

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie



**STANOVENÍ SEPTONEXU VE FARMACEUTICKÝCH
PŘÍPRAVCÍCH METODOU KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ
ELEKTROFORÉZY S VODIVOSTNÍ DETEKČÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové, 2009

Bc. Martina Šindelková

Děkuji doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. a Mgr. Kláře Petřů za jejich ochotu a pomoc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně za použití literatury a dalších zdrojů uvedených v kapitole Použité zdroje.

OBSAH

1. ÚVOD.....	5
1.1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	8
2.1.1. Úvod a teorie elektromigračních separačních metod	8
2.1.2. Princip CZE	16
2.1.3. Další elektromigrační separační metody	18
2.1.4. Cyklodextriny	20
2.2. BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE	22
2.2.1. Způsoby detekce používané u CZE	22
2.2.2. Bezkontaktní vodivostní detekce.....	23
2.3. SEPTONEX.....	24
2.3.1. Základní údaje	24
2.3.2. Farmakologické vlastnosti.....	25
2.3.3. Možnosti stanovení septonexu	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	29
3.1.1. Chemikálie.....	29
3.1.2. Příprava roztoků	30
3.2. VÝBĚR ELEKTROLYTU, CYKLODEXTRINU A VNITŘNÍHO STANDARDU	32
3.2.1. Výběr elektrolytu.....	32
3.2.2. Výběr cyklodextrinu	33
3.2.3. Výběr vnitřního standardu (IS).....	33
3.3. PŘÍSTROJE.....	34
3.4. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY	34
3.4.1. Pracovní postup	34
3.4.2. Linearita a opakovatelnost metody.....	35
3.4.3. Stanovení obsahu septonexu v přípravku	36
3.4.4. Limit detekce a kvantifikace	37

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1. VÝBĚR ELEKTROLYTU, CYKLODEXTRINU A VNITŘNÍHO STANDARDU	39
4.1.1. Výběr elektrolytu	40
4.1.2. Výběr cyklodextrinu	41
4.1.3. Výběr vnitřního standardu (IS).....	43
4.2. OPTIMALIZACE METODY	44
4.2.1. Optimalizace elektrolytu	44
4.2.2. Optimalizace dalších podmínek	47
4.2.3. Závěr optimalizace metody	50
4.3. STANOVENÍ LINEARITY A OPAKOVATELNOSTI	50
4.3.1. Linearita.....	50
4.3.2. Opakovatelnost	51
4.4. STANOVENÍ OBSAHU SEPTONEXU V PŘÍPRAVKU	52
4.5. STANOVENÍ LIMITU DETEKCE A KVANTIFIKACE	56
5. ZÁVĚR	57
6. SEZNAMY	60
7. POUŽITÉ ZDROJE	64
8. PŘÍLOHY	67
8.1. ELEKTROFOREOGRAMY	68
8.2. DATA PRO STANOVENÍ SEPTONEXU V PŘÍPRAVKU A OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY	71

1. ÚVOD

1.1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

S vývojem farmaceutického průmyslu a nárůstem množství léčivých látek roste potřeba tyto látky spolehlivě analyzovat. Pro zajištění kvalitních, účinných a bezpečných léčiv je velmi důležité mít k dispozici analytické metody, které budou schopny přesně, rychle a levně stanovovat kvantitu i kvalitu látek obsažených v analytu.

Pro stanovení septonexu, hlavní účinné látky několika farmaceutických přípravků, taková výše zmíněná analytická metoda zatím chybí. Septonex patří mezi invertní mýdla ze skupiny antiseptických látek. Jeho charakteristickou součástí je kvarterní amoniová skupina, která je i součástí některých jiných významných zástupců léčiv ze skupin periferních myorelaxancií, cholinolytik a cholinomimetik. U některých látek z těchto skupin se kapilární elektroforéza (CE), většinou ve spojení s UV a MS detekcí, ukázala být velmi účinným nástrojem analýzy a má předpoklady konkurovat konvenčně používaným metodám jako jsou HPLC a GC. Mnohé látky s kvarterní amoniovou skupinou, mezi které patří i septonex, však postrádají chromofor nezbytný pro tradiční spektrofotometrické metody detekce. Zde se jeví kapilární elektroforéza s bezkontaktní vodivostní detekcí jako velmi vhodná analytická metoda. Její výraznou výhodou je možnost stanovení sloučenin postrádajících chromofory bez potřeby derivatizace.

Přítomnost kladného náboje u kvarterních amoniových sloučenin může představovat problém pro stanovení pomocí CE. Je známo, že u sloučenin tohoto typu může docházet k silné adsorpci na vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Tento negativní fenomén může být překonán mimo jiné tvorbou komplexů těchto látek s cyklodextriny (CD).

Cílem práce bylo vyvinout spolehlivou a rychlou metodu pro stanovení septonexu v léčivých přípravcích pomocí kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí. Bylo nutné nalézt vhodný cyklodextrin, který by zabránil adsorpci septonexu na vnitřní stěnu kapiláry. Po optimalizaci a validaci metody bylo cílem aplikovat metodu na konkrétní léčivý přípravek s obsahem septonexu. Byl zvolen přípravek Septonex sprej, který je v této době běžně dostupný na trhu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

2.1.1. Úvod a teorie elektromigračních separačních metod

Úvod

Jako elektromigrační separační metody označujeme metody využívající dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. Elektromigrační separační metody se provádějí v prostředí, které obsahuje roztok s nabitými částicemi (elektrolyt) a pevné povrchy (stěny kapiláry), stýkající se s tímto roztokem, které mohou nést elektrické náboje. V takovém systému vznikají elektrické dvojvrstvy a časem dojde k určitému rovnovážnému rozdělení nábojů. Při elektromigračních separačních metodách je na toto prostředí připojeno elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozdělení nábojů a vyvolá jejich pohyb. Při **elektroforéze** se po aplikaci napětí nabitě částičky pohybují k opačně nabitě elektrodě. Při **elektroosmóze** se po aplikaci napětí pohybuje voda v křemenné nebo skleněné kapiláře k záporné elektrodě[1].

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, jelikož nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí[1].

Historie

V roce 1892 bylo publikováno, že anorganické částice v koloidním roztoku pod vlivem elektrického pole nenáhodně putují. Krátce poté byl tento jev popsán i u proteinů ve vodných roztocích. V roce 1948 byl Nobelovou cenou oceněn švédský chemik Arne Tiselius, který ve 30. letech 20. století postavil aparaturu separující proteiny krevního séra na základě jejich elektroforetických pohyblivostí[2].

V polovině 60. let 20. století vznikla elektroforetická metoda kapilární izotachoforéza určená převážně pro analýzu směsi malých iontů, anorganických i organických. V roce 1981 J.W. Jorgenson a K.D. Lukacsová popsali separaci různých iontů zónovou elektroforézou ve velmi tenké skleněné kapiláře s vnitřním průměrem 75 μ m. Účinnost separace v porovnání s velmi rozšířenou kapalinovou chromatografií byla do té doby nevídaná[2].

Elektromigrační separační metody mají celou řadu modifikací, v nichž se může používat jak samotné elektroforézy a její kombinace s elektroosmózou, tak i dalších separačních principů[1]. Zejména podle prostředí, ve kterém dochází k separaci můžeme elektromigrační separační metody rozdělit následovně:

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)

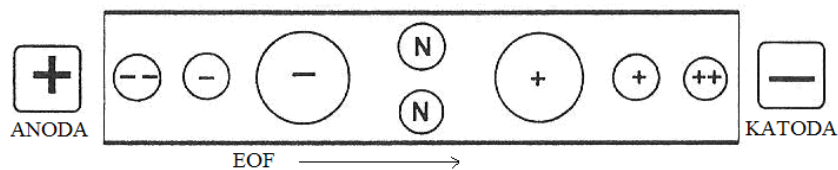
Všechny výše zmíněné elektromigrační separační metody lze zařadit do skupiny kapilární elektroforézy (CE). Vedle metod založených na kapilární elektroforéze lze však provádět elektroforézu v plošném uspořádání. Zde je plošný nosič (papír či gel) napuštěn základním elektrolytem a je umístěn v elektroforetické komoře nasycené parami rozpouštědla. Vzorek, který chceme analyzovat se nanese zpravidla do středu nosiče. Po vložení napětí se oddělí zóny obsahující jednotlivé složky. Zóny se pohybují různou rychlostí. Po ukončení elektroforézy se vyhodnotí polohy zón, které určují druh analytu [1].

Dále se k elektromigračním separačním metodám řadí ještě elektroforéza v plynné fázi.

Elektroforéza

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

Pokud máme směs nabitých látek (kationty a anionty) a vložíme ji mezi nabitě elektrody, kationty budou putovat k záporně nabitě elektrodě (katoda) a anionty budou putovat ke kladně nabitě elektrodě (anoda). Pokud bychom měli ve směsi neutrální molekuly či částice, jejich pohyb by byl nulový. Dále je zřejmé, že částice, které mají větší náboj putují k elektrodě rychleji než částice s menším nábojem. Elektroforeticky lze tedy dělit látky, které mají různý náboj, nebo látky se stejným nábojem, avšak různou velikostí částic. Větší nabitě částice putují pomaleji než menší částice se stejným nábojem, protože musí překonávat větší odpor prostředí[3].



Obrázek 1.: Schematické znázornění principu elektroforézy

Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost (μ_e) určité nabité částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Pokud jsou na začátku separace částice v jednom místě, během separace se dostávají dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost, a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k jejich oddělení[1].

Na nabitou částici s nábojem Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly: elektrická síla F_1 , která ji uvádí do pohybu a odpor viskózního prostředí F_2 , který ji brzdí.

$$\text{Platí tedy vztahy: } F_1 = QE \quad (1)$$

$$F_2 = kv_e \quad (2)$$

Koeficient k závisí na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí η . Je-li v počátečním okamžiku rychlost v_e nulová, částici uvede síla F_1 do zrychleného pohybu. S rostoucí rychlostí v_e se zvětšuje síla F_2 , dokud se nevyrovná síle F_1 . Nastane stacionární stav, ve kterém se nabitě částice pohybují stálou rychlostí. $F_1 = F_2$ (3)

$$\text{Pro elektroforetickou pohyblivost částice platí vztah: } \mu_e = v_e/E = Q/k \quad (4)$$

Pokud máme vedle sebe disociované (nabitě) a nedisociované (nenabitě) molekuly, např. v roztocích slabých elektrolytů, podíl nabitých částic je určen stupněm disociace α . Efektivní elektroforetická pohyblivost je pak dána součinem $\alpha \cdot \mu_e$ [1]. (5)

Důležitým nástrojem v elektroforéze je volba **pH**. Některé analyty existují v dané iontové formě nezávisle na pH, slabé kyseliny a zásady však nikoli. Volbou pH prostředí lze měnit disociaci slabých kyselin a zásad, a tím ovlivňovat separaci těchto látek[3].

Rychlost elektroforetického pohybu částic bude záviset na jejich poměru náboj/hmotnost. Tato rychlost je přímo úměrná elektroforetické pohyblivosti a intenzitě elektrického pole.

Z výše uvedených vztahů lze odvodit:

$$v_e = \mu_e \cdot E = (Q/k) \cdot (V/L) \quad (6)$$

kde $k = 6\pi\eta r$

Vztah pro výpočet rychlosti elektroforetického pohybu je pak následující:

$$v_e = (Q/6\pi\eta r) \cdot (V/L) \quad (7)$$

kde v_e je rychlost elektroforetického pohybu, Q je náboj rozpuštěné látky, η je viskozita elektrolytu, r charakterizuje velikost molekuly, V je vložené napětí a L je celková délka kapiláry[4].

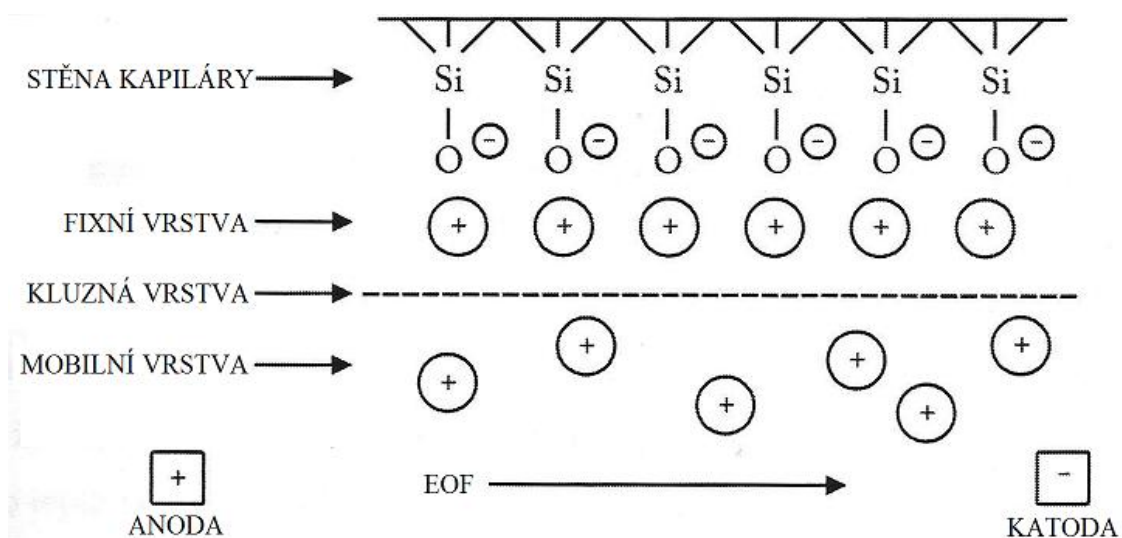
Elektroosmotický tok

Na vnitřním povrchu křemenné kapiláry se stýká kapalný elektrolyt s pevnou stěnou kapiláry. Na velmi tenkém místě styku vzniká elektrická dvojvrstva. Její pevná část je tvořena vnitřní stěnou kapiláry (u křemenné kapiláry skupinami Si-O⁻) a nese plošný záporný elektrický náboj[2].

Na tento záporně nabitý povrch se vážou kationty z elektrolytu a společně vytváří fixní vrstvu (Sternovu vrstvu). Další vrstva kationtů má větší vzdálenost od záporně nabitého povrchu elektrody a tudíž není k tomuto povrchu pevně vázána. Tato vrstva se nazývá mobilní (difuzní) vrstva. Po zavedení napětí začnou kationty mobilní vrstvy putovat ke katodě. Kationty H⁺ bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku k detektoru umístěnému před katodou (Obr.2). Tento jev se nazývá elektroosmóza a tok se označuje jako elektroosmotický tok (ElectroOsmotic Flow – EOF). Po ustavení fixní a mobilní vrstvy vzniká mezi těmito vrstvami nerovnováha, kterou lze vyjádřit zeta potenciálem ζ [1]. Rychlost EOF lze na základě ζ vyjádřit takto:

$$\mu_{EOF} = \varepsilon\zeta E / 4\pi\eta \quad (8)$$

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



Obrázek 2.: Znázornění elektroosmotického toku v křemenné kapiláře

EOF unáší elektrolyt směrem k negativně nabitě elektrodě (katodě) spolu se všemi látkami rozpuštěnými v elektrolytu. Rychlost EOF je obvykle větší než elektroforetická pohyblivost negativně nabitých částic rozpuštěných v elektrolytu, proto jsou i záporně nabitě částice unášeny k detektoru, který je umístěn před katodou. Kationty se pohybují rychleji než EOF, neutrální látky stejně rychle jako EOF a anionty pomaleji než EOF. V tomto příkladu se všechny neutrální molekuly pohybují stejnou rychlostí, která je shodná s rychlostí pohybu EOF a nemohou být od sebe separovány. Neutrální molekuly však mohou být od sebe odděleny použitím micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) (viz kapitola 2.1.3.). Dvě základní výhody existence EOF jsou následující : 1) Anionty i kationty mohou být separovány najednou v jedné analýze. 2) Částice s rozdílnými velikostmi a náboji mohou být analyzovány v rozumném časovém úseku[4].

Na EOF mají vliv následující faktory (Tab.1), jejichž prostřednictvím lze EOF regulovat[5].

Tabulka 1.: Faktory, jimiž lze regulovat EOF

Faktor, který lze měnit	Výsledek	Poznámka
Aplikované napětí	Zvýšením napětí se zvyšuje rychlost EOF, tedy i rychlost migrace analytů, čímž dochází ke zkrácení celkové doby analýzy.	Platí $E=V/L(9)$; V-napětí, L-celková délka kapiláry. Při zvýšení napětí se úměrně zvyšuje i proud $I=U/R(10)$ a tím se zvýší i Joulovo teplo, které má negativní dopad na výsledky analýzy.
pH elektrolytu	Při vzrůstajícím pH roste i EOF, naopak při snižujícím se pH EOF klesá. Při pH okolo 2 již v křemenných kapilárách nedochází k EOF, jelikož je vnitřní povrch kapiláry zcela protonizován (-SiOH).	Nejlepší způsob, jak měnit velikost EOF. Změna pH může měnit náboj či strukturu analytů a s tím i jejich pohyblivost. Často jde o slabé kyseliny či zásady.
Ionizační síla nebo koncentrace elektrolytu	Při stálé teplotě v kapiláře rostoucí iontová síla nebo koncentrace elektrolytu snižuje EOF, protože se snižuje zeta potenciál. Pokud teplota není kontrolována, rostoucí iontová síla nebo koncentrace elektrolytu může způsobit růst EOF, protože roste proud, důsledkem toho teplota a snižuje se viskozita.	Vysoká iontová síla vytváří větší proud a Joulovo teplo. Při nižších koncentracích elektrolytu jsou nižší časy analýzy, nesmí však dojít k takovému snížení, které by vedlo k asymetrii a rozšíření píků, k adsorpci analytu na stěnu kapiláry či k nestabilitám elektrického pole v případě nižší koncentrace elektrolytu než analytu.

