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

VYUŽITÍ MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRAFIE V ANALÝZE LÉČIV

RIGORÓZNÍ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009 Mgr. MARKÉTA LÍPOVÁ

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

Děkuji Doc. RNDr. Marii Pospíšilové CSc. za poskytnuté konzultace, připomínky a za její vstřícnost. Dále všem pracovníkům katedry analytické chemie za předávání cenných zkušeností.

Abstrakt

Práce se věnuje vypracování metody micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s UV detekcí při 214 nm pro současnou analýzu paracetamolu, kofeinu, kyseliny askorbové a chlorfenaminu. Validovaná metoda byla následně použita pro stanovení těchto látek v průmyslově vyráběném kombinovaném farmaceutickém přípravku.

Pro vypracování MEKC metody bylo vyzkoušeno několik elektrolytových systémů a hledány optimální podmínky pro analýzu - koncentrace borátu, pH, koncentrace dodecylsíranu sodného (SDS), přídavek organických rozpouštědel, velikost separačního napětí a teploty.

Jako optimální operační systém byl zvolen 40 mM borátový tlumivý roztok s obsahem 70 mM SDS a 10% (v/v) methanolu (pH^* elektrolytu bylo upraveno 1 M amoniakem na 7,6). Jako vnitřní standard byl zvolen ethylparaben.

Analýzy byly provedeny v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm a délce 60 cm (efektivní délka 50 cm) a při napětí 30 kV a teplotě 20 °C. Analýza trvala pod 10 min.

MEKC je vhodná metoda pro analýzu daných léčiv v přípravku TRIGRIP por. cps. dur. Zjištěný obsah účinných látek v přípravku odpovídal deklarovanému obsahu, opakovatelnost metody je 1,23% až 2,75% (n=3). Správnost metody (recovery) byla nalezena v rozmezí 90,43% až 99,59%.

Abstract

In this work, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with UV detection at 214 nm was developed for separation of paracetamol, caffeine, ascorbic acid and chlorphenamin. The validated method was used for selective assay of the active substances in pharmaceutical preparation.

The separations were optimised by examining a number of experimental conditions, such as the electrolytic system type and concentration, pH, concentration of sodium dodecyl sulphate (SDS), addition of organic solvents, separation voltage and temperature.

The optimal operational system consisted of 40mM boric acid, 70mM SDS and 10% (v/v) of methanol (adjusted to pH* 7.6 with 1 M ammonia solution). Ethylparaben was chosen as an internal standard.

The assay of compounds analysed was carried out at 30 kV and 20° C with 60 cm x 75 μm I.D. fused silica capillary (effective length 50 cm). A single analysis took less than 10 min.

The method was suitable for determining the drugs in pharmaceutical preparation TRIGRIP capsules with RSD values from 1,23% to 2,75% (n=3). The MEKC results agreed well with nominal contents of the compounds. The recovery of the method ranged from 90.43% to 99.59%.

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK 10
2 ÚVOD 12
3 TEORETICKÁ ČÁST 13
3.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY 13
3.1.1 Elektroforetická pohyblivost 14
3.1.2 Iontová pohyblivost 14
3.1.3 Skutečná pohyblivost 15
3.1.4 Efektivní pohyblivost 15
3.1.5 Migrační čas 16
3.1.6 Elektroosmotický tok 16
3.1.7 Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti 18
3.1.7.1 Vliv pH pracovního elektrolytu 19
3.1.7.2 Tvorba komplexů 19
3.1.7.3 Tvorba iontových asociátů 19
3.1.7.4 Tvorba hostitelských komplexů 19
3.1.7.5 Vliv nevodných rozpouštědel 20
3.1.7.6 Vliv síťujícího prostředí 20
3.1.7.7 Vliv ionogenních smáčedel 20
3.1.8 Děje ovlivňující separaci 20
3.1.8.1 Difúze 20
3.1.8.2 Elektromigrační disperze 21
3.1.8.3 Jouleův ohřev 21
3.1.8.4 Sorpce 22
3.1.8.5 Délka detekční cely 22
3.1.8.6 Délka nástřiku 22
3.1.9 Instrumentální uspořádání 22
3.1.9.1 Separační kapilára 23
3.1.9.2 Zdroj vysokého napětí 23
3.1.9.3 Dávkování vzorku 23
3.1.9.4 Detekce 25
3.1.10 Aplikace kapilární elektroforézy 26
3.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRAFIE 26

