed. Ana.*, 2007, 43, 1007-1012
29. El-Shatae M.A., El-Domiaty M.M.: *J. Pharm. Biomed. Ana.*, 2001, 26, 539-545
30. Dugo P., Lo Presti M., Ohman M. et al., *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 1149-1156
31. Wu T., Yueqing G., Jiannong Y.: *Food Chem.*, 2007, 100, 1573-1579
32. Gang CH., Luyan Z., Zhao J., Jiannong Y.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, 169-173
33. Janeczko Z., Hubicka U., Krzek J., Podolak I.: *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC*, 2003, 16, 377-380
34. Janeczko Z., Hubicka U., Podolak I., Krzek J., *Chemia Analityczna*, 2004, 49, 309-316
35. Ghulam A. Shabir: *J. Chromatogr. A*, 2003, 987, 57-66
36. http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm (21.04.08)
37. mat.skola-biotechnologie.cz/2007/VIII.workshop/Lecture_5a6.ppt (21.04.08)
38. http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf (21.04.08)

9. OBSAH

1.	ÚVOD	6
2.	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	7
3.	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY.....	8
3.1.1.	Kapilární zónová elektroforéza.....	9
3.1.1.1	<i>Elektroforetická pohyblivost</i>	9
3.1.1.2	<i>Instrumentace</i>	12
3.1.1.3	<i>Děje ovlivňující separaci</i>	14
3.1.2	Izotachoforéza.....	16
3.1.3	Micelární elektrokinetická chromatografie.....	16
3.1.4	Kapilární elektrochromatografie.....	17
3.1.5	Izoelektrická fokusace.....	17
3.2	HESPERIDIN.....	18
3.3	DIOSMIN.....	19
3.4	METODY STANOVENÍ HESPERIDINU A DIOSMINU.....	20
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1	ROZTOKY A CHEMIKÁLIE.....	21
4.1.1	Chemikálie.....	21
4.1.2	Příprava roztoků.....	22
4.1.2.1	<i>Příprava pracovních elektrolytů</i>	22
4.1.2.2	<i>Roztoky standardů pro optimalizaci metody</i>	22
4.1.2.3	<i>Hledání vhodného vnitřního standardu</i>	22
4.1.2.4	<i>Kalibrační roztoky</i>	23
4.1.2.5	<i>Příprava vzorku z tablety</i>	23
4.2	PŘÍSTROJE.....	24
4.3	PRACOVNÍ POSTUP.....	24
4.4	VÝPOČTY.....	25
4.4.1	Kalibrační závislost.....	25
4.4.2	Limit detekce a limit kvantifikace.....	25
4.4.3	Opakovatelnost metody.....	26
4.4.4	Rozlišení.....	27

4.4.5	Počet teoretických pater.....	27
4.4.6	Ověření správnosti metody.....	28
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.1	OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK A STANOVENÍ DIOSMINU A HESPERIDINU.....	29
5.1.1	Volba vhodné vlnové délky pro detekci.....	29
5.1.2	Volba vhodného pracovního elektrolytu.....	29
5.1.3	Vliv organického rozpouštědla.....	31
5.1.4	Ovlivnění separace pomocí cyklodextrinů.....	32
5.1.5	pH* optimalizace.....	33
5.1.6	Vliv koncentrace základního elektrolytu.....	34
5.1.7	Volba vnitřního standardu.....	34
5.1.8	Vliv SDS.....	35
5.1.9	Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky separace.....	36
5.1.10	Účinnost separace.....	37
5.1.11	Rozlišení.....	37
5.2	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA A JEJÍ VÝSLEDKY.....	38
5.2.1	Kalibrační závislost pro diosmin.....	38
5.2.2	Kalibrační závislost pro hesperidin.....	40
5.2.3	Limit detekce a limit kvantifikace.....	41
5.3	OPAKOVATELNOST METODY.....	42
5.4	ANALÝZA HVLP.....	42
5.5	OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY S PŘÍDAVKEM STANDARDNÍCH LÁTEK.....	44
6.	ZÁVĚR.....	45
7.	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY.....	46
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	48
9.	OBSAH.....	50