Teplota	Se zvýšením teploty dochází ke zvýšení EOF, jelikož dochází ke snížení viskozity elektrolytu.	Se zvýšením teploty se zvyšuje také dielektrická konstanta (viz rovnice 8), změna viskozity je však významnější.
Organická rozpouštědla	Obvykle snižují EOF, záleží však na množství a druhu přidávaného rozpouštědla.	Předpovědět výsledný efekt na EOF po přidání organického rozpouštědla je obtížné, jelikož je ovlivňováno několik veličin najednou, mezi nimi viskozita, dielektrická konstanta a zeta potenciál. Může měnit i selektivitu.
Povrchově aktivní látky	Adsorbují se na stěnu kapiláry pomocí hydrofobních nebo iontových interakcí. Anionické látky mohou zvyšovat EOF, kationické látky mohou obracet nebo snižovat EOF.	Povrchově aktivní látky mohou měnit také selektivitu.
Neutrální hydrofobní polymery	Adsorbují se na kapilární stěnu pomocí hydrofobních interakcí. Snižují EOF odstíněním povrchového náboje a zvýšením viskozity.	

Separáční parametry

Separáční parametry jsou migrační čas, účinnost, selektivita a rozlišení. Každý z těchto separáčních parametrů je ovlivněn jedním či více elektroforetickými parametry zahrnujícími napětí, elektroforetickou pohyblivost, elektroosmotický tok a délku kapiláry. Přehled separáčních parametrů je uveden v Tab.2 [4].

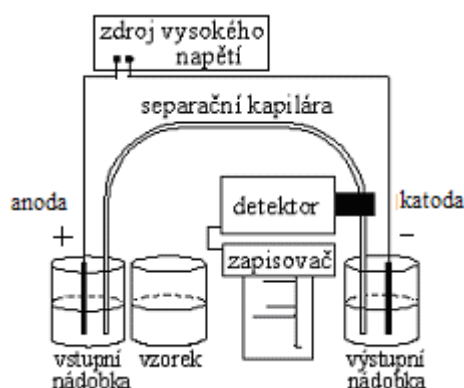
Tabulka 2.: Přehled separačních parametrů

Separací parametr	Rovnice výpočtu	
<p>Migrační čas t_m je čas, po který analyt migruje po dráze odpovídající efektivní délce kapiláry l. Z druhé rovnice uvedené v pravém sloupci vyplývá že vyšší napětí, kratší kapilára a vyšší rychlost EOF znamená kratší migrační čas.</p>	$t_m = l/v_a \quad (11)$ <p>v_a – skutečná rychlost analytu, která se skládá z rychlosti EOF a z jeho vlastní rychlosti. Postupnou úpravou rovnice můžeme vyjádřit migrační čas takto:</p> $t_m = lL/(\mu_a + \mu_{EOF}) \cdot V \quad (12)$ <p>L celková délka kapiláry, μ_a elektroforetická pohyblivost analytu, μ_{EOF} elektroosmotická pohyblivost, V vložené napětí.</p>	[6]
<p>Účinnost N je vyjádřena jako počet teoretických pater. Čím jsou užší píky a čím je vyšší migrační čas, tím je vyšší účinnost.</p>	<p>Účinnost lze vyjádřit pomocí migračního času píku t_m a jeho šířky w měřené u základní linie.</p> $N = 16 (t_m/w^2) \quad (13)$	[4]
<p>Selektivita α je v kapilární elektroforéze definována jako vzdálenost mezi vrcholy přilehlých píků v elektroforeogramu. Selektivita se dá velmi dobře ovlivnit změnou pH.</p>	$\alpha = t_2 - t_m / t_1 - t_m \quad (14)$ <p>α je selektivita, t_1 a t_2 jsou migrační časy dvou píků a t_m je čas neutrálního markeru.</p>	[4]
<p>Rozlišení R je nejdůležitější separační parametr. Říká nám, jak dobře jsou analyty ve směsi od sebe separovány. Je definováno pomocí migračních časů dvou píků a jejich šířek při základní linii.</p>	$R = 2 \cdot ((t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)) \quad (15)$ <p>w_1 a w_2 jsou šířky dvou přilehlých píků, t_1 a t_2 jsou migrační časy dvou píků.</p>	[4]

2.1.2. Princip CZE

Kapilární zónová elektroforéza je jednou z významných elektromigračních metod. Spolu s dalšími patří do skupiny metod, založených na principu kapilární elektroforézy (rozdělení viz kapitola 2.1.1.).

V **kapilární elektroforéze (CE)** máme kapiláru naplněnou základním elektrolytem, který vede proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor. Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforeogram. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu. Kapilární elektroforézu můžeme řídit a získané informace zpracovávat pomocí počítače. Zařízení pro kapilární elektroforézu viz Obr.3[1].

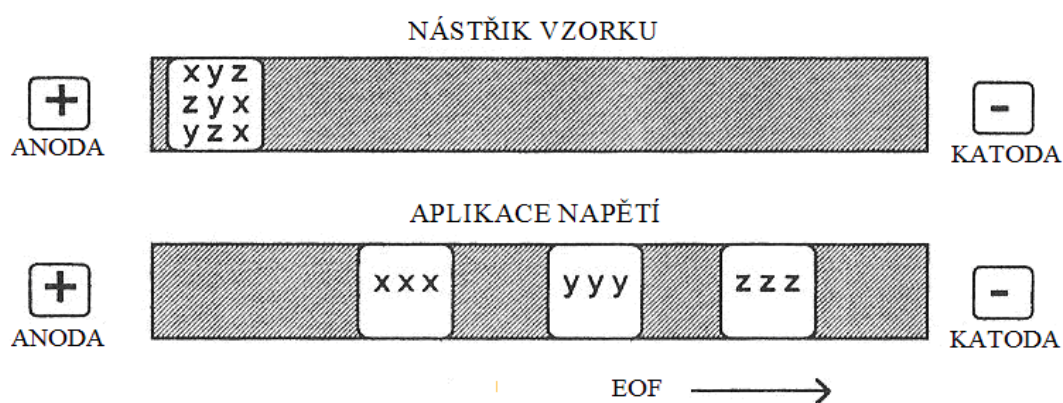


Obrázek 3.: Zařízení pro kapilární elektroforézu [7]

Oproti plošnému uspořádání je doba analýzy v kapiláře kratší a to z několika důvodů. Teplo tvořené uvnitř kapiláry je účinně odváděno jejími stěnami, proto lze použít vysokých napětí. Kapilára prochází detektorem a je prováděna on-line detekce zón a počítačové vyhodnocování píků. Elektroforézu doplňuje elektroosmóza, snižují se analytické časy a k detektoru unáší i částice elektroforeticky migrující opačným směrem (viz kapitola 2.1.1.) elektroosmotický tok[1].

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je rovněž nazývána kapilární elektroforézou ve volném roztoku (FSCE). CZE je nejvíce používaný typ kapilární elektroforézy, v jedné analýze může oddělit kationty i anionty (nikoliv neutrální látky) a je poměrně jednoduchá. V CZE je kapilára plněna elektrolytem, který má stálé složení a

je stejný v počátečním i koncovém zásobníku. Elektrolyt (volný roztok) neinteraguje se složkami analytu, nicméně jsou možné interakce analytu se stěnou kapiláry. Vzorek (analyty ve směsi) je nastříknut do kapiláry, která je naplněna elektrolytem. Po vložení napětí začnou analyty migrovat kapilárou v oddělených zónách v závislosti na svých elektroforetických pohyblivostech. Elektroosmotický tok posouvá analyty kapilárou od anody ke katodě. Pořadí analytů procházejících detektorem, který je umístěn před katodou je následující: kationty, neutrální látky a anionty. Znázornění separace pomocí CZE je na Obr.4[4].



Obrázek 4.: Znázornění separace pomocí CZE s „normálním“ EOF a polaritou

EOF může být u CZE obrácen, detektor je umístěn před anodou a pořadí průchodu analytů detektorem je přesně obrácené než při „normálním“ uspořádání. EOF může být také zcela odstraněn, při „normálním“ uspořádání dorazí k detektoru pouze kationty, anionty putují k anodě a neutrální látky zůstanou v bodě nástřiku vzorku do kapiláry. Pomocí CZE mohou být separovány ionizované sloučeniny rozpustné v elektrolytu. Sloučeniny nerozpustné ve vodě mohou být CZE separovány pomocí nevodných elektrolytů[4].

Analytický systém pro tuto metodu je společný s micelární elektrokinetickou chromatografií. Systém se skládá z kapiláry, která je potažena polymerem jenž zabezpečuje její pružnost a odolnost, ze zdroje stejnosměrného napětí u něhož lze přepínat polaritu. Dále ze dvou zásobníků pro elektrolyt, které jsou ve stejné výšce, aby nedocházelo k efektu spojených nádob, při analýze nežádoucímu. Další částí je detektor (viz kapitola 2.2.), termostatovaný prostor pro kapiláru (teplota ovlivňuje viskozitu a tudíž EOF) a zapisovač (nejčastěji PC)[6].

Roztok vzorku je dávkován do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. **Dávkování** lze provádět dvěma způsoby: hydrodynamicky a elektrokineticky. Hydrodynamické dávkování můžeme dále rozdělit na dávkování tlakem a dávkování rozdílem hladin (zde se využívá princip spojených nádob). Elektrokinetické dávkování je méně používané. Konec kapiláry je ponořen do nádoby s roztokem vzorku a je přivedeno napětí[4].

2.1.3. Další elektromigrační separační metody

Dalšími významnými elektromigračními separačními metodami jsou micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF), kapilární elektrochromatografie (CEC) a kapilární izotachoforéza (CITP). Všechny zde zmiňované metody jsou založené na principu kapilární elektroforézy (viz kapitola 2.1.2) stejně jako CZE a jsou jejími modifikacemi (rozdělení metod viz kapitola 2.1.1.).

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

MECC je hybridní metoda využívající k separaci analytů kombinaci chromatografických a elektroforetických principů. Její realizace je velmi jednoduchá a pomocí této metody lze dělit i neutrální látky. Doplňuje tak CZE, kterou se neutrální látky nedají dělit a je vhodná pro separaci ve vodě nerozpustných sloučenin např. steroidů. Separace se provádí za použití základního elektrolytu, který obsahuje povrchově aktivní látky (surfaktanty-látky, které mají dlouhý alifatický řetězec zakončený skupinou způsobující jeho snadnou rozpustnost ve vodě) v právě takové koncentraci (kritická micelární koncentrace), kdy spolu začnou molekuly povrchově aktivní látky agregovat a vytvářet tak micely. V micelách jsou hydrofilní hlavičky umístěny ve vnější vrstvě a hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro. Jednotlivé analyty interagují ne vazebnou hydrofobní interakcí s jádrem micel a jsou tak více či méně zadržovány při své cestě k detektoru. Micely mohou mít svůj náboj a pak se též pohybují směrem k detektoru nebo proti němu. Často užívané povrchově aktivní látky jsou např. SDS (sodná sůl dodecylsulfonové kyseliny) a CTAB (cetyltrimethylamonium bromid). MECC se provádí ve stejném zařízení jako CZE[1,3].

Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

V CGE je kapilára naplněna roztokem gelu, uplatňuje se zde molekulově síťový efekt, který rozděluje molekuly unášené přes gel k detektoru. Tato metoda se používá zejména pro velké biomolekuly (např. DNA), které mohou mít velmi podobné elektroforetické pohyblivosti, jelikož mají velmi blízký poměr náboje k hmotnosti[1].

Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)

CIEF je užívána pro separaci amfolytů. Při separaci se uplatňuje kromě elektroforetické pohyblivosti iontů i gradient pH prostředí elektrického pole. Amfolyty obsahují kladnou i zápornou skupinu. Jejich molekula může existovat ve formě kladné, záporné i neutrální částice. Na to, v jaké podobě se nachází, má zásadní vliv pH prostředí. Příkladem amfolytů jsou aminokyseliny. Pro prostředí, ve kterém je amfolyt v elektricky neutrální formě, má právě určité pH. Toto pH se rovná izoelektrickému bodu pI příslušného amfolytu. V CIEF je kapilára naplněna pufrů s pH gradientem, který je stálý během separace. Vzorek je dávkován na konec kapiláry s nízkým pH a na tento konec je zapojen kladný pól. Kladně nabití ionty putují podél kapiláry k detektoru. Když složka dosáhne pozice, kde $pI = pH$, stane se nenabitou a zastaví svou migraci. Různé složky si najdou své pozice v kapiláře. Jakmile jsou zóny zaostřeny, je aplikován do kapiláry tlak. Tím je obsah kapiláry posouván přes detektor, který detekuje separované zóny.

Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie kombinuje principy kapilární elektroforézy a vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). V této technice jsou používány náplňové kolony, které jsou rozměry samy o sobě kapilárami, i kapilární kolony, u nichž je stacionární fáze na vnitřním povrchu kapiláry. Pro posun mobilní fáze kolonou není používáno čerpadlo jako v HPLC, ale aplikace stejnosměrného napětí a vyvolání EOF. V koloně nastává separace složek na stejných principech jako v HPLC (separace na normálních fázích, na obrácených fázích, gelová permeační chromatografie nebo iontově výměnná chromatografie). Výhodou separace je EOF, který způsobuje prakticky stejnou rychlost proudění elektrolytu v celém průřezu kapiláry. Nedochozí tak k podstatnému rozmývání zón během separace, což zvyšuje její účinnost[1].

Kapilární izotachoforéza (CITP)

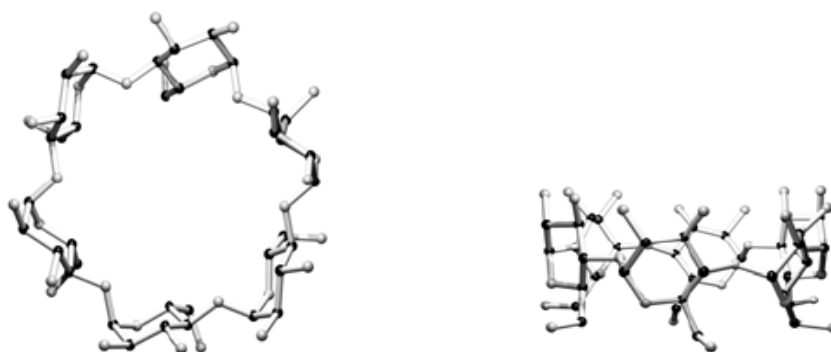
U této metody se vzorek vnáší mezi dva elektrolyty s odlišnou pohyblivostí iontů. Separují se buď jenom kationty, nebo jenom anionty. Vzorek se vnáší mezi vedoucí elektrolyt, jehož ionty mají vyšší pohyblivost a koncový elektrolyt, jehož ionty mají nižší pohyblivost než kterýkoliv iont vzorku. Vedoucí elektrolyt je na začátku izotachoforézy obsažen v katodovém prostoru a v kapiláře, koncový elektrolyt v anodovém prostoru (či naopak). Kromě separovaných iontů jsou vždy obsaženy i opačně nabití protiiionty, aby se zachovala elektroneutralita v zónách. Po připojení stejnosměrného napětí se udržuje konstantní proud a vzorek se začne dělit dle pohyblivostí svých složek. Po jisté době se ustaví stacionární stav. V něm tvoří jednotlivé ionty zóny seřazené za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti. Ve stacionárním stavu se všechny zóny pohybují stejnou a stálou rychlostí. Koncentrace iontu uvnitř zóny je konstantní. V každé zóně je jiný gradient potenciálu, to způsobuje, že se méně pohyblivé ionty ve stacionárním stavu pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější. Na méně pohyblivé ionty působí větší hnací síla. Jednotlivé zóny jsou ve stacionárním stavu velmi ostré, díky samozaostřujícímu efektu[1].

2.1.4. Cyklodextriny

Cyklodextriny byly poprvé izolovány v roce 1891 jako produkty enzymatické degradace škrobu. Od té doby až po 45 letech začaly cyklodextriny přitahovat pozornost chemiků svými neobvyklými schopnostmi inkludovat jiné molekuly uvnitř svých chirálních dutých kavit. Přírozené (nativní) cyklodextriny byly také chemicky modifikovány, aby bylo docíleno lepších komplexačních nebo katalytických vlastností a aby byla zvýšena jejich rozpustnost. Cyklodextriny našly široké uplatnění v průmyslu (kosmetika, farmacie, chemie). Jejich předností je to, že jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů (škrob), jejich toxicita je nízká a jsou biologicky degradabilní[8].