3.2.1 Pseudostacionární fáze ... 28
3.2.1.1 Micely ... 28
3.2.1.2 Polymerní fáze ... 28
3.2.2 Migrace v MEKC ... 29
3.2.3 Kapacitní faktor ... 30
3.2.4 Rozlišení ... 30
3.2.5 Faktory ovlivňující separaci ... 31
3.2.5.1 Koncentrace surfaktantu ... 31
3.2.5.2 Typy pseudostacionární fáze ... 31
3.2.5.3 Modifikátory ... 32
3.2.5.4 Vliv pH a teploty ... 33
3.3 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE) ... 33
3.4 KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (ITP) ... 34
3.5 IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE ... 34
3.6 KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE (CEC) ... 34
3.7 MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRAFIE (MEEKC) ... 35
3.8 KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA ... 35
3.9 CHLORFENAMIN MALEÁT ... 35
3.10 KOFEIN ... 36
3.11 KYSELINA ASKORBOVÁ ... 37
3.12 PARACETAMOL ... 38
3.13 METODY STANOVENÍ PAR, KOF, KAS, CHF V PROTICHŘIPKOVÝCH PREPARÁTECH ... 39
4 CÍL PRÁCE ... 43
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 44
5.1 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY ... 44
5.1.1 Chemikálie ... 44
5.1.2 Příprava roztoků ... 45
5.1.2.1 Roztoky pracovních elektrolytů ... 45
5.1.2.2 Hledání vnitřního standardu (IS) ... 45
5.1.2.3 Roztok standardů pro optimalizaci metody ... 46
5.1.2.4 Kalibrační roztoky ... 46
5.1.2.5 Příprava vzorku ... 46

5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE 47
5.3 PRACOVNÍ POSTUP 47
5.3.1 Měření kalibrační závislosti 48
5.3.2 Limit detekce a kvantifikace 48
5.3.3 Opakovatelnost metody 48
5.3.4 Účinnost separace 49
5.3.5 Rozlišení 50
5.3.6 Správnost metody 50
5.3.6.1 Ověření správnosti metodou s přídavkem standardů 50
6 VÝSLEDKY A DISKUSE 51
6.1 OPTIMALIZACE METODY 51
6.1.1 Detekce 51
6.1.2 Volba pracovního elektrolytu 51
6.1.3 Optimalizace pH BGE 52
6.1.4 Optimalizace koncentrace SDS 54
6.1.5 Optimalizace koncentrace základního elektrolytu 55
6.1.6 Optimalizace koncentrace methanolu 56
6.1.7 Vliv cyklodextrinů 57
6.1.8 Vnitřní standard 58
6.1.9 Vliv napětí 58
6.1.10 Vliv teploty 59
6.1.11 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření 59
6.1.12 Rozlišení 61
6.1.13 Účinnost separace 61
6.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA 62
6.2.1 Kalibrační závislost pro paracetamol 62
6.2.2 Kalibrační závislost pro kofein 63
6.2.3 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou 64
6.2.4 Kalibrační závislost pro chlorfenamin 65
6.2.5 Kapacitní faktor 66
6.2.6 Limit detekce a limit kvantifikace 66
6.3 OPAKOVATELNOST METODY 67
6.4 ANALÝZA HVLP 68
6.5 OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY 70

6.5.1 Analýza vzorku s přídavkem standardních látek 70
7 ZÁVĚRY 71
8 LITERATURA 73

1 SEZNAM ZKRATEK

ACES - N-(acetamido)-2-aminoethan sulfonová kyselina

BES - N,N-Bis[2-hydroxyethyl]2-aminoethansulfonová kyselina

cAMP - cyklický adenosin monofosfát

CE - kapilární elektroforéza

CEC - kapilární elektrochromatografie

CE-MS - kapilární elektroforéza s hmotnostně spektrometrickou detekcí

cGMP - cyklický guanosin monofosfát

CHF - chlorfenamin maleát

CMC - kritická micelární koncentrace

CZE - kapilární zónová elektroforéza

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EOF - elektroosmotický tok

EP - ethylparaben

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina

HPCE - vysokoúčinná kapilární elektroforéza

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HVLP - hromadně vyráběný léčivý přípravek

IEF - izoelektrická fokusace

IMAO - inhibitor monoaminooxidázy

IS - vnitřní standard

ITP - kapilární izotachoforéza

KAS - kyselina askorbová

KOF - kofein

LOD - limit detekce

LOQ - limit kvantifikace

MECC - micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MEEKC - mikroemulzní elektrokinetická chromatografie

MEKC - micelární elektrokinetická chromatografie

MES - 2-morpholinoethansulfonová kyselina

MetOH - methanol

MOPSO - 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropansulfonová kyselina

PAR - paracetamol

PSA - pentansulfonová kyselina

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

RP-LC - kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

SDS - dodecylsíran sodný

TBA - tetrabutylamonium hydrogensulfát

TRIS - tris(hydroxymethyl)-aminomethan

ZR - základní roztok

2 ÚVOD

Kapilární elektroforéza je účinná separační metoda, která využívá rozdílné migrace jednotlivých složek v elektrickém poli.

Počátky elektroforézy spadají do 80. let 19. století. Teoretické základy položil Kohlrausch, jenž v roce 1897 odvodil regulační funkci, která má zásadní význam pro izotachoforézu.[1] Elektroforéza jako separační technika byla představena v roce 1937 Tiseliem. Zjistil, že ve směsích proteinů umístěných mezi roztoky pufrů v trubici, na něž je aplikováno elektrické pole, migrují složky vzorku ve směru a rychlostí určenou jejich nábojem a mobilitou. Za svou práci byl Tiselius oceněn Nobelovou cenou.[2]

V roce 1962 popsali Vesterberg a Svensson izoelektrickou fokusaci bílkovin v přítomnosti amfolytů.[1]

První významný krok ke kapilární elektroforéze učinil v roce 1967 Hjertén, který prováděl elektroforézu v podélně rotující trubici. Později Virtanen a Mikkers vykonávali elektroforézu v kapilárách o vnitřním průměru přibližně 200 μm vyrobených ze skla nebo teflonu.[2] Stabilizaci zón vlivem „efektu stěny" použil v izotachoforéze a elektroforéze v kapiláře Martin a Everaerts.[1]

Významný pokrok znamenaly pro kapilární elektroforézu práce Jorgensona a jeho spolupracovníků, kteří na začátku 80. let 20. století ukázaly praktické možnosti křemenné kapiláry. Díky jejich pracím i Jorgensonově přínosu pro teorii došlo k prudkému nárůstu zájmu o kapilární elektroforézu.[2]

Průkopníkem micelární elektrokinetické chromatografie byl Terabe.[1]

Kapilární elektroforéza se vyznačuje vysokou účinností, všestranností a rychlostí analýzy s možností automatizace a detekcí přímo v kapiláře. Další výhodou je minimální spotřeba vzorku (řádově nanolitry) a rozpouštědel (řádově mililitry). Předností je také snadná úprava selektivity metody změnami v chemickém složení pracovního elektrolytu.[2]

Jednou z metod kapilární elektroforézy je micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Ta zahrnuje i principy chromatografické a díky užití elektricky nabitých micel v pracovním elektrolytu působících jako pseudostacionární fáze, umožňuje nejen separaci iontových, ale i neiontových sloučenin.[3]

Rozsah použití je velmi široký a zahrnuje řadu anorganických, organických i biologicky aktivních sloučenin, které jsou předmětem zájmu v nejrůznějších oborech.[3]