Nativní cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z α -1,4 spojených D-glukopyranosových jednotek. Vznikají enzymatickou degradací škrobu (amylosy) glukosyltransferasami bakteriálního původu (*Bacillus macerans*). Tato biochemická transformace poskytuje směs lineárních a cyklických oligosacharidů, které obsahují šest až přibližně sto glukosových jednotek. Za optimalizovaných podmínek jsou nejvíce zastoupeny makrocykly se šesti, sedmi a osmi jednotkami, které jsou označovány α -, β - respektive γ -cyklodextriny. Tvarem připomíná makrocyklus α -, β - a γ -cyklodextrinů

dutý kornout. Vnější část kavity je hydrofilní, zatímco vnitřek má lipofilní charakter. Trubičkové znázornění krystalové struktury α -cyklodextrinu-viz Obr.5[8].



Obrázek 5.: Trubičkové znázornění krystalové struktury α -cyklodextrinu

Velkou pozornost přitahují cyklodextriny díky své schopnosti tvořit inkluzní komplexy. Do kavity cyklodextrinu (hostitel) mohou být inkludovány organické nebo anorganické molekuly (host). Vhodnou modifikací cyklodextrinu lze významně ovlivnit výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti komplexu, např. zvýšit jeho rozpustnost[8].

V CE se cyklodextriny používají jako chirální selektory. Principem separace je různá afinita jednotlivých optických izomerů k vnitřnímu prostředí kavity chirálního selektoru, proto je možné od sebe optické izomery oddělit[3].

Septonex je povrchově aktivní látka (více o struktuře a vlastnostech viz kapitola 2.3.1), která se skládá z hydrofilní kladně nabitě části, kterou tvoří kvarterní amin a z dlouhého hydrofobního uhlíkatého řetězce. U látek s takovou strukturou se dlouhé hydrofobní konce molekul vzájemně přitahují a látky vytvářejí dvojvrstvy, kde jsou hydrofilní nabitě části molekuly na povrchu a hydrofobní části uvnitř dvojvrstvy. Totéž se děje i při dosažení kritické koncentrace micel. V elektroforetické kapiláře se dá tento jev využít k obrácení směru toku, kdy se kladně nabitá dvojvrstva naváže na záporně nabitou stěnu kapiláry a změní tak náboj kapilární stěny. V této práci je však septonex analyzovanou látkou a tvorba dvojvrstvy i interakce se stěnou kapiláry jsou zde nežádoucí. Z tohoto důvodu se do elektrolytu přidává cyklodextrin, který se septonexem vytváří komplex. V tomto komplexu je dlouhý hydrofobní řetězec septonexu zasunut do hydrofobní dutiny molekuly cyklodextrinu. Molekula cyklodextrinu tak brání shlukování molekul septonexu, následné tvorbě dvojvrstvy a vazbě na kapilární stěnu.

2.2. BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE

2.2.1. Způsoby detekce používané u CZE

Detektory u CZE musí být velmi citlivé, protože průměr kapiláry je malý. Nejpoužívanější způsob detekce je založen na průchodu **ultrafialového nebo viditelného záření (UV/VIS)** přes kapiláru a následném vyhodnocení absorbovaného záření analytem v kapiláře. Drtivá většina analyzovaných látek je schopna absorbovat záření v UV nebo viditelné oblasti spektra. Záznam (elektroforeogram) je tedy závislost absorbance při dané vlnové délce na čase. Platí Lambertův-Beerův zákon o absorbanci:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (16)$$

kde ε je molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce), c látková koncentrace, l tloušťka absorbující vrstvy [1,3].

Při použití UV/VIS detekce u CZE je nevýhodou velmi krátká absorpční dráha, která snižuje citlivost detekce. UV detekce může být prováděna jako detekce přímá nebo nepřímá. Přímá detekce se používá pro látky, které absorbují v UV oblasti a do elektroforeogramu se zapisuje přímo závislost absorbance na čase při určité vlnové délce. Nepřímá detekce se používá pro látky, které neabsorbují v UV oblasti. Při tomto způsobu detekce je v elektrolytu obsažena látka, která absorbuje v UV oblasti, při průchodu analytu detekčním okénkem dojde k naředění absorbujícího elektrolytu a absorbance se sníží [6].

Dalším velmi často používaným způsobem detekce u CZE je **detekce vodivostní**, podrobný popis - viz kapitola 2.2.2. V CZE se též používá detekce založená na **fluorescenci, laserem indukované fluorescenci** a **hmotnostní spektrometrii (MS)**. Dá se zde použít i detekce **amperometrická**, případně i radiometrická či refraktometrická[4].

Přehled nejčastěji používaných způsobů detekce v CZE je shrnut v Tab.3[5].

Tabulka 3.: Přehled nejčastěji používaných způsobů detekce v CZE

Druh detekce	Hmotnostní detekční limit (mol)	Koncentrační detekční limit (mol/l)	Výhody/nevýhody
UV-VIS	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$	Univerzální, diode array nabízí spektrální informace
Vodivost	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$	Univerzální, citlivý
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	Citlivý, obvykle vyžaduje derivatizaci
Laserem indukovaná fluorescence	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-14} - 10^{-16}$	Extrémně citlivý, obvykle vyžaduje derivatizaci, drahý
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	Citlivý, selektivní ale hodí se jen pro elektroaktivní látky
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	Citlivý a nabízí strukturální informace
Nepřímá UV, fluorescence a amperometrie	10 – 100 krát vyšší koncentrace než u přímé metody		Univerzální, nižší citlivost než u přímých metod

2.2.2. Bezkontaktní vodivostní detekce

Vodivostní detektory pro kapilární elektroforézu jsou založené buď na galvanickém kontaktu (kontaktní detektory), nebo pracují v bezkontaktním režimu (bezkontaktní detektory)[8].

U kontaktního vodivostního detektoru jsou elektrody v přímém kontaktu s elektrolytem. Nevýhodou je, že může docházet k elektrochemickým interakcím mezi elektrodami a elektrolytem, případně analytem, což způsobuje nereprodukovatelnosti[6].

Bezkontaktní vodivostní detekce (CCD) je metoda, kdy nejsou elektrody v přímém kontaktu s elektrolytem. Jde o dvě elektrody mezi nimiž je mezera, která vytváří detekční celou. Ze vztahu $I = G.U$ (17) vyplývá, že bude-li vloženo napětí U

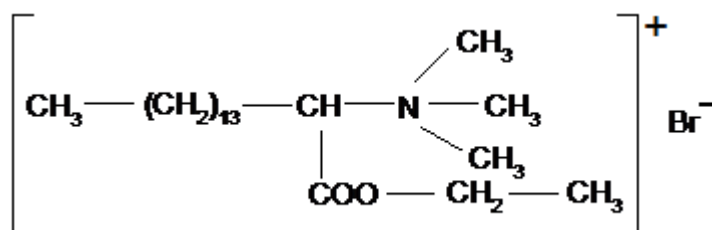
konstantní, tak měřením proudu I můžeme zjistit změny vodivosti G . Na excitační elektrodu je připojen střídavý proud, který protéká detekční celou a je snímán na druhé elektrodě. Pak je veden do zesilovače a měřen. Při změně obsahu detekční cely dochází ke změně její vodivosti, což se projeví změnou měřeného proudu. CCD se používá často pro látky, které nemají chromofor a mají vodivost odlišnou od elektrolytu. Analýzu lze provést v přímém (analyt má větší vodivost než elektrolyt) i nepřímém režimu[6].

Hlavní výhodou CCD detekce oproti UV je vyšší citlivost v případě, kdy molekula analytu obsahuje málo absorbující chromofor. Kapilární elektroforéza v kombinaci s CCD detekcí nabízí možnost stanovení sloučenin postrádajících chromofory bez potřeby derivatizace, jako je tomu např. u stanovení septonexu, kterým se zabývá tato práce.

2.3. SEPTONEX

2.3.1. Základní údaje

Septonex (carbethopendeciniu bromidum) je kvarterní amoniová sůl a je řazen mezi povrchově aktivní látky (strukturní vzorec viz Obr.6). Jde o bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek, jehož vodný roztok při třepání silně pění. Je snadno rozpustný ve vodě, 96% ethanolu a v chloroformu[9].



Obrázek 6.: Septonex (Carbethopendeciniu bromidum)
(1-(ethoxykarbonyl)pentadecyltrimethylamoniumbromid)

Septonex má antimikrobní, antiseptické a dezinfekční účinky. Je hlavní účinnou látkou či doplňkovou látkou několika léčivých přípravků dostupných v této době na trhu v ČR a SR. Jako hlavní účinná látka je septonex obsažen v přípravcích: dezinfekční sprej Septonex a Septonex plus, mast Septonex, oční kapky a oční mast Ophthalmoseptonex, nosní kapky Mukoseptonex a Mukoseptonex E. Ve veterinárních léčivých

přípravcích je septonex obsažen v přípravcích Septonex sprej ad us. vet. a Otibiovin ad us. vet. Dále se septonex přidává do léčivých přípravků s jinou hlavní účinnou látkou jako dezinfekční a antimikrobní přísada. Jedná se o přípravky Mesocain (anestetikum a antiseptikum) a Triamcinolon-Ivax (dermakologikum, kortikoidní hormonální přípravek)[10].

2.3.2. Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamika:

Septonex patří mezi kvarterní amoniové soli s mírným antiseptickým účinkem. Má baktericidní vlastnosti, neboť vyvolává změny v permeabilitě buněčné membrány bakterií. Má výraznější baktericidní účinek na gram-pozitivní bakterie než na gram-negativní bakterie. Některé druhy bakterií jako Pseudomonas a Mykobakterium tuberculosis zůstávají rezistentní. Není účinný na spóry. Má variabilní antifungální aktivitu a je účinný proti některým virům. Účinnost kvarterních amoniových solí je největší v neutrálních nebo slabě alkalických roztocích. Baktericidní účinek klesá s klesajícím pH (kyselá média). Jejich účinnost naopak zvyšuje alkohol[10].

Farmakokinetika:

Ophthamo-Septonex oční mast - septonex působí jako povrchově aktivní látka jen v místě podání. U ostatních lékových forem přípravků obsahujících septonex je uvedeno, že farmakokinetické vlastnosti nejsou známy[10].

Dávkování:

Různé, závisí na lékové formě přípravku, ve kterém je septonex obsažen[10].

Kontraindikace a nežádoucí účinky:

Zejména přecitlivělost a alergická reakce na septonex. Opět závisí na lékové formě přípravku[10].

2.3.3. Možnosti stanovení septonexu

V českém lékopisu je metoda pro stanovení septonexu jako substance uvedena v národní části. Nejprve se provede zkouška na ztrátu sušením, kdy nejvýše 1,0 %, 1,000 g se suší v sušárně při 100°C až 105°C. Vysušená látka se použije ke stanovení obsahu. Stanovení obsahu probíhá následovně: 0,3000 g vysušené látky ze zkoušky Ztráta sušením se rozpustí ve 20 ml kyseliny octové bezvodé R, přidá se 6 ml octanu rtuťnatého RS a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za použití violeti

krystalové RS jako indikátoru do změny fialového zbarvení na modré. 1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 42,25 mg $C_{21}H_{44}BrNO_2$ [9].

V evropském ani v americkém lékopisu není septonex uveden. Předpokládám, že se nepoužívá v léčivých přípravcích jako účinná látka a je nahrazen látkami s podobným účinkem.

Společnost RECMAN (laboratorní technika Ostrava) vyrábí a dodává analyzátor IONOSEP, který pracuje na principu CITP nebo CZE. Na izotachoforetickém analyzátoru IONOSEP 2001, 2003 je možné stanovit obsah septonexu v léčivých přípravcích. Při stanoveních septonexu ve vzorcích Mesosept spray, Septonex spray, Septonex Colour Spray se do 100 ml baňky odváží 100-250 mg vzorku. Analyzuje se roztok po doplnění po značku methanolem. U vzorků s vyšším obsahem sodíku, příp. efedrinu (Mukoseptonex, Mukoseptonex E) je vhodná předúprava vzorku metodou extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction).

Podmínky analýzy: vedoucí elektrolyt: 10 mM octan amonný + 10 mM kyselina octová v 99% methanolu, koncový elektrolyt: 10 mM $MgCl_2$ v 99% methanolu, hnačí proud: počáteční 50 μA , koncový 20 μA , doba analýzy: 15 minut, mód analýzy: kationtový[11].

Na stejném analyzátoru (jde opět o izotachoforézu) je možné stanovit účinnou látku septonex v přípravcích Septonex spray, Ophthalmo-Septonex oční kapky a Mukoseptonex případně Mukoseptonex E nosní kapky. Pro zvýšení přesnosti stanovení lze použít metodu vnitřního standardu. Jako vnitřní standard jsou použity ionty Li^+ (citronan lithný). Nejprve se připraví vnitřní standard a upravený methanol. Poté se upraví vzorek. U vzorků s vyšším obsahem sodíku, příp. efedrinu (Mukoseptonex, Mukoseptonex E) je opět vhodná předúprava vzorku metodou extrakce tuhou fází .

Podmínky analýzy: vedoucí elektrolyt: 10 mM kyselina octová + 10 mM octan amonný v 50% methanolu, koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová v 50% methanolu, hnačí proud: počáteční 60 μA , koncový 20 μA , doba analýzy: 35 minut, mód analýzy: kationtový[12].

Koula a kol. použil pro stanovení septonexu metodu založenou na extrakci iontových párů ve spojení s diferenční pulzní polarografií. Tato metoda je vhodná pro stanovení organických bazí nebo kvarterních amoniových sloučenin v koncentracích až 10^{-7} mol/l. Jako vhodný polarograficky aktivní párový iont byl použit Orange II (4-[2-hydroxy-1-naphthyl]azobenzenesulfonová kyselina). Tato metoda byla použita jak

pro stanovení septonexu, tak pro stanovení tetrapentylammoniumbromidu a kodeinu[13].

Kopecký a kol. použil potenciometrii ke studiu inkluzních komplexů septonexu s α - a β -cyklodextriny. Dále pak s modifikovanými cyklodextriny, jmenovitě hydroxypropyl- α -cyklodextrinem, methyl- β -cyklodextrinem a hydroxypropyl- β -cyklodextrinem[14].

Septonex patří (jak již bylo zmíněno výše) mezi povrchově aktivní látky. V řadě analytických metod povrchově aktivní látky příznivě ovlivňují měřené parametry, čehož se hojně využívá[15].

Jednou z hlavních oblastí aplikace povrchově aktivních látek je spektrofotometrie. Němcová a kol. provedla spektrofotometrické stanovení hlinitých a fluoridových iontů s brompyrogallem v přítomnosti septonexu[16]. Dakiky a kol. zjišťoval spektrofotometricky vliv septonexu, Tritonu X 100 a SDS na agregaci, acidobazické vlastnosti a optické vlastnosti 2-hydroxy-5-nitrofenylazo-4-[3-methyl-1-(4“sulfofenyl)-5-pyrazolonu][17].