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

Kapilární elektroforéza je elektromigrační metoda založená na rozdílné rychlosti putování jednotlivých složek analyzované směsi v elektrickém poli. Lze ji aplikovat na látky povahy elektrolytů tvořené nízkomolekulárními ionty a na systémy elektricky nabitých koloidních částic. Migračním prostředím je vodivý roztok elektrolytů, který je v kontaktu s přívodními eletrodami proudového pole E, vyjádřená gradientem napětí v jednotkách $V.m^{-1}$. Sílu působící pohyb jednotlivé částice vystihuje součin intenzity elektrického pole a velikosti náboje částice. Proti pohybu částic působí tření v kapalném prostředí podmíněné jeho viskozitou. Třecí síla při pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). Skutečná rychlost migrace je výsledkem interakce těchto protichůdných vlivů. Pokud je u jednotlivých složek směsi rozdílná, dojde k jejich separaci.[4]

Mezi základní varianty kapilární elektroforézy patří:

- zónová elektroforéza
- izotachoforéza
- izoelektrická fokusace
- micelární elektrokinetická chromatografie
- kapilární elektrochromatografie
- mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
- kapilární gelová elektroforéza

Separační principy jsou u jednotlivých variant odlišné. V zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází k separaci na základě rozdílů efektivních pohyblivostí, v izoelektrické fokusaci na základě rozdílů v izoelektrických bodech a v micelární elektrokinetické chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a pseudostacionární fází.[1,5] V případě kapilární gelové elektroforézy jsou složky vzorku separovány podle velikosti a tvaru struktury.[6]

Separace probíhá v kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapěťového zdroje, které vytvářejí pole nutné pro separaci. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá analytický signál. Tento signál je zapsán liniovým zapisovačem nebo dále zpracován počítačem.[1]

3.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Při elektroforéze dochází k pohybu elektricky nabitých částic v roztoku působením elektrického pole. Směr pohybu je dán znaménkem jejich náboje a orientací elektrického pole.[1] Rychlost tohoto pohybu je přímo úměrná intenzitě použitého elektrického pole.[4]

$v = u \cdot E$

v - rychlost elektroforetického pohybu [$m.s^{-1}$]

u - elektroforetická pohyblivost [$m^2.V^{-1}.s^{-1}$]

E - intenzita elektrického pole [$V.m^{-1}$]

Elektroforetická pohyblivost (mobilita) vyjadřuje rychlost pohybu částice nebo iontu v jednotkovém elektrickém poli. Roste úměrně s nábojem a klesá s velikostí částice. Pohyblivostem bývá přisuzováno znaménko v souladu s nábojem příslušného iontu. Pro dvojici iont - prostředí je pohyblivost charakteristickou konstantou.[1]

3.1.2 Iontová pohyblivost

Kolem každého iontu v roztoku vytvářejí ionty opačného znaménka tzv. iontovou atmosféru. Interakce mezi ionty ovlivňuje výslednou pohyblivost sledovaného iontu - s rostoucí koncentrací elektrolytu elektroforetická pohyblivost iontu klesá. Když extrapolujeme koncentrační závislost elektroforetické pohyblivosti na nulovou iontovou sílu, získáme pohyblivost iontovou u_0. Ta se zvyšuje s rostoucí teplotou (zvýšení teploty o 1°C vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%).[1]

3.1.3 Skutečná pohyblivost

Skutečná pohyblivost je pohyblivost v reálném prostředí, která je zpravidla nižší než u_0. To je způsobeno především vzájemnými interakcemi iontů v konečně zředěných roztocích.[4]

3.1.4 Efektivní pohyblivost

Látky povahy slabých kyselin a bazí se v roztoku vyskytují ve dvou formách. Ve formě iontů s příslušnou pohyblivostí a ve formě neutrálních molekul, které nejsou schopny elektroforeticky putovat. Obě formy se vyskytují ve směsi v poměru vyjádřeném např. disociačním stupněm.[4] Jelikož ionizační rovnováha probíhá nepoměrně rychleji než elektromigrace,[1] nemůže dojít k rozdělení rovnovážné směsi na nepohyblivé molekuly a pohyblivé ionty. Směs putuje jednotnou rychlostí, která je úměrná disociačnímu stupni.[4] Výsledná pohyblivost se nazývá efektivní pohyblivost $\bar{u}$ a je dána vztahem:[1]

$$\bar{u} = \sum_{i=1}^{n} u_i x_i$$

u_i = pohyblivost jednotlivých iontových forem látky

x_i = molární zlomky

Volbou pH lze nastavit složení rovnovážné směsi a tím měnit její pohyblivost podle potřeby od nulové až po plnou iontovou. Úprava pH je tedy efektivní prostředek k dosažení optimálního dělení směsi kyselých nebo bazických látek.[4] Závislost efektivní mobility slabých jednosytných kyselin vyjadřuje vztah:

$$\bar{u} = \frac{u}{1+10^{(pK_a - pH)}}$$

Pro jednosytné baze je člen (pK_a-pH) nehrazen členem (pH-pK_a)[3]