Dále se povrchově aktivní látky využívají ve spektrofluorimetrii, atomové absorpční spektrometrii, chromatografii a elektrochemických metodách. Švancara a kol. provedl voltmetrické stanovení chromu na uhlíkové pastové elektrodě modifikované septonexem a dalšími povrchově aktivními látkami[18]. Galík a kol. se zabýval vývojem metody pro stanovení osmia pomocí uhlíkové pastové elektrody modifikované septonexem a cetyltrimethylamoniumbromidem[19].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1.1. Chemikálie

- Septonex (Carbethopendecinii bromidum) šarže 3196/1, RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany, Česká republika, Mr = 422,49 g/mol
- MES – 2-morpholinoethansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 195,20 g/mol
- TRIZMA BASE (TRIS) – Tris[hydroxymethyl]aminomethan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 121,1 g/mol
- Kyselina octová, Fluka, USA, Mr = 60,05 g/mol
- Kyselina fosforečná 85% p.a., MERCK, Německo, Mr = 97,99 g/mol
- HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich, USA, Mr = 238,31 g/mol
- TAPSO – 3-N-tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-hydroxypropansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich, USA, Mr = 259,28 g/mol
- MOPSO – 3-morfolin-2-hydroxypropansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 225,3 g/mol
- BES – N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 213,2 g/mol
- α -cyclodextrin, Fluka, Německo, Mr = 972,86 g/mol
- β -cyclodextrin, Fluka, Německo, Mr = 1135,00 g/mol
- γ -cyclodextrin hydrát, Fluka, Německo, Mr = 1297,15 g/mol
- (2-hydroxypropyl)- α -cyclodextrin, Fluka Chemie GmbH, Německo, Mr = 1180 g/mol
- (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 1380,00 g/mol
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin, Fluka Chemie GmbH, Německo, Mr = 1580 g/mol
- 2,6-di-o-methyl- β -cyclodextrin, Fluka, Německo, Mr = 1331,39 g/mol
- Sulfát- β -cyclodextrin, Aldrich, USA, Mr = 2816,31 g/mol
- Succinyl - β -cyclodextrin, Fluka, Německo, Mr = 1833,52 g/mol
- Cetyltrimethylamoniumbromid, Aldrich, Německo, Mr = 364,46 g/mol

- Tetrabutylamoniumjodid, MERCK, Německo, Mr = 369,38 g/mol
- Tetramethylamoniumjodid, Lachema, Česká republika, Mr = 201,051 g/mol
- Fenyiltrimethylamoniumjodid, Lachema, Česká republika, Mr = 263,123 g/mol
- Tetraethylamoniumjodid, Lachema, Česká republika, Mr = 257,17 g/mol
- Síran lithný hydrát, Lachema, Česká republika, Mr = 127,95 g/mol
- Ethanolamin, Aldrich Chemical Company, USA, Mr = 61,08 g/mol
- N,N-dimethylethanolamin, Aldrich Chemical Company, USA, Mr = 89,14 g/mol
- Hydroxid sodný, Lachema, Česká republika, Mr = 39,99 g/mol
- Kyselina fosforečná 0,1%, MERCK, Německo, Mr = 97,99 g/mol
- Chlorid sodný, Penta, Česká republika, Mr = 58,44 g/mol
- Methanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, Mr = 32,04 g/mol
- Ultračistá voda – produkována systémem Milli-Q-Systém (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Septonex sprej 45ml, IVAX Pharmaceuticals s.r.o., Česká republika

3.1.2. Příprava roztoků

Příprava elektrolytu

Elektrolyt byl připraven navážením potřebného množství MESu, který byl rozpuštěn v příslušném množství ultračisté vody. V tomto roztoku bylo upraveno pH roztokem 20mM TRISu pomocí pH metru. TRIS byl připraven navážením potřebného množství chemikálie a rozpuštěním tohoto množství v přesném objemu ultračisté vody. Roztok MESu s upraveným pH byl doplněn v odměrné baňce ultračistou vodou na požadovaný objem. Takto vzniklým roztokem se doplnilo v odměrné baňce příslušné množství cyklodextrinu ((2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu) a vzniklý elektrolyt byl přefiltrován 0,45 μ m nylonovým filtrem (Tecknokroma), odplyněn na ultrazvukové lázni (3 min) a použit k analýze.

Příprava roztoků standardů

Jako standardní roztok byl použit roztok septonexu. Navážením potřebného množství septonexu a rozpuštěním tohoto množství v daném objemu ultračisté vody byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml septonexu. Jako vnitřní standard byl použit roztok N,N-dimethylethanolaminu. Odpipetováním potřebného množství

N,N-dimethylethanolaminu a doplněním ultračistou vodou na patřičný objem byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1mg/ml N,N-dimethylethanolaminu. Z těchto zásobních roztoků byly vždy naředěním připraveny potřebné koncentrace roztoků standardů použitých k analýze.

Roztoky pro optimalizaci metody

Pro optimalizaci koncentrace elektrolytu bylo připraveno sedm roztoků elektrolytu s rozdílnou koncentrací MESu následujícím způsobem: bylo vypočteno sedm různých navážek MESu a navážená množství byla rozpuštěna v ultračisté vodě. Po úpravě pH TRISem o koncentraci 20mM byly roztoky doplněny v odměrných baňkách po rysku. Takto vzniklé roztoky byly doplněny odměrné baňky s roztokem cyklodextrinu ((2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin) o koncentraci 15mg/ml. Koncentrační řada vzniklých elektrolytů byla: 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM a 60mM. Všechny elektrolyty byly před analýzou přefiltrovány 0,45 μ m nylonovým filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 3 minut.

Pro optimalizaci pH elektrolytu bylo připraveno šest roztoků MESu o optimální koncentraci (viz kapitola 4.2.1). U těchto roztoků bylo upraveno pH 20mM TRISem v rozmezí 5,0-7,0. Řada zahrnovala tyto hodnoty pH: 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0. Jednotlivými roztoky byly doplněny odměrné baňky s cyklodextrinem ((2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinem) o koncentraci 15mg/ml. Před analýzou byly všechny elektrolyty přefiltrovány 0,45 μ m nylonovým filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 3 minut.

Pro optimalizaci koncentrace cyklodextrinu ((2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu) bylo připraveno osm roztoků elektrolytů o optimální koncentraci MESu a optimálním pH (viz kapitola 4.2.1.) s různou koncentrací cyklodextrinu v rozmezí 2,5mg/ml – 20mg/ml po 2,5mg/ml. Před analýzou byly všechny elektrolyty přefiltrovány 0,45 μ m nylonovým filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 3 minut.

Roztoky pro stanovení linearit

Roztoky pro stanovení linearit byly připraveny ředěním ze zásobního roztoku septonexu o koncentraci 1mg/ml na koncentrace 75-300 μ g/ml septonexu. IS (N,N-dimethylethanolamin) byl připraven naředěním zásobního roztoku o koncentraci 1mg/ml na koncentraci 200 μ g/ml. Jednotlivé objemy pipetované ze zásobních roztoků septonexu a IS do 10ml odměrných baněk pro přípravu jednotlivých roztoků pro

stanovení linearity jsou uvedeny v Tab.4. Elektrolyty byly přefiltrovány 0,45 μ m nylonový filtrem a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 3 minut.

Tabulka 4.: Ředění zásobních roztoků pro stanovení linearity

	septonex konc. μ g/ml	septonex ml roztoku	N,N-dimethyleth.amin konc. μ g/ml	N,N-dimethyleth.amin ml roztoku
1	75	0,75	200	2,00
2	100	1,00	200	2,00
3	150	1,50	200	2,00
4	200	2,00	200	2,00
5	300	3,00	200	2,00

3.2. VÝBĚR ELEKTROLYTU, CYKLODEXTRINU A VNITŘNÍHO STANDARDU

3.2.1. Výběr elektrolytu

Bylo vyzkoušeno několik elektrolytů různého složení s cílem najít vhodný elektrolyt pro metodu stanovení septonexu. Všechny elektrolyty byly zkoušeny při napětí 30kV, v případě obrácené polaroty -30kV. Byly testovány následující elektrolyty:

- Acetát pH = 5,2, C = 30mM, bez přídavku cyklodextrinu
- Acetát pH = 5,2, C = 30mM, s přídavkem β -cyklodextrinu a obrácenou polaritou
- Fosfát pH = 2,5, C = 25mM, bez přídavku cyklodextrinu
- Fosfát pH = 7,0, C = 25mM, bez přídavku cyklodextrinu
- Fosfát pH = 7,0, C = 25mM, s přídavkem α -cyklodextrinu
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem β -cyklodextrinu
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem γ -cyklodextrinu
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α , β , γ –cyklodextrinu (vždy přídavek jen jednoho z cyklodextrinů) a s obrácenou polaritou
- HEPES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu

- TAPSO pH = 7,0, C = 50mM, s přidavkem α -cyklodextrinu
- MOPSO pH = 7,0, C = 50mM, s přidavkem α -cyklodextrinu
- BES pH = 7,0, C = 50mM, s přidavkem α -cyklodextrinu

3.2.2. Výběr cyklodextrinu

Cyklodextriny mají cyklický tvar a do své dutiny mohou vázat molekuly jiných látek, čímž ovlivňují rychlost migrace daných látek a jejich afinitu ke stěně kapiláry. Při hledání vhodného cyklodextrinu byl použit elektrolyt MES (50mM) pH 7,0 upravený TRISem (20mM). Všechna měření proběhla při napětí 30kV. Byly zkoušeny následující cyklodextriny:

- α -cyklodextrin
- β - cyklodextrin
- γ - cyklodextrin
- 2,6-di-o-methyl- β -cyklodextrin
- (2-hydroxypropyl)- α -cyklodextrin
- (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin
- Sulfát- β -cyklodextrin
- Succinyl - β -cyklodextrin

3.2.3. Výběr vnitřního standardu (IS)

Vnitřní standard byl vybírán na základě podobných vlastností se septonexem. Bylo potřeba, aby vnitřní standard při koncentraci podobné koncentraci analytu vykazoval přibližně stejnou odezvu detektoru a aby se jeho migrační čas dostatečně lišil od migračního času septonexu. Všechna měření byla prováděna s elektrolytem MES (50mM) pH 7,0 upravené TRISem (20mM) a s (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinem při napětí 30kV. Byly zkoušeny následující látky:

- a) Kvarterní amoniové soli
 - Cetyltrimethylamoniumbromid
 - Tetrabutylamoniumjodid
 - Tetramethylamoniumjodid
 - Fenyltrimethylamoniumjodid
 - Tetraethylamoniumjodid

b) Malé organické sloučeniny typu aminu

- Ethanolamin
- N,N-dimethylethanolamin

c) Anorganické sloučeniny

- Síran lithný

3.3. PŘÍSTROJE

Všechny analýzy byly prováděny na elektroforetickém systému PrinCE 650 (PrinCE Technologies B.V., Nizozemí) vybaveným Lambda 1010 UV-VIS detektorem (Leonberg, Německo) a bezkontaktním vodivostním detektorem TraceDec® (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Rakousko). Ovládání analyzátoru bylo zajištěno systémem WinPrinCE, který byl integrován v systému DAX (software pro získávání a analýzu dat). K měření pH elektrolytů byl použit pH metr PHM 220 (Radiometer, Francie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, kalibrovanou na standardní pufrů. K odplyňování roztoků byl použit ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo). K přípravě roztoků byly použity automatické pipety (Brand) s rozsahy 10-100 μ m, 100-1000 μ m, 1-10ml a 0,5-5ml.

3.4. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY

3.4.1. Pracovní postup

Na začátku měření byl vždy nejprve uveden do chodu počítač a elektroforetický systém a to v následujícím pořadí: počítač, UV detektor, analyzátor, program DAX a bezkontaktní vodivostní detektor. Vždy po skončení měření byl systém vypnut v přesně obráceném pořadí.

Pro analýzu byla použita kapilára o vnitřním průměru 50 μ m, celkové délky 75cm a efektivní délky 45cm. Před prvním použitím byla kapilára promyta methanolem 5 minut, vodou 3 minuty, 0,1% roztokem H₃PO₄ 20 minut, vodou 3 minuty, 1M roztokem NaOH 30 minut, vodou 30 minut, všechny kroky při tlaku 750mbar. Denně byla kapilára před první analýzou promyta 10 minut 0,1M roztokem NaOH a 10 minut vodou

při tlaku 1000mbar a po poslední analýze 10 minut 0,1% roztokem H₃PO₄, 10 minut 0,1M roztokem NaOH a 10 minut vodou, vše při tlaku 1000mbar. Před každou analýzou byla kapilára promyta 0,1% roztokem H₃PO₄ 3 minuty, což zajistilo vyčištění kapiláry od cyklodextrinů, dále byla kondicionována 0,1M roztokem NaOH po dobu 4 minut a nakonec promyta elektrolytem 4 minuty, vše při tlaku 1000mbar. Všechny roztoky použité k promývání kapiláry byly před použitím přefiltrovány 0,45μm nylonovým filtrem do zásobníků a odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

Pro každou analýzu byly použity tři zásobníky elektrolytů, z nichž jeden byl určen na promývání kapiláry, druhý jako vstupní a třetí jako výstupní zásobník pro analýzu. Jedna sada roztoků elektrolytů byla používána na šest analýz. Nástřík roztoku vzorku (standardů) probíhal hydrodynamicky tlakem 50mbar po dobu 6 sekund (po optimalizaci doby nástřiku 15 sekund viz kapitola 4.2.2). Kapilára byla uschována v cele temperované vzduchem na 25°C.

CCD detektor byl nastaven takto: Gain 50%, Voltage -18db, Offset 0.

3.4.2. Linearita a opakovatelnost metody

Linearita byla stanovena v rozsahu koncentrací 75μg/ml – 300μg/ml pro septonex s obsahem 200μg/ml N,N–dimethylethanolaminu jako IS. Každý vzorek byl nastříknut dvakrát za optimálních podmínek. Plochy analytu byly korigovány časem a plochou IS podle následujícího vzorce:

$$A = \frac{A_a}{t_a} : \frac{A_{IS}}{t_{IS}} \quad (18)$$

kde A je výsledná plocha, A_a je plocha analytu, A_{IS} je plocha vnitřního standardu, t_a je migrační čas analytu a t_{IS} je migrační čas vnitřního standardu. Výsledky byly zpracovány metodou lineární regrese a byla určena závislost plochy píku na koncentraci septonexu.

Opakovatelnost byla stanovena na dvou rozdílných koncentracích septonexu: 75μg/ml a 150μg/ml. Každá koncentrace byla analyzována šestkrát. Roztoky vzorku a IS byly ředěny ze zásobních roztoků. Taktéž byl připraven zásobní roztok elektrolytu, z kterého se elektrolyt filtroval do jednotlivých zásobníků. Jedna trojice zásobníků s elektrolytem byla použita maximálně pro šest analýz.

RSD – relativní směrodatná odchylka je definována jako směrodatná odchylka (SD) dělená průměrem hodnot. Směrodatná odchylka se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (19)$$

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

3.4.3. Stanovení obsahu septonexu v přípravku

Pro stanovení obsahu septonexu byl vybrán přípravek Septonex sprej od firmy IVAX. Ze dvou na sobě nezávislých pipetáží stejného objemu roztoku přípravku byly připraveny dva vzorky. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Vzorky přípravku měly přibližnou koncentraci 150 μ g/ml stejně jako vzorek standardu, který byl rovněž analyzován třikrát. Do všech tří vzorků byl přidán IS o koncentraci 200 μ g/ml. Přepočet koncentrace byl prováděn podle následujícího vzorce:

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \cdot C_{st} \quad (20)$$

kde A_{vz} je průměr ploch vzorku, A_{st} je průměr ploch standardu, C_{vz} je koncentrace vzorku a C_{st} je koncentrace standardu. Po korekci ploch IS byl výpočet proveden podle následujícího vzorce:

$$C_{vz} = \frac{\frac{A_{vz}}{A_{IS_{vz}}}}{\frac{A_{st}}{A_{IS_{st}}}} \cdot C_{st} \quad (21)$$

kde A_{vz} je průměr ploch vzorku, A_{st} je průměr ploch standardu, $A_{IS_{vz}}$ je průměr ploch vnitřního standardu ve vzorku, $A_{IS_{st}}$ je průměr ploch vnitřního standardu ve vzorku standardu, C_{vz} je koncentrace vzorku a C_{st} je koncentrace standardu.

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

Elektroforeogramy standardu septonexu + IS a přípravku Septonex sprej + IS, obojí za optimálních podmínek, jsou pro porovnání uvedeny v kapitole 8.1. Obr.13 a 14.

Správnost metody byla ověřena tak, že byly připraveny dva vzorky stejným způsobem jako pro stanovení obsahu septonexu v přípravku (viz výše) a k nim bylo přidáno přesné množství standardu septonexu o koncentraci 150,405 μ g/ml. Oba vzorky byly analyzovány třikrát. Správnost byla vypočítána podle vzorce:

$$R(\%) = \frac{c_1 - c_0}{c_{st}} \quad (22)$$

kde c_1 je koncentrace vzorku vzniklého přidavkem standardu, c_0 je průměrná nalezená koncentrace septonexu v přípravku a c_{st} je koncentrace přidavku standardu.

3.4.4. Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce (LOD) je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být zaznamenána, ale ne nezbytně kvantifikována. Limit kvantifikace (LOQ) vyjadřuje nejmenší stanovitelné množství analytu ve vzorku, je dán nejmenší plochou píku, která může být ještě změřena s požadovanou přesností. LOD a LOQ byl stanoven na základě poměru signálu k šumu S/N, pro LOD $S/N = 3$ a pro LOQ $S/N = 10$ a potvrzen experimentálně.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. VÝBĚR ELEKTROLYTU, CYKLODEXTRINU A VNITŘNÍHO STANDARDU

V této kapitole jsou uvedeny tabulky parametrů pro srovnání jednotlivých elektrolytů, cyklodextrinů a IS. Jednotlivé parametry byly vypočítány v softwaru DAX a jsou definovány následovně:

- rozlišení

$$R = \frac{t_{top_p} - t_{top_{pp}}}{\frac{w_p + w_{pp}}{2}} \quad (23)$$

kde R je rozlišení, t_{top_p} je migrační čas odpovídající vrcholu sledovaného píku, $t_{top_{pp}}$ je migrační čas odpovídající vrcholu píku, který je před sledovaným píkem, w_p je šířka sledovaného píku při základní linii a w_{pp} je šířka při základní linii u píku, který je před sledovaným píkem.

- poměr signálu k šumu

$$S/N = \text{hodnota signálu ve vrcholu píku} / \text{hladina šumu RMS} \quad (24)$$

kde S/N je poměr signálu k šumu, RMS je hladina šumu [21].

- počet teoretických pater

$$N = 5,54 \frac{t_{top}^2}{w_{1/2h}} \quad (25)$$

kde N je počet teoretických pater, t_{top} je migrační čas odpovídající vrcholu píku a $w_{1/2h}$ je šířka píku v polovině výšky píku.

- asymetrie

Asymetrie píku je definována jako šířka pravé strany píku dělená šířkou levé strany píku v 10% výšky píku.

V elektroforeogramech byl před analyzovanými látkami vždy přítomen neznámý pík. Tento pík byl obsažen i v blanku (viz kapitola 8.1. Obr.15). Bylo zjištěno, že tento pík tvoří sodné ionty (viz kapitola 8.1. Obr.16), které jsou zřejmě součástí používané vody a nijak neruší stanovení septonexu.

4.1.1. Výběr elektrolytu

Výsledky zkoušených elektrolytů uvedených v kapitole 3.2.1. jsou následující:

- Acetát pH = 5,2, C = 30mM, bez přídavku cyklodextrinu – bez separace
- Acetát pH = 5,2, C = 30mM, s přídavkem β -cyklodextrinu a obrácenou polaritou – nedocházelo k separaci
- Fosfát pH = 2,5, C = 25mM, bez přídavku cyklodextrinu – nedocházelo k separaci, potlačen EOF
- Fosfát pH = 7,0, C = 25mM, bez přídavku cyklodextrinu – nedocházelo k separaci, avšak EOF byl přítomen
- Fosfát pH = 7,0, C = 25mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla, velká asymetrie píku, elektrolyt byl posouzen jako nevhodný a nebyl již zkoušen v koncentraci 50mM, proto není zahrnut do níže uvedené tabulky 5
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla dobře, lehká asymetrie píku
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem β -cyklodextrinu – separace proběhla dobře, lepší symetrie píku nežli s α -cyklodextrinem, dobré rozlišení od EOF
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem γ -cyklodextrinu, separace proběhla dobře, malá citlivost oproti přídavku α a β cyklodextrinu
- MES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α , β , γ –cyklodextrinu (vždy přídavek jen jednoho z cyklodextrinů) a s obrácenou polaritou – separace proběhla, lépe rozseparováno oproti normální polaritě, avšak delší čas analýzy
- HEPES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla, malé rozlišení od EOF

- TAPSO pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla, malé rozlišení od EOF, asymetrie píku, konec píku nedosedá na základní linii
- MOPSO pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla, velmi malé rozlišení od EOF, asymetrie píku
- BES pH = 7,0, C = 50mM, s přídavkem α -cyklodextrinu – separace proběhla, velmi malé rozlišení od EOF

Srovnání jednotlivých parametrů elektrolytů, u kterých docházelo k separaci při níže uvedených podmínkách, je uvedeno v Tab.5. Všechny elektrolyty uvedené v tabulce měly koncentraci 50mM a pH 7,0, ke všem byl přidán α -cyklodextrin o koncentraci 20mg/ml, napětí bylo 30kV.

Tabulka 5.: Parametry zkoušených elektrolytů, u kterých docházelo k separaci

	rozlišení od EOF	S/N	N	asymetrie
MES	1,78	90,0	62881	2,99
HEPES	1,09	124,0	28940	10,90
MOPSO	1,03	222,9	29438	5,28
BES	1,06	458,9	32536	6,08

Na základě výše uvedených parametrů byl jako vhodný elektrolyt pro metodu stanovení septonexu vybrán MES (50mM) o pH = 7,0, které bylo upraveno 20mM TRISem. Optimalizace elektrolytu je popsána v kapitole 4.2.1.

4.1.2. Výběr cyklodextrinu

Výsledky zkoušených cyklodextrinů uvedených v kapitole 3.2.2. jsou následující:

- α -cyklodextrin - dobrý, lehká asymetrie píku
- β - cyklodextrin – dobrý, o něco horší symetrie píku a menší rozlišení od EOF než u α -cyklodextrinu
- γ - cyklodextrin – malá separační účinnost, malá citlivost v porovnání s ostatními cyklodextriny a výrazná asymetrie píku
- 2,6-di-o-methyl- β -cyklodextrin – výrazná asymetrie píku
- (2-hydroxypropyl)- α -cyklodextrin - dobrý

- (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin – dobrý, o něco lepší symetrie píku než u (2-hydroxypropyl)- α -cyklodextrinu
- (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin – malá citlivost v porovnání s (2-hydroxypropyl)- α a β -cyklodextrinem
- Sulfát- β -cyklodextrin – nedošlo k separaci
- Succinyl - β -cyklodextrin – nedošlo k separaci

Srovnání jednotlivých parametrů cyklodextrinů, u kterých docházelo k separaci, je uvedeno v Tab.6. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrné hodnoty ze dvou měření.

Tabulka 6.: Parametry zkoušených cyklodextrinů, u kterých docházelo k separaci

	rozlišení	S/N	N	asymetrie
α -cyklodextrin	3,39	72,15	52292	2,76
β - cyklodextrin	2,46	80,00	47116	3,61
γ - cyklodextrin	2,75	26,10	9422	7,17
2,6-di-o-methyl- β - cyklodextrin	1,37	154,85	41151	5,30
(2-hydroxypropyl) - α -cyklodextrin	2,35	55,45	60935	1,99
(2-hydroxypropyl) - β -cyklodextrin	1,74	96,30	58649	1,53
(2-hydroxypropyl) - γ -cyklodextrin	2,59	46,35	17205	4,34

Z vyzkoušených cyklodextrinů byl vybrán na základě výše uvedených výsledků jako nejvhodnější (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin. Ve srovnání s ostatními zkoušenými cyklodextriny je po přidání (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu do elektrolytu nejlepší symetrie píku septonexu a to při vysoké citlivosti a dostatečným rozlišení od EOF. Závislost migračního času na koncentraci (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu je uvedena v kapitole 4.2.1.

4.1.3. Výběr vnitřního standardu (IS)

Výsledky zkoušených vnitřních standardů uvedených v kapitole 3.2.3. jsou následující:

a) Kvarterní amoniové soli

- Cetyltrimethylamoniumbromid – migroval ve stejný čas jako septonex
- Tetrabutylamoniumjodid – byl špatně rozlišitelný od septonexu, malá citlivost a značná asymetrie píku
- Tetramethylamoniumjodid – dobře rozlišitelný od septonexu, čas migrace blízký času migrace sodných iontů, asymetrie píku
- Fenyltrimethylamoniumjodid – dobré rozlišení od septonexu i píku sodných iontů, avšak velmi malá citlivost
- Tetraethylamoniumjodid - malá citlivost a malé rozlišení od septonexu

Kvarterní amoniové soli s kratším řetězcem byly dobře rozlišitelné od septonexu, zatímco kvarterní amoniové soli s delším řetězcem, blízké struktury septonexu migrovaly ve stejný čas jako septonex, nebo ve velmi podobný čas. Z tohoto důvodu není v tabulce 7 uvedeno rozlišení IS vůči septonexu - u některých látek se nedalo rozlišení vypočítat.

Čtyři IS (všechny o koncentraci 1mg/ml) ze skupiny kvarterních amoniových solí byly analyzovány společně nástřikem směsného vzorku. Všechny čtyři IS se povedlo od sebe rozseparovat . Elektroforeogram této analýzy je uveden v příloze (kapitola 8.1. Obr.17).

Po přidání kvarterních amoniových solí k roztoku septonexu byla po delším stání vidět zřetelná precipitace v roztoku.

b) Malé organické sloučeniny typu aminu

- Ethanolamin – dobré rozlišení i symetrie píku
- N,N-dimethylethanolamin - dobré rozlišení a velmi dobrá symetrie píku, delší migrační čas než ethanolamin, lepší rozlišení od píku sodných iontů než u ethanolaminu

c) Anorganické sloučeniny

- Síran lithný – dobré rozlišení, avšak asymetrie píku

Srovnání jednotlivých parametrů IS je uvedeno v Tab.7. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrné hodnoty ze dvou měření.

Tabulka 7.: Parametry zkoušených IS

	S/N	N	asymetrie
Tetrabutylamoniumjodid	20,50	84134	5,45
Tetraethylamoniumjodid	34,55	10028	4,62
Tetramethylamoniumjodid	43,95	62264	3,13
Fenyltrimethylamoniumjodid	12,55	91337	5,52
Cetyltrimethylamoniumbromid	113,35	55881	2,09
Ethanolamin	30,45	47583	2,03
N,N-dimethylethanolamin	57,55	49150	0,65
Síran lithný	20,20	44798	3,60

Na základě výše uvedených výsledků byl jako vhodný vnitřní standard vybrán N,N-dimethylethanolamin, je zde výborná symetrie píku, dobrá citlivost a dobré rozlišení jak od septonexu, tak od sodných iontů.

4.2. OPTIMALIZACE METODY

4.2.1. Optimalizace elektrolytu

Jednotlivé kroky optimalizace elektrolytu byly prováděny s roztokem obsahujícím septonex o koncentraci 0,2mg/ml a IS (N,N-dimethylethanolamin) o koncentraci 0,2mg/ml. Dále byl použit slepý roztok – ultračistá voda bez výše uvedených látek.

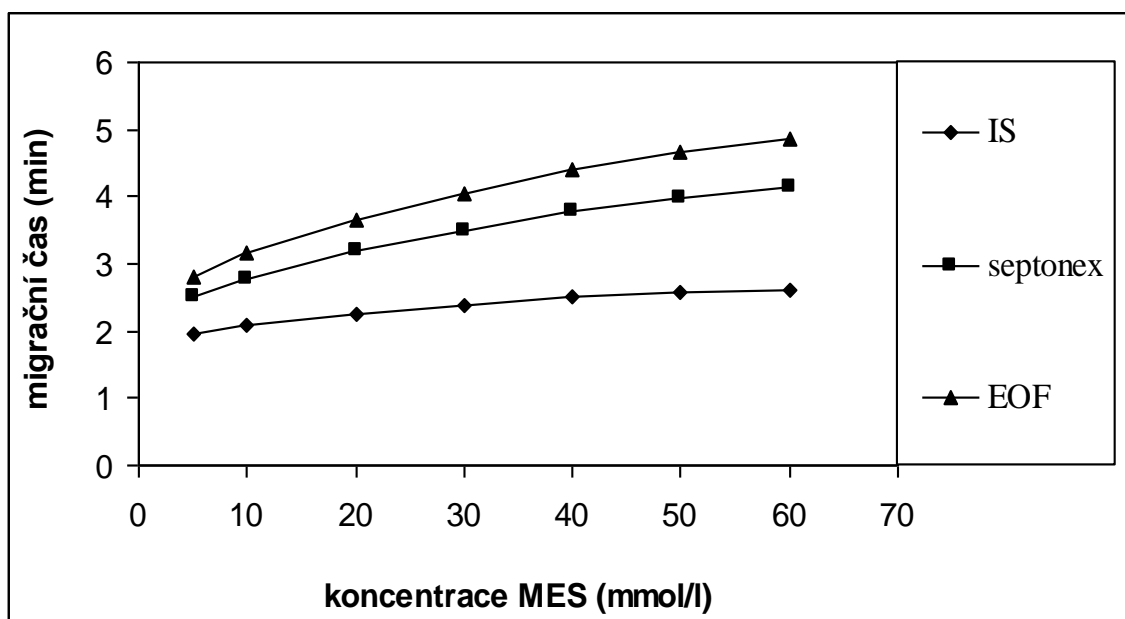
Koncentrace elektrolytu

Jako optimální elektrolyt byl vybrán MES (viz kapitola 4.1.1.), jehož pH bylo upraveno 20mM TRISem a přidán (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin o koncentraci 15mg/ml. Koncentrace elektrolytu byla optimalizována v rozsahu koncentrací 5mM až 60mM. Řada obsahovala tyto koncentrace elektrolytu: 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM a 60mM. S každou koncentrací elektrolytu byly provedeny dvě analýzy

při napětí 30kV. Hodnota pH byla u všech elektrolytů upravena na hodnotu 7,0. Průměrné migrační časy jsou uvedeny v Tab.8 a v grafu Obr.7.

Tabulka 8.: Závislost migračních časů na koncentraci elektrolytu

		koncentrace MES (mmol/l)						
		5	10	20	30	40	50	60
migrační čas (min)	IS	1,972	2,095	2,265	2,388	2,502	2,575	2,622
	septonex	2,504	2,779	3,182	3,487	3,772	3,987	4,137
	EOF	2,818	3,157	3,652	4,032	4,389	4,66	4,845
proud (μA)		4,3	8,5	16,1	24,0	32,3	38,4	46,5



Obrázek 7.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci elektrolytu

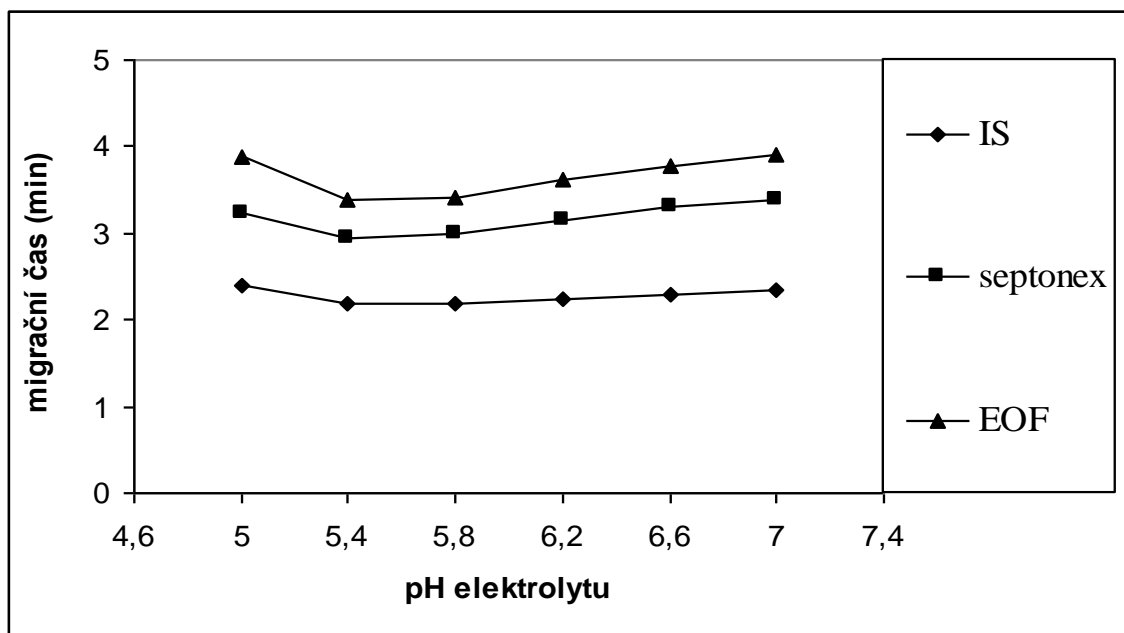
S rostoucí koncentrací elektrolytu rostou migrační časy. Pro další měření byla zvolena jako optimální koncentrace elektrolytu 30mmol/l. Důvodem bylo dostatečné rozlišení od ostatních píků, dobrá symetrie píků a kratší migrační čas oproti vyšším koncentracím.

pH elektrolytu

pH bylo optimalizováno pro 30mM elektrolyt v rozsahu 5,0 až 7,0 po 0,4 jednotkách pH. Řada obsahovala tyto hodnoty pH: 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0. K úpravě pH byl použit TRIS o koncentraci 20mM. K roztokům byl přidán (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin o koncentraci 15mg/ml. S každým elektrolytem byly provedeny dvě analýzy při napětí 30kV. Průměrné migrační časy jsou uvedeny v Tab.9 a v grafu Obr.8.

Tabulka 9.: Závislost migračních časů na pH elektrolytu

		pH elektrolytu					
		7	6,6	6,2	5,8	5,4	5
migrační čas (min)	IS	2,348	2,302	2,24	2,184	2,19	2,395
	septonex	3,392	3,295	3,147	2,989	2,94	3,235
	EOF	3,898	3,78	3,607	3,423	3,395	3,89
proud (μ A)		24,3	21,1	16,1	8,7	5,0	2,3



Obrázek 8.: Graf závislosti migračních časů na pH elektrolytu

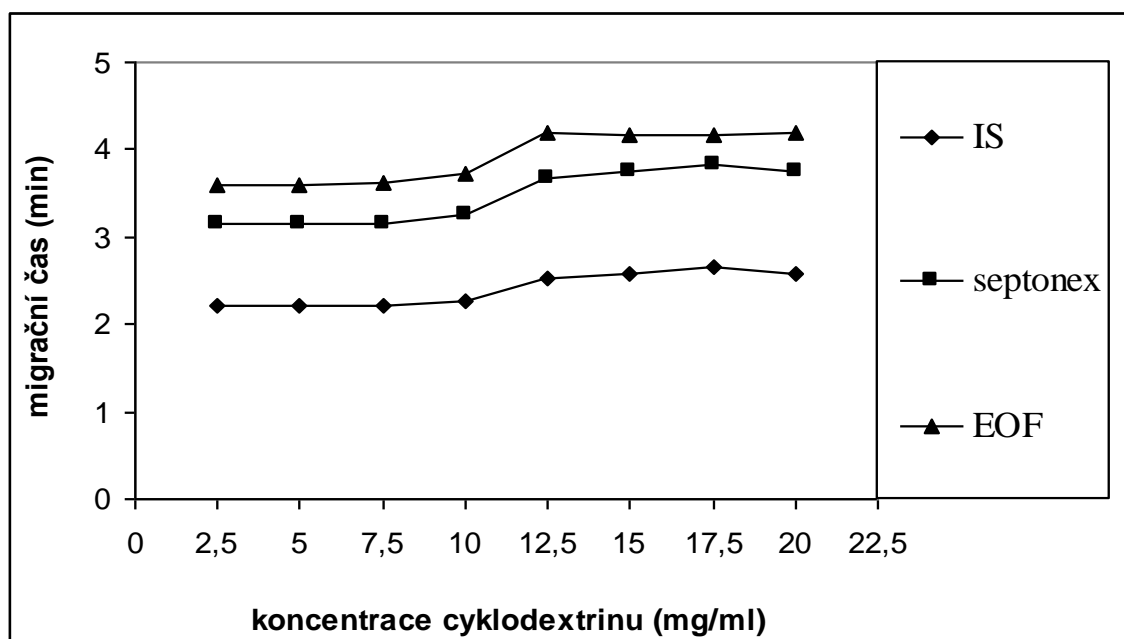
Na základě rozlišení a symetrie píků bylo vybráno optimální pH elektrolytu 7,0.