Podobně lze popsat i migrační chování komplexů. Pokud ustanovení rovnovážného stavu probíhá rychlostí srovnatelnou nebo nižší než je rychlost elektromigrace, je možné od sebe oddělit jednotlivé formy téže látky.[1]

3.1.5 Migrační čas

Elektroforetickou pohyblivost nelze experimentálně přímo zjistit. Lze ji však vypočítat z migračního času t_m, což je čas potřebný pro migraci látky z místa nástřiku do detekční cely. Pokud je elektromigrace provázena hydrodynamickým tokem (např. v důsledku elektroosmózy), je třeba znát i migrační čas nenabitých částic t_0. Elektroforetická pohyblivost se vypočte podle vztahu:[1]

$$u = \frac{l_t l_s}{U}\left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0}\right)$$

l_t – celková délka kapiláry [m]

l_s – efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku po detektor) [m]

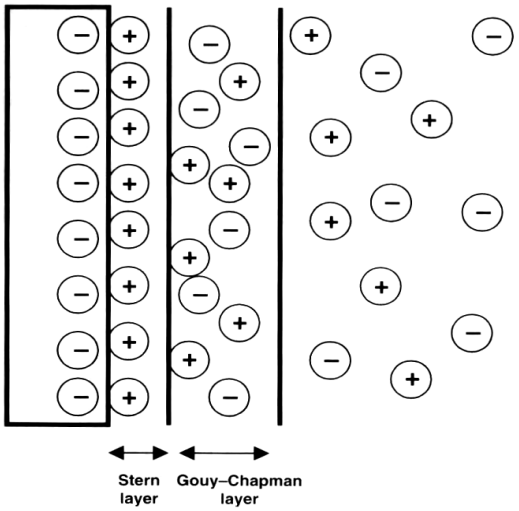
U – pracovní napětí [V]

t_m – migrační čas látky [s]

t_0 – migrační čas nenabitých částic [s]

3.1.6 Elektroosmotický tok

Podstatnou složkou HPCE operací je elektroosmotický tok. EOF je objemový tok kapaliny v kapiláře a je důsledkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry. Povrchy pevných látek mají ve vodném prostředí zpravidla přebytek negativních nábojů. To může vyplývat z ionizace povrchu a/nebo z adsorpce iontů na povrch. U křemenných kapilár dochází pravděpodobně k oběma procesům, ačkoliv EOF je nejsilněji kontrolován množstvím silanolových skupin (SiOH), které mohou existovat v aniontové formě (SiO^-). Negativní náboje těchto těchto skupin přitahují kationty tlumivého roztoku (protiionty) a dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy přilehlé ke stěně kapiláry (Obr. 1). Vytváří se tak zeta potenciál ζ. Když je na kapiláru vloženo napětí, kationty tvořící difúzní dvojvrstvu jsou přitahovány ke katodě. Protože jsou solvatovány, strhávají s sebou roztok v kapiláře.[2]



Obr. 1 Uspořádání iontů v kapiláře[7]

Velikost EOF je závislá na velikosti zeta potenciálu elektrické dvojvrstvy vytvořené na rozhraní proudící kapaliny a stěny kapiláry. Rychlost EOF je dána vztahem:[7]

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta}$$

ε – permitivita roztoku [$C^2J^{-1}m^{-1}$]

ζ – elektrokinetický potenciál [V]

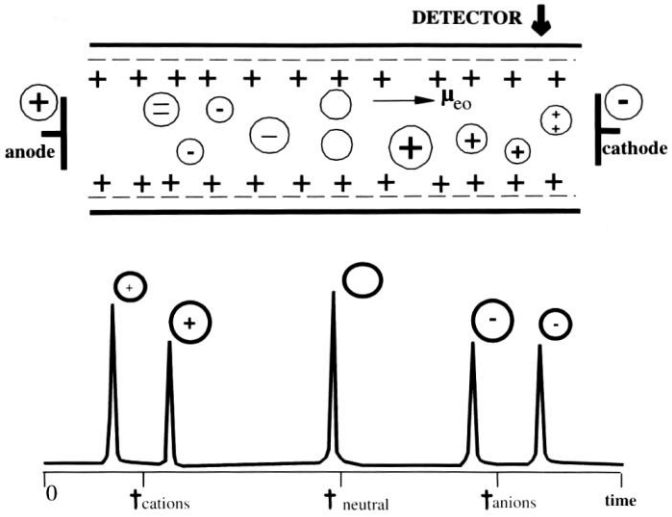
η – viskozita roztoku [N.s.m]

Zeta potenciál je určen povrchovým nábojem stěny kapiláry. Jelikož tento náboj silně závisí na pH, mění se velikost EOF s pH. Při vysokém pH, kdy jsou silanolové skupiny převážně deprotonizované, je EOF značně větší než při nízkém pH, kdy jsou tyto skupiny protonizované. EOF je významný od pH většího než 4. Zeta potenciál je také závislý na iontové síle pufru. Rostoucí iontová síla způsobuje kompresi dvojvrstvy, pokles zeta potenciálu a redukci EOF.[2]

Z praktického hlediska může být přítomnost EOF výhodná, protože způsobuje pohyb téměř všech látek stejným směrem bez ohledu na náboj. Za normálních podmínek (tj. negativně nabitý povrch kapiláry) EOF směřuje od anody ke katodě. Anionty jsou unášeny směrem ke katodě, jelikož velikost toku může být i víc než o řád větší než jejich elektroforetické mobility. Kationty, neutrální molekuly a anionty mohou být tudíž analyzovány zároveň, jelikož migrují stejným směrem. Kationty migrují

nejrychleji, neboť elektroforetické přitahování směrem ke katodě a EOF jsou ve stejném směru, neutrální látky jsou všechny neseny rychlostí EOF, ale nejsou od sebe separovány, anionty migrují nejpomaleji, protože jsou sice neseny ke katodě, ale přitahovány jsou k anodě (Obr.2).

Někdy je ovšem nutné EOF eliminovat. Proto se modifikuje vnitřní povrch kapiláry, blokují se volné silanolové skupiny zodpovědné za EOF. Používá se dynamické pokrývání (aditivy v pufru) nebo kovalentní pokrývání. Toto pokrývání může zvýšit, snížit nebo obrátit povrchový náboj a tím EOF.[2]



Obr. 2 Migrace elektricky nabitých a neutrálních látek v kapiláře působením EOF[7]

3.1.7 Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti

Chceme-li separovat všechny nebo alespoň hlavní komponenty vzorku, je třeba dosáhnout co největších rozdílů v jejich migračních časech. Nejjednodušší cestou je použití delší kapiláry. Tím se ovšem výrazně prodlužuje doba analýzy, a proto se tomuto kroku přistupuje až po vyčerpání dalších možností. Snahou je najít takové podmínky, při nichž jsou rozdíly elektroforetických pohyblivostí mezi sousedními zónami největší. Toho lze dosáhnout změnou pH pracovního elektrolytu, přídavkem vhodného komplexujícího činidla, látek vytvářejících hostitelské komplexy, detergentů, přídavkem nevodného rozpouštědla nebo použitím gelu.[1]

3.1.7.1 Vliv pH pracovního elektrolytu

Změna pH pracovního elektrolytu je nejjednodušším krokem vedoucím ke změně elektroforetické pohyblivosti látek povahy slabých kyselin a bazí. Se změnou pH dochází ke změně ionizace a tím ke změně efektivní pohyblivosti látky. Při hledání optimálního pH pro separaci složek roztoku je potřeba vycházet ze závislostí elektromigračních pohyblivostí těchto složek na pH pracovního elektrolytu. Vhodná hodnota pH je taková, při které je rozdíl pohyblivostí větší.[1]