Koncentrace cyklodextrinu

Jako optimální cyklodextrin byl vybrán (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin (viz kapitola 4.1.2.). Koncentrace cyklodextrinu byla optimalizována v rozsahu koncentrací 2,5 až 20mg/ml po 2,5mg/ml. Řada obsahovala tyto koncentrace cyklodextrinu: 2,5mg/ml; 5,0mg/ml; 7,5mg/ml; 10,0mg/ml; 12,5mg/ml; 15mg/ml; 17,5mg/ml a 20,0mg/ml. S každou koncentrací cyklodextrinu v 30mM MESu o pH 7,0 byly provedeny dvě analýzy při napětí 30kV. Průměrné migrační časy jsou uvedeny v Tab.10 a v grafu Obr.9.

Tabulka 10.: Závislost migračních časů na koncentraci cyklodextrinu

		koncentrace cyklodextrinu (mg/ml)							
		2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
migrační	IS	2,203	2,215	2,223	2,255	2,539	2,585	2,647	2,584
čas (min)	septonex	3,145	3,15	3,162	3,244	3,664	3,753	3,832	3,759
	EOF	3,592	3,605	3,615	3,714	4,2	4,173	4,171	4,181
proud (μ A)		25,0	25,2	26,0	28,5	28,5	25,0	24,9	24,8



Obrázek 9.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci cyklodextrinu

Po přihlednutí k rozlišení, symetrii píků a k migračním časům byla jako optimální koncentrace cyklodextrinu zvolena koncentrace 12,5mg/ml.

Závěr

Na základě optimalizace bylo rozhodnuto, že optimální elektrolyt je 30mM MES upravený 20mM TRISem na pH 7,0 s přidavkem (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu o koncentraci 12,5mg/ml.

4.2.2. Optimalizace dalších podmínek

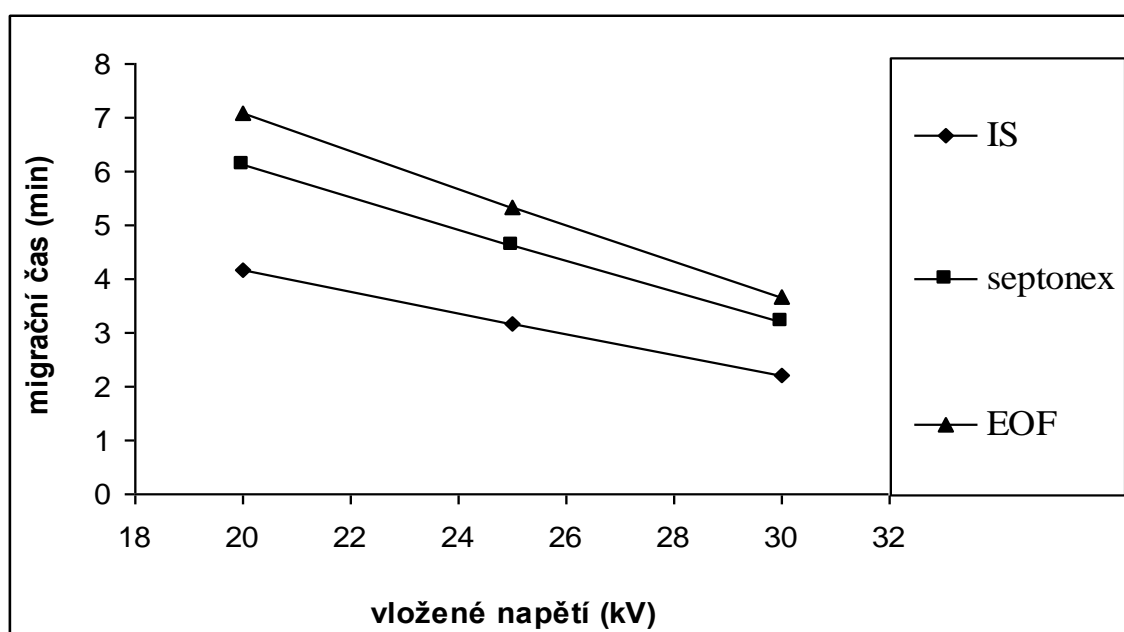
Další optimalizované parametry byly velikost vkládaného napětí a doba nástřiku vzorku (standardů). Pro všechna měření byl použit optimální elektrolyt (viz kapitola 4.2.1.).

Velikost napětí

Napětí bylo optimalizováno v rozsahu 20-30kV. Řada obsahovala tyto hodnoty napětí: 20kV, 25kV a 30kV. Každý krok byl proveden dvakrát a průměrné hodnoty byly zaznamenány do Tab.11 a vyneseny do grafu Obr.10.

Tabulka 11.: Závislost migračních časů na napětí

		napětí (kV)		
		20	25	30
migrační čas (min)	IS	4,168	3,165	2,199
	septonex	6,107	4,628	3,197
	EOF	7	5,329	3,675
proud (μ A)		16,3	21,2	28,0



Obrázek 10.: Graf závislosti migračních časů na napětí

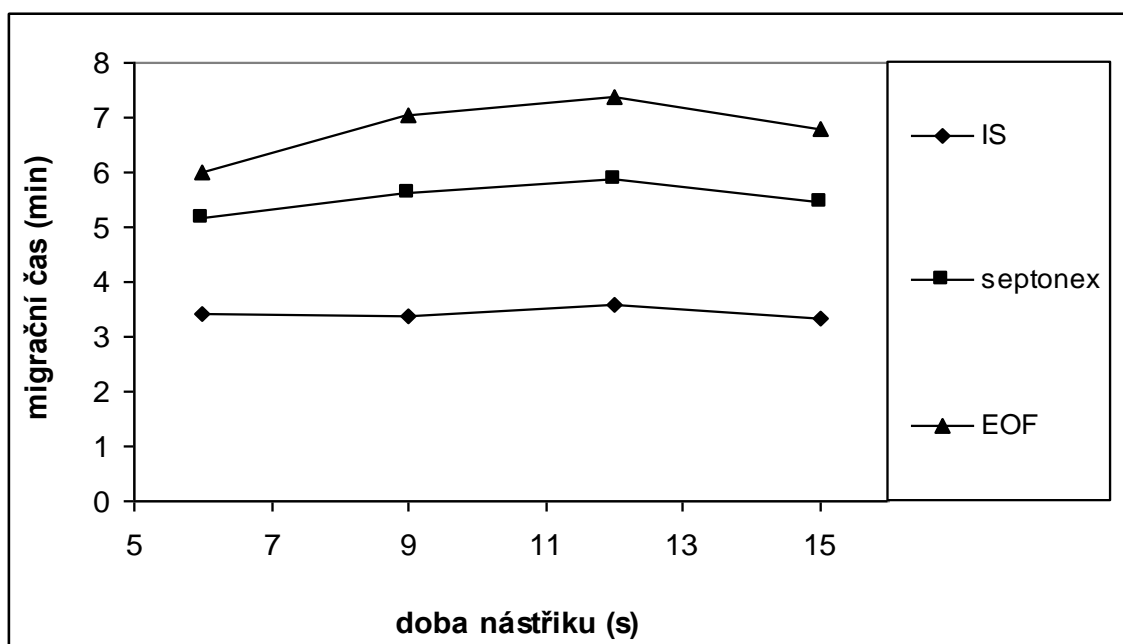
Jako optimální napětí byla vybrána hodnota 25kV, rozlišení a symetrie píků jsou při tomto napětí dostatečné a nižší hodnota napětí pouze prodlužuje dobu analýzy.

Doba nástřiku

Analyzátor je vybaven hydrodynamickým nástřikem vzorku a lze měnit dobu nástřiku a tlak nástřiku. Doba nástřiku byla optimalizována v rozmezí 6-15 sekund. Řada obsahovala tyto hodnoty doby nástřiku vzorku: 6s, 9s, 12s, 15s. Všechna měření byla provedena dvakrát při napětí 25kV a tlaku nástřiku 50mbar. Výsledné migrační časy-viz Tab.12 a graf Obr.11.

Tabulka 12.: Závislost migračních časů na době nástřiku

		doba nástřiku (s)			
		6	9	12	15
migrační čas (min)	IS	3,43	3,364	3,572	3,327
	septonex	5,172	5,642	5,877	5,447
	EOF	5,997	7,062	7,365	6,803
proud (μA)		21,1	21,2	21,7	21,5



Obrázek 11.: Graf závislosti migračních časů na době nástřiku

Jako optimální byl vybrán nástřik po dobu 15 sekund z důvodu nízkého migračního času a nejlepší symetrie píků.

Promývání kapiláry

Bylo zjištěno, že promývání kapiláry před každou analýzou má významný vliv na opakovatelnost analýz a životnost kapiláry. Jako optimální bylo vybráno následující promývání vše při tlaku 1000mbar:

- 1) 0,1% roztokem H_3PO_4 3 minuty – vymytí cyklodextrinů
- 2) 0,1M roztokem NaOH 4 minuty – kondicionace kapiláry
- 3) elektrolytem 4 minuty

4.2.3. Závěr optimalizace metody

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

- elektrolyt: 30mM MES upravený 20mM TRISem na pH = 7,0 obsahující (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin o koncentraci 12,5 mg/ml
- napětí: 25kV
- nástřik vzorku: 15 sekund při tlaku 50mbar
- promytí kapiláry: před každou analýzou při 1000mbar 0,1% roztokem H₃PO₄ 3 minuty, 0,1M roztokem NaOH 4 minuty a elektrolytem 4 minuty

4.3. STANOVENÍ LINEARITY A OPAKOVATELNOSTI

4.3.1. Linearita

Linearita byla stanovena pro septonex a bylo zvoleno rozpětí koncentrací 75 μ g/ml až 300 μ g/ml. Byl připraven zásobní roztok septonexu o přesné koncentraci 1,0027mg/ml odvážením 0,10027g septonexu do 100ml odměrné baňky. Zásobní roztok IS byl připraven naředěním 112,3 μ l N,N-dimethylethanolaminu ve 100ml odměrné baňce. Jednotlivé vzorky byly připraveny ředěním dvou výše uvedených roztoků do 10ml odměrných baněk, jejichž koncentrace jsou uvedené v následující tabulce 13.

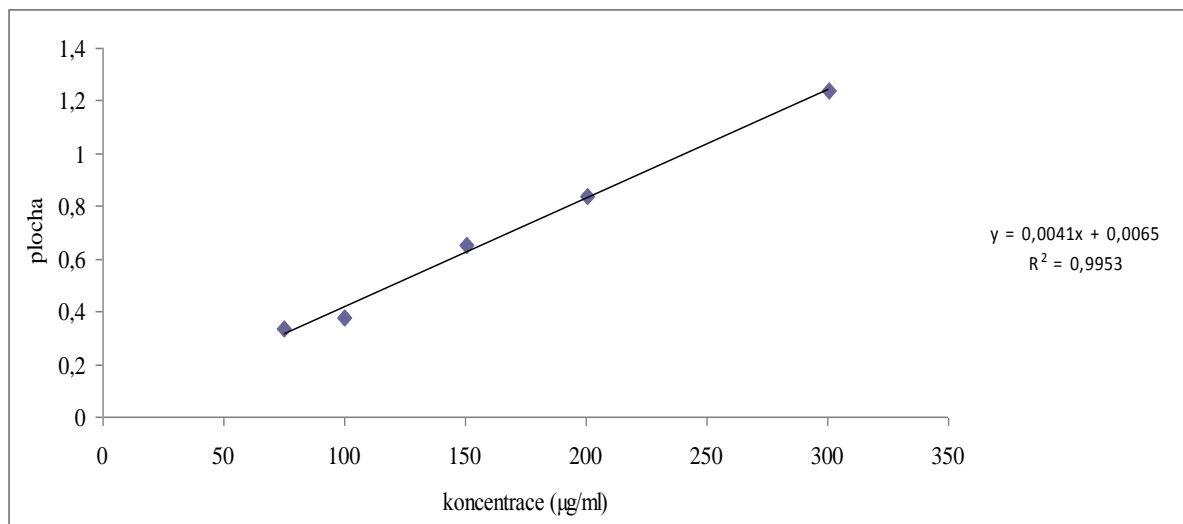
Tabulka 13.: Koncentrace vzorků pro stanovení linearitu

	septonex μ g/ml	N,N-dimethylethanolamin μ g/ml
1	75,20	200
2	100,27	200
3	150,41	200
4	200,54	200
5	300,81	200

Každý vzorek byl analyzován dvakrát za optimálních podmínek (viz kapitola 4.2.3.).

Elektrolyt pro všechny analýzy byl použit z jedné zásobní baňky, avšak elektrolyt umístěný do trojice zásobníků byl použit maximálně na šest analýz. Výsledné plochy

septonexu byly zkorigovány časem a IS dle vzorce 18 uvedeného v kapitole 3.4.2. Hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr.12) a byla určena závislost korigované plochy na koncentraci a korelační koeficient.



Obrázek 12.: Závislost plochy píku na koncentraci septonexu

Korelační koeficient křivky pro septonex je $r = 0,9976$.

4.3.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena pro dvě koncentrace septonexu - 75µg/ml a 150µg/ml (v kalibrační křivce body 1 a 3) a pro každou koncentraci byla analýza provedena šestkrát z jednoho vzorku. Příprava vzorků a elektrolytu je uvedena v kapitole 3.4.2, stejně jako postup výpočtu RSD. Z naměřených výsledků byly určeny RSD časů a ploch jak vzorků, tak IS. Výsledky jsou uvedeny v Tab.14. Jelikož zjištěné RSD ploch byly vysoké, bylo pro kontrolu provedeno 2. měření se vzorkem septonexu o koncentraci 75µg/ml. Druhé měření bylo prováděno jiný den než první měření a byla použita nová kapilára stejné celkové a efektivní délky a stejného průměru jako kapilára první. Analýza byla provedena opět šestkrát z jednoho vzorku. Vzorek a IS byly nově naředěny ze stejných zásobních roztoků jako pro první měření. Elektrolyt byl nově přefiltrován do zásobníků ze stejného zásobního roztoku jako elektrolyt pro první měření. Výsledky druhého měření jsou taktéž uvedeny v Tab.14.

Tabulka 14.: Opakovatelnost metody pro 75 μ g/ml a 150 μ g/ml septonexu

	RSD času septonexu	RSD ploch septonexu	RSD času IS	RSD ploch IS
1.měření C = 75 μ g/ml	1,45%	26,57%	0,99%	2,32%
1.měření C = 150 μ g/ml	1,22%	4,75%	1,08%	11,54%
2. měření C = 75 μ g/ml	0,14%	14,35%	0,63%	9,86%

Z výsledků 1. měření je patrné, že metoda má velmi vysokou opakovatelnost migračních časů, která se po zavedení nové kapiláry při 2. měření ještě podstatně zvýšila, zejména u septonexu. K dobré opakovatelnosti migračních časů velmi přispělo pravidelné promývání kapiláry před každou analýzou-viz kapitola 4.2.2. Špatná opakovatelnost ploch se po výměně kapiláry zlepšila u septonexu, avšak zhoršila u IS. Lze konstatovat, že z hlediska ploch neposkytuje tato metoda zatím dostatečně opakovatelné výsledky. Příčiny špatné opakovatelnosti a navrhované postupy jejího odstranění jsou diskutovány v kapitole 4.4.

4.4. STANOVENÍ OBSAHU SEPTONEXU V PŘÍPRAVKU

Obsah septonexu byl stanovován v přípravku Septonex sprej od firmy IVAX. Deklarovaný obsah septonexu v tomto přípravku byl 8,3mg/ml. Odpipetováním 0,181ml přípravku do 10ml odměrné baňky vznikl roztok o přibližné koncentraci 150 μ g/ml.

Jako standard pro porovnání ploch pro tato měření byl použit zásobní roztok septonexu, který vznikl rozpuštěním 0,10027g ve 100ml vody. Vzniklý roztok měl koncentraci 1,0027mg/ml septonexu. Ze zásobního roztoku byl odpipetován objem 1,5ml do 10ml odměrné baňky a doplněn vodou. Koncentrace standardu byla 150,405 μ g/ml. Ke všem roztokům byl přidán vnitřní standard o koncentraci 200 μ g/ml.

Nejprve byl analyzován směsný roztok přípravku Septonex sprej a IS o výše uvedených koncentracích. Roztok byl připraven paralelně dvakrát do dvou 10ml odměrných baněk. Z každé baňky byly provedeny tři analýzy. Stejným způsobem byl

připraven roztok standardu septonexu s IS, který byl opět analyzován třikrát. Výsledky těchto měření získané dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.3. jsou uvedeny v Tab.15.

Tabulka 15.: Stanovení obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej (výpočet z ploch)

pipetáž	C _{dek} (mg/ml)	C _{nalezená} (mg/ml)	Obsah septonexu
1	8,3	8,80	106,08%
2	8,3	8,73	105,21%
průměr	8,3	8,77	105,65%

V přípravku Septonex sprej bylo nalezeno 105,65% deklarovaného obsahu septonexu (směrodatná odchylka 0,62), což odpovídá 8,77mg/ml septonexu v roztoku (směrodatná odchylka 0,05).

Dále byl proveden stejný výpočet obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej s korekcí ploch IS. Výsledky tohoto výpočtu jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16.: Stanovení obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej (výpočet z ploch korigovaných IS)

pipetáž	C _{dek} (mg/ml)	C _{nalezená} (mg/ml)	Obsah septonexu
1	8,3	8,06	97,20%
2	8,3	9,54	114,95%
průměr	8,3	8,80	106,08%

Po korekci ploch septonexu plochami IS byly výsledky následující: nalezené množství septonexu 106,08% (směrodatná odchylka 12,55), což odpovídá 8,80mg/ml septonexu v roztoku (směrodatná odchylka 0,52).

Přesto, že se konečné výsledky v tabulkách 15 a 16 od sebe příliš neliší, z dílčích výsledků v tabulce 16 je zřejmé, že výsledky jednotlivých stanovení mají špatnou opakovatelnost. Korekce ploch IS zde nebyla přínosem. V příloze v kapitole 8.2. jsou v tabulce 20 uvedeny naměřené hodnoty migračních časů a ploch obou vzorků a standardu a k nim odpovídající hodnoty migračních časů a ploch IS. Tyto hodnoty byly použity pro výpočty obsahu septonexu v přípravku a výsledné hodnoty těchto výpočtů jsou uvedeny v tabulkách 15 a 16. Z dat uvedených v tabulce 20 je zřejmé, že se opět jedná (viz kapitola 4.3.2.) o špatnou opakovatelnost ploch septonexu a IS.

Pro ověření správnosti metody byly připraveny dva nové vzorky ředěním ze zásobních roztoků, do 10ml odměrných baněk. Tyto roztoky obsahovaly septonex o přibližné koncentraci 150 μ g/ml a IS o koncentraci 200 μ g/ml. K oběma vzorkům byl přidán standard septonexu o objemu 1,5ml a přesné koncentraci 150,405 μ g/ml. Správnost byla vypočítána dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.3. a výsledky jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17.: Ověření správnosti metody (výpočet z ploch)

pipetáž	$C_{vz.+IS+přidavek}$ μ g/ml	C_{rozdil} μ g/ml	$C_{přidavek}$ μ g/ml	nalezeno
1	320,33	161,62	150,405	107,46%
2	253,49	94,78	150,405	63,01%
průměr	286,91	128,20	150,405	85,24%

Výpočtem získaným z naměřených ploch vzorků a standardu bylo nalezeno 85,24% přídatku standardu (směrodatná odchylka 31,43).

Po korekci ploch vzorků a standardu plochami IS byly výsledky následující -viz tabulka 18.

Tabulka 18.: Ověření správnosti metody (výpočet z ploch korigovaných IS)

pipetáž	$C_{vz.+IS+přidavek}$ μ g/ml	C_{rozdil} μ g/ml	$C_{přidavek}$ μ g/ml	nalezeno
1	307,44	148,08	150,405	98,46%
2	295,57	136,22	150,405	90,57%
průměr	301,51	142,15	150,405	94,51%

Výpočtem získaným z naměřených ploch vzorků a standardu korigovaných plochami IS bylo nalezeno 94,51% přídatku standardu (směrodatná odchylka 5,58).

Dílčí výsledky v tabulkách 17 a 18 opět poukazují na špatnou opakovatelnost jednotlivých měření. Jedná se opět o špatnou opakovatelnost ploch, jak je zřejmé z tabulky 20 v kapitole 8.2, kde jsou uvedena data pro výpočet správnosti metody. Korekce ploch vzorků plochami IS zde byla prospěšná oproti stanovení obsahu septonexu v přípravku.

Z výsledků uvedených v kapitole 4.3. a 4.4. a z dat uvedených v kapitole 8.2. v tabulce 20 vyplývá, že metoda pro stanovení septonexu ve farmaceutických přípravcích byla vyvinuta, úspěšně optimalizována a úspěšně byla určena linearita metody.

Opakovatelnost migračních časů je velmi vysoká, nikoliv však opakovatelnost ploch. Kontrola potvrdila, že špatná opakovatelnost ploch není dána nástřikem ani chybnou integrací píků. Vzhledem k tomu, že opakovatelnost ploch IS je o něco lepší než ploch septonexu je zřejmé, že je chyba patrně dána strukturou septonexu.

Septonex má díky své struktuře (viz kapitola 2.3.1.) tendenci adsorbovat se na vnitřní stěně kapiláry. Byla snaha zabránit tomuto efektu přidáním vhodného cyklodextrinu, který specificky interaguje se septonexem (viz kapitola 2.1.4.) a brání jeho adsorpci na vnitřní stěnu kapiláry. Výše uvedené výsledky však ukazují, že i po přidavku vhodného cyklodextrinu (viz kapitola 4.1.2.) docházelo k částečné adsorpci septonexu na vnitřní stěnu kapiláry a tento jev vedl ke špatné opakovatelnosti ploch septonexu. Díky své struktuře má IS nižší afinitu k vnitřní stěně kapiláry než septonex a proto byla jeho opakovatelnost o něco lepší. Pokud jsou špatně opakovatelné plochy, je korekce ploch vzorků plochami IS zbytečná a nevede k věrohodnosti výsledků stanovení septonexu.

Aby byla metoda pro stanovení septonexu spolehlivá, přesná a využitelná i pro kvantitativní analýzu, je nutné vyřešit problém špatné opakovatelnosti ploch septonexu. V současné době se nabízejí k řešení tohoto problému dvě možnosti.

První z nich je použití organického rozpouštědla, které se přidá do elektrolytu. Takovým rozpouštědlem může být např. methanol, ethanol, propanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Přídavek organického rozpouštědla mění viskozitu elektrolytu, rozpustnost látek a má vliv na symetrii píku. Nedávno byl popsán kladný vliv přidavku acetonitrilu do elektrolytu na symetrii píku suxamethonia, což je látka strukturně podobná septonexu [22].

Druhou možností v odstranění špatné opakovatelnosti ploch septonexu je použití modifikovaných kapilár. Jde o kapiláry potahované polyvinylalkoholem či polyakrylamidem. Vnitřní povrch takto modifikovaných kapilár není negativně nabitý a kvarterní amoniová báze s kladným nábojem jakou je septonex by s ním neměla interagovat.

4.5. STANOVENÍ LIMITU DETEKCE A KVANTIFIKACE

Limit detekce a limit kvantifikace byl stanoven na základě poměru signálu k šumu S/N a ověřen měřeními. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19.: LOD a LOQ

	Septonex	
	µg/ml	mol/l
LOD	9	$2,13 \times 10^{-5}$
LOQ	30	$7,10 \times 10^{-5}$

Limit detekce byl stanoven na 9µg/ml a limit kvantifikace na 30µg/ml.

5. ZÁVĚR

Z výsledků této práce vyplývají následující závěry:

- Byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení septonexu ve farmaceutických přípravcích.
- Kapilára měla průměr 50 μ m, celkovou délku 75cm a efektivní délku 45cm.
- Optimální podmínky pro stanovení jsou 30mM MES upravený 20mM TRISem na pH = 7,0 obsahující (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin o koncentraci 12,5 mg/ml, 25kV, 25°C, nástřik 15 sekund při tlaku 50mbar.
- Při optimálních podmínkách trvá analýza méně než 4 minuty, včetně promývání kapiláry a nástřiku vzorku méně než 16 minut.
- Jako vnitřní standard byl použit N,N-dimethylethanolamin, byla ověřena linearita metody na pěti různých koncentračních úrovních, každý vzorek stanoven 2x, rovnice kalibrační přímky byla $y = 0,0041x + 0,0065$ s korelačním koeficientem $r = 0,9976$.
- Migrační čas vnitřního standardu N,N-dimethylethanolaminu byl 2,6 minuty a u septonexu byl 3,8 minuty.
- Migrační časy byly vysoce reprodukovatelné (RSD vždy nižší než 1,6%), zejména díky promývání kapiláry před každou analýzou při 1000mbar 0,1% roztokem H₃PO₄ 3 minuty, 0,1M roztokem NaOH 4 minuty a elektrolytem 4 minuty.
- Metoda stanovení septonexu je zatím použitelná pouze pro kvalitativní analýzu, díky špatné opakovatelnosti ploch septonexu, které vznikají pravděpodobně adsorpcí septonexu na vnitřní stěnu kapiláry. Metodou lze zatím bezpečně od sebe rozseparovat jednotlivé látky, nelze však spolehlivě stanovit obsah septonexu.
- K omezení adsorpce septonexu na vnitřní stěnu kapiláry byl použit (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin, avšak úplného odstranění adsorpce septonexu nebylo dosaženo. V budoucnu se bude tento problém řešit přidavkem organického rozpouštědla do elektrolytu či použitím potahované kapiláry. Metodu bude nutné znovu validovat.
- V přípravku Septonex sprej bylo nalezeno přibližně 106% deklarovaného obsahu septonexu. Vzhledem k výše uvedené špatné opakovatelnosti ploch septonexu je tento údaj pouze orientační a na základě spolehlivé použitelnosti metody pro kvalitativní analýzu lze konstatovat, že v přípravku Septonex sprej

byl septonex skutečně obsažen v množství velmi blízkém deklarovanému obsahu.

- Přestože cíl této práce nebyl zcela naplněn, obsahuje práce mnoho informací, cenných pro další zdokonalování této metody.

6. SEZNAMY

SEZNAM ZKRATEK

BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
FSCE	kapilární elektroforéza ve volném roztoku
GC	plynová chromatografie
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová kyselina
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-morpholinoethansulfonová kyselina
MOPSO	3-morfolin-2-hydroxypropansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
TAPSO	3-N-tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-hydroxypropansulfonová kyselina
TRIS	tris[hydroxymethyl]aminomethan
UV	ultrafialová oblast spektra, detekce
VIS	viditelná oblast spektra

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1.: Faktory, jimiž lze regulovat EOF	13
Tabulka 2.: Přehled separačních parametrů	15
Tabulka 3.: Přehled nejčastěji používaných způsobů detekce v CZE	23
Tabulka 4.: Ředění zásobních roztoků pro stanovení linearitu.....	32
Tabulka 5.: Parametry zkoušených elektrolytů, u kterých docházelo k separaci	41
Tabulka 6.: Parametry zkoušených cyklodextrinů, u kterých docházelo k separaci	42
Tabulka 7.: Parametry zkoušených IS	44
Tabulka 8.: Závislost migračních časů na koncentraci elektrolytu.....	45
Tabulka 9.: Závislost migračních časů na pH elektrolytu.....	46
Tabulka 10.: Závislost migračních časů na koncentraci cyklodextrinu	47
Tabulka 11.: Závislost migračních časů na napětí	48
Tabulka 12.: Závislost migračních časů na době nástřiku	49
Tabulka 13.: Koncentrace vzorků pro stanovení linearitu	50
Tabulka 14.: Opakovatelnost metody pro 75 μ g/ml a 150 μ g/ml septonexu.....	52
Tabulka 15.: Stanovení obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej (výpočet z ploch)	53
Tabulka 16.: Stanovení obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej (výpočet z ploch korigovaných IS).....	53
Tabulka 17.: Ověření správnosti metody (výpočet z ploch).....	54
Tabulka 18.: Ověření správnosti metody (výpočet z ploch korigovaných IS)	54
Tabulka 19.: LOD a LOQ	56
Tabulka 20.: Data pro stanovení obsahu septonexu v přípravku a ověření správnosti metody.....	71

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.: Schematické znázornění principu elektroforézy	10
Obrázek 2.: Znázornění elektroosmotického toku v křemenné kapiláře	12
Obrázek 3.: Zařízení pro kapilární elektroforézu	16
Obrázek 4.: Znázornění separace pomocí CZE s „normálním“ EOF a polaritou)	17
Obrázek 5.: Trubičkové znázornění krystalové struktury α -cyklodextrinu	21
Obrázek 6.: Septonex (Carbethopendecinii bromidum)	24
Obrázek 7.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci elektrolytu.....	45
Obrázek 8.: Graf závislosti migračních časů na pH elektrolytu	46
Obrázek 9.: Graf závislosti migračních časů na koncentraci cyklodextrinu.....	47
Obrázek 10.: Graf závislosti migračních časů na napětí.....	48
Obrázek 11.: Graf závislosti migračních časů na době nástřiku.....	49
Obrázek 12.: Závislost plochy píku na koncentraci septonexu.....	51
Obrázek 13.: Elektroforeogram standardu za optimálních podmínek	68
Obrázek 14.: Elektroforeogram přípravku Septonex sprej	68
Obrázek 15.: Elektroforeogram slepého vzorku za optimálních podmínek	69
Obrázek 16.: Elektroforeogram sodných iontů.....	69
Obrázek 17.: Elektroforeogram čtyř vnitřních standardů	70

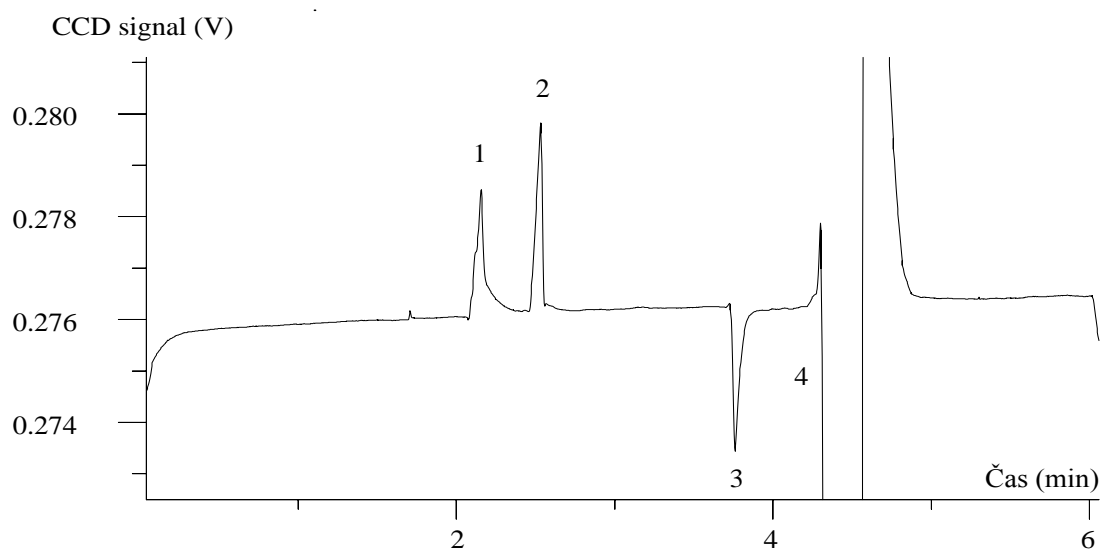
7. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Klouda, P., *Moderní analytické metody*, nakladatelství Pavel Klouda, 2003
- [2] Gaš, B., Kapilární elektroforéza, *Vesmír* 80, 370, 2001/7
- [3] http://www.sweb.cz/placek.lukas/pdf_soubory/CEzakl.pdf, 5.12.2008
- [4] Baker, D.R., *Capillary electrophoresis*, John Wiley & Sons Inc New York, 1995
- [5] http://www.rsc.org/chemsoc/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/acrobat/complete.pdf; 31. 10. 2007
- [6] Los, P., Stanovení glukosaminu metodou kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí. Diplomová práce, FaF UK, 2008
- [7] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>, 5.12.2008
- [8] http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf, 5.12.2008
- [9] Český lékopis 2005 (3.díl), Grada Publishing a.s. 2005
- [10] Databáze léčiv AISLP, SPC přípravků Septonex, Septonex plus, Ophthalmoseptonex, Mukoseptonex, Mukoseptonex E, Mesocain, Triamcinolon-Ivax, Septonex ad us. vet. a Otibiovin ad us. vet., verze 2008.2
- [11] http://www.recman.cz/pdf/aplikacni_list_21.pdf, 5.12.2008
- [12] http://www.recman.cz/pdf/aplikacni_list_52.pdf, 5.12.2008
- [13] Koula, V., Kučová, D., Gasparič, J., Determination of organic bases by ion-pair extraction polarography using orange II as a counter ion, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, Nov 1992, 57(11):2272-2278
- [14] Kopecký, F., Vojteková, M., Kováčová, S., Juríčková, M., Inclusion complexation of carbethopendecinium bromide with some α - and β -cyclodextrins studied by potentiometry with membrane electrodes, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2004, 69(2):384-396
- [15] http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.htm, 7.12.2008
- [16] Němcová I, Evtimová B., Hrachovská J., Spectrophotometric determination of aluminium-(III) and fluoride ions with brompyrogallol red in the presence of the cationic surfactant septonex, *Dokladi na Bolgarskata Akademiya na Naukite*, 1990, 43(2):45-48
- [17] Dakiky, M., Němcová, I., Aggregation of o,o '-Dihydroxy azo Dyes III. Effect of cationic, anionic and non-ionic surfactants on the electronic spectra of 2-hydroxy-5-nitrophenylazo-4-[3-methyl-1-(4 "-sulfofenyl)-5-pyrazolone], *Dyes Pigm.*, Feb 2000, 44(3):181-193

- [18] Švancara, I., Foret, P., Vytřas, K., A study on the determination of chromium as chromate at a carbon paste electrode modified with surfactants, *Talanta*, Nov 15 2004, 64(4):844-852
- [19] Galík, M., Cholota, M., Švancara, I., Bobrowski, A., Vytřas, K., A study on stripping voltammetric determination of osmium(IV) at a carbon paste electrode modified in situ with cationic surfactants, *Electroanalysis*, Nov 2006, 18(22):2218-2224
- [20] Users Manual, Programmable Injector for Capillary Electrophoresis, Prince Technologies B.V., 1999
- [21] Quick Start Guide - User's manual, Data Acquisition and analysis Software, PP van Mierlo, 2000
- [22] Nussbaumer, S., Fleury-Souverain, S., Rudaz, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.L., Determination of suxamethonium in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C⁴D), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Feb 2009, 49(2): 333-337
- [23] Tang, F. P. W., Leung, G. N. W., Wan, T. S. M., Analyses of quaternary ammonium drugs in horse urine by capillary electrophoresis - mass spectrometry, *Electrophoresis*, Jul 2001, 22(11): 2201-2209

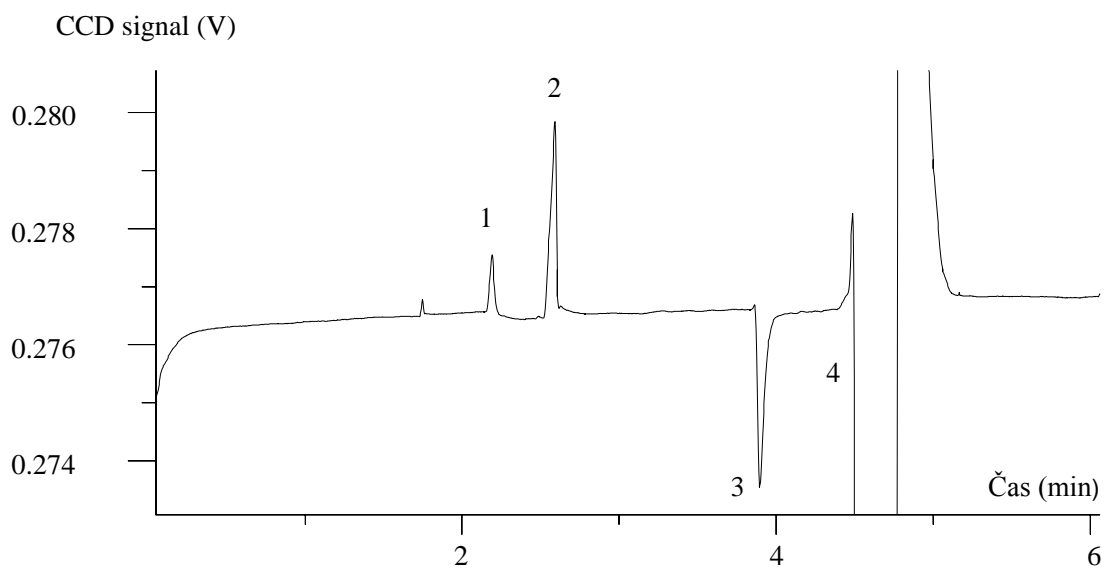
8. PŘÍLOHY

8.1. ELEKTROFOREOGRAMY



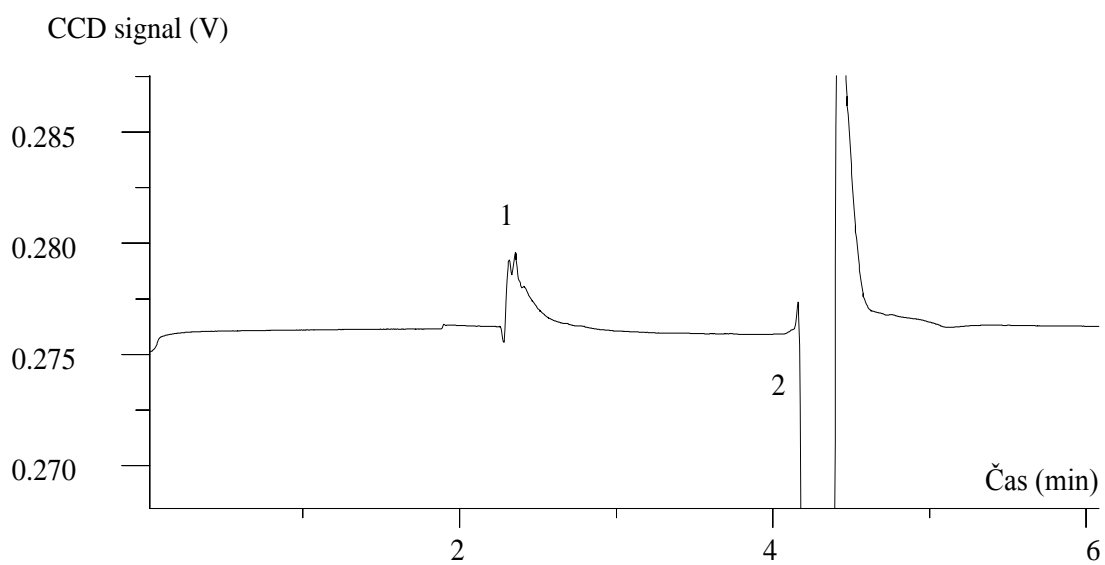
Obrázek 13.: Elektroforeogram standardu za optimálních podmínek

Legenda: 1-sodné ionty, 2-N,N-dimethylethanolamin (IS), 3-septonex, 4-EOF



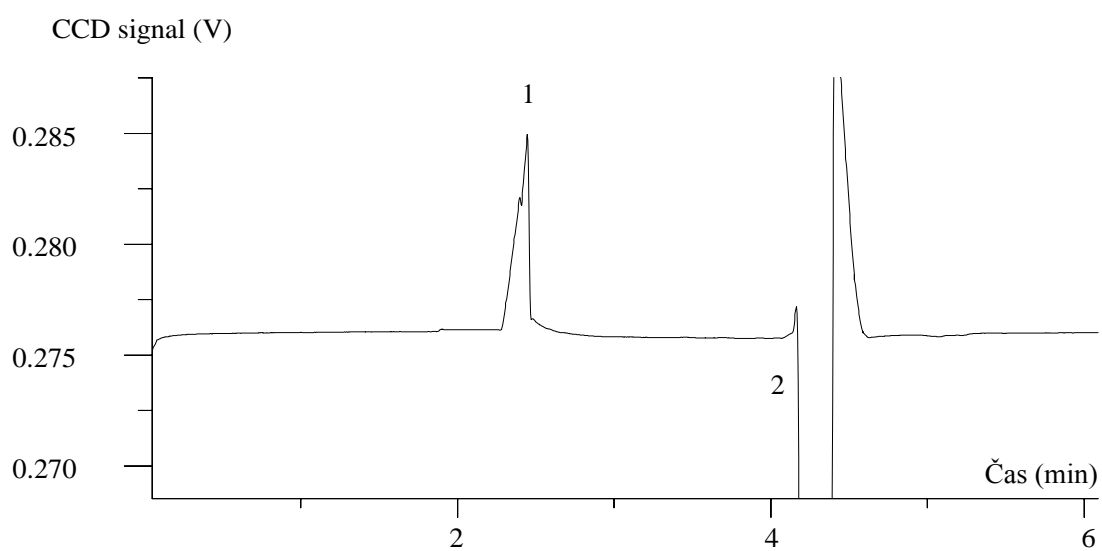
Obrázek 14.: Elektroforeogram přípravku Septonex sprej

Legenda: 1-sodné ionty, 2-IS, 3-septonex, 4-EOF



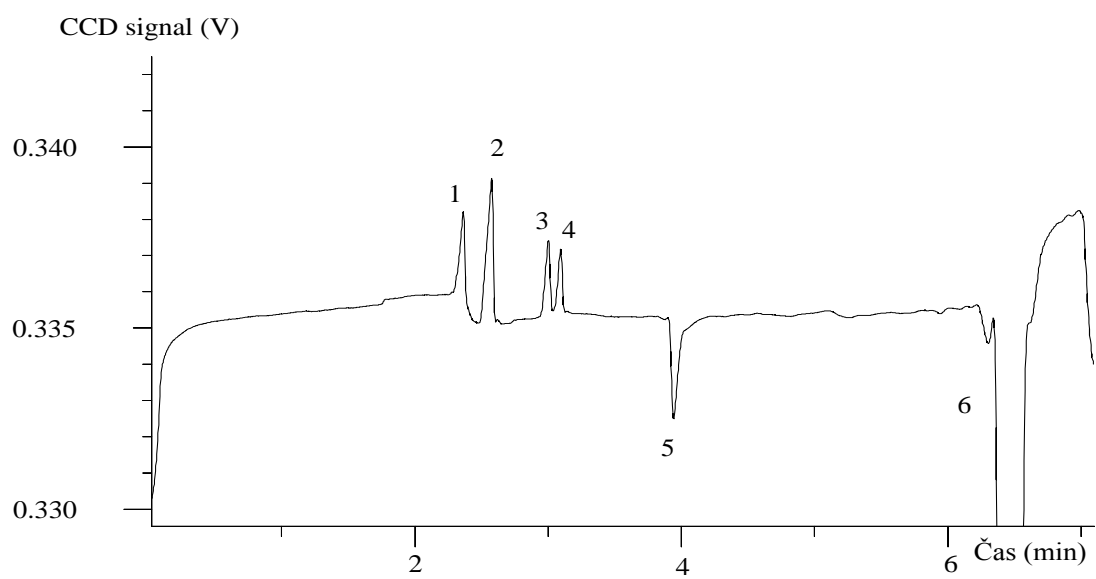
Obrázek 15.: Elektroforeogram slepého vzorku za optimálních podmínek

Legenda: 1-sodné ionty, 2-EOF



Obrázek 16.: Elektroforeogram sodných iontů

Legenda: 1-sodné ionty, 2-EOF



Obrázek 17.: Elektroforeogram čtyř vnitřních standardů

Legenda: 1-sodné ionty, 2-fenyltrimethylamoniumjodid, 3-tetramethylamoniumjodid, 4-tetraethylamoniumjodid, 5-tetrabutylamoniumjodid, 6-EOF

8.2. DATA PRO STANOVENÍ OBSAHU SEPTONEXU V PŘÍPRAVKU A OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY

Tabulka 20.: Data pro stanovení obsahu septonexu v přípravku a ověření správnosti metody

Přípravek vz.1	vz.1 plocha	vz.1 čas(min)	IS.1 plocha	IS.1 čas(min)
	0,00016203	4,153	0,00018331	2,717
	0,00016294	4,093	0,00018434	2,69
	0,00016874	4,04	0,00016335	2,663
průměr	0,00016457	4,095333333	0,000177	2,69
sm.odch	3,63988E-06	0,056536124	1,18325E-05	0,027
RSD	2,211749633	1,380501159	6,685005419	1,003717472
Přípravek vz.2	vz.2 plocha	vz.2 čas(min)	IS.2 plocha	IS.2 čas(min)
	0,00016947	3,963	0,00015653	2,623
	0,00015142	3,897	0,00014023	2,593
	0,00016881	3,84	0,00014858	2,57
průměr	0,000163233	3,9	0,000148447	2,595333333
sm odch	1,0236E-05	0,061554854	8,15082E-06	0,026576932
RSD	6,270758197	1,578329579	5,490738282	1,024027704
Standard	st.plocha	st.čas(min)	IS.plocha	IS.čas(min)
	0,00013357	3,76	0,00015699	2,533
	0,00018283	3,773	0,00016503	2,547
	0,00014957	3,78	0,00016454	2,547
průměr	0,000155323	3,771	0,000162187	2,542333333
sm odch	2,51289E-05	0,010148892	4,50711E-06	0,008082904
RSD	16,17845673	0,269129981	2,778964074	0,317932494
Vz.1 správnost	vz+st.1plocha	vz+st.1 čas(min)	IS.1 plocha	IS.1 čas(min)
	0,000347	3,82	0,00016713	2,583
	0,00036342	3,817	0,00017234	2,58
	0,000282	3,827	0,00016749	2,583
průměr	0,000330807	3,821333333	0,000168987	2,582
sm odch.	4,30578E-05	0,005131601	2,90964E-06	0,001732051
RSD	13,01599424	0,134288244	1,721819205	0,067081751
Vz.2 správnost	vz+st.2plocha	vz+st.2 čas(min)	IS.2 plocha	IS.2 čas(min)
	0,00031875	3,747	0,0001354	2,537
	0,00022639	3,677	0,00013686	2,503
	0,00024019	3,63	0,00014502	2,487
průměr	0,000261777	3,684666667	0,000139093	2,509
sm odch	4,98205E-05	0,058875575	5,1843E-06	0,025534291
RSD	19,03167448	1,597853492	3,727207249	1,017707878

ABSTRAKT

STANOVENÍ SEPTONEXU VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH METODOU KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY S VODIVOSTNÍ DETEKCÍ

Byla vyvinuta nová metoda kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení septonexu ve farmaceutických přípravcích. Optimální podmínky pro separaci a stanovení septonexu byly následující: základní elektrolyt 30mM MES upravený 20mM TRISem na pH = 7,0, který obsahuje (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin o koncentraci 12,5mg/ml, 25kV, 25°C, nástřik 15 sekund při tlaku 50mbar. Jako vnitřní standard byl použit N,N-dimethylethanolamin (200 μ g/ml). Pík septonexu byl dostatečně separován od píku vnitřního standardu i od EOF. Analýza byla provedena v křemenné kapiláře (vnitřní průměr 50 μ m, celková délka 75cm a délka k detektoru 45cm). Analýza trvala méně než 4 minuty, s promýváním kapiláry méně než 16 minut. Kalibrační závislost byla pro septonex lineární 75 μ g/ml - 300 μ g/ml, korelační koeficient $r = 0,9976$. LOD byl 9 μ g/ml a LOQ byl 30 μ g/ml. Při stanovení septonexu v reálném farmaceutickém přípravku byla pozorována špatná opakovatelnost ploch analytu, způsobená patrně nedokonalým potlačením adsorpce septonexu na vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Tento problém bude moci být pravděpodobně vyřešen přidavkem organických rozpouštědel do elektrolytu nebo použitím modifikovaných separačních kapilár.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SEPTONEX IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS USING CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS WITH CONTACTLESS CONDUCTIVITY DETECTION

A new method of capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection for the determination of septonex in pharmaceutical preparations was devised. Optimal conditions for the separation and determination of septonex were: background electrolyte 30mM MES of pH 7.0 (adjusted with 20mM TRIS) containing 12.5mg/ml of (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, voltage 25kV, temperature 25°C and sample injection for 15 seconds under the pressure of 50mbar. N,N-dimethylethanolamine (200 μ g/ml) was used as internal standard. The peak of septonex was satisfactorily separated from the peak of internal standard as well as from the EOF. The analysis was carried out in a fused-silica capillary (internal diameter 50 μ m, total length 75cm and the length to the detector 45cm). The separation took less than 4 minutes and the overall analysis time involving appropriate rinsing of the capillary was less than 16 minutes. The calibration curve was linear in the range 75 μ g/ml - 300 μ g/ml of septonex, correlation coefficient $r = 0.9976$. The LOD was 9 μ g/ml and LOQ was 30 μ g/ml of septonex. Unsuitable repeatability of peak areas of septonex (caused probably by insufficient elimination of the adsorption of the analyte on the inner walls of the fused-silica capillary) was observed when determining septonex in a real pharmaceutical preparation. This problem will be presumably solved by adding an organic solvent into the electrolyte or by using modified separation capillaries.