3.1.7.2 Tvorba komplexů

Tvorbu komplexů lze využít pro zlepšení separace kovů, kdy se hledá vyhovující ligand a jeho koncentrace, nebo analogicky pro separaci ligandů, kdy se hledá vhodný kov.[1] Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů se podstatně odlišuje od pohyblivostí samotného analytu. Konstanta stability komplexu závisí na druhu kovu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivní analýze.[7]

3.1.7.3 Tvorba iontových asociátů

Tvorba iontových asociátů se využívá ke snížení rychlosti migrace analytů.[7] Ionty s vyšším nábojem vytvářejí díky silným coulombickým interakcím iontové asociáty s ionty opačného znaménka. Čím větší je náboj interagujících iontů, tím silnější jsou interakce a tím výraznější je snížení pohyblivostí. Nejčastěji jsou používány kyseliny a baze o vyšším náboji jako např. kyselina citrónová, kyselina fytová, spermin.[1]

3.1.7.4 Tvorba hostitelských komplexů

Využívány jsou separace v přítomnosti cyklodextrinů. Cyklodextriny (α, β, γ) jsou cyklické oligosacharidy tvořené 6-8 molekulami glukózy, které vytvářejí dutý válec, na jehož obvodu jsou hydroxylové skupiny a vnitřní jádro zůstává hydrofobní. Do tohoto jádra mohou vstupovat hydrofobní skupiny a vznikají tak různě pevné hostitelské komplexy. Poněvadž hydroxylové skupiny na povrchu jsou chirální, vytvářejí cyklodextriny s chirálními separandy komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich separaci. Podobné komplexy mohou vytvářet i další látky, např. crown ethery, což jsou opět cyklické sloučeniny.[1]

3.1.7.5 Vliv nevodných rozpouštědel

Přídavkem nevodného rozpouštědla k pracovnímu elektrolytu se mění solvatace separovaných iontů a viskozita elektrolytu. Tím dochází k ovlivnění iontové pohyblivosti, což může přispět ke zlepšení separace. Nevodné rozpouštědlo má také vliv na EOF. Nejčastěji se využívá methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril a dimethylsulfoxid.[1]

3.1.7.6 Vliv síťujícího prostředí

Síťující prostředí se využívá pro separaci polymerů, které se liší molekulovou hmotností, avšak ne hustotou elektrického náboje. Síťujícím prostředím s největší tradicí je polyakrylamidový gel. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší molekuly jsou při migraci síťujícím prostředím více zpomalovány. Dnes jsou gelové kapiláry nahrazovány roztoky lineárních polymerů, které vytvářejí síť. Nejčastěji používanými jsou deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a další.[1]

3.1.7.7 Vliv ionogenních smáčedel

Přídavek ionogenních smáčedel se využívá např. při SDS elektroforéze bílkovin, kdy je cílem vyrovnání nábojové hustoty mezi jednotlivými separandy tak, aby byla separace ovlivněna pouze molekulovými hmotnostmi proteinů.

Po překročení kritické micelární koncentrace začnou ze smáčedel vznikat micely. Hydrofobicita jádra ionogenních micel umožňuje vstup nepolárních látek a díky náboji micel i jejich elektroforetickou migraci. To je podstatou micelární elektrokinetické chromatografie.[1]

3.1.8 Děje ovlivňující separaci

3.1.8.1 Difúze

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré ohraničení. Vzdálenost, kterou urazí difúzí průměrný iont za dobu t, se označuje σ a vypočte se podle vztahu:

$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$

D – difúzní koeficient

σ^2 se nazývá rozptyl

Účinnost elektroforetické separace lze v CZE i MEKC vyjádřit počtem dosažených teoretických pater N:

$$N = \frac{u \cdot U}{2 \cdot D}$$

u – elektroforetická pohyblivost

U – napětí

Menší rozptyl (a větší počet teoretických pater) bude u větších molekul, které mají malý difúzní koeficient.[1]

3.1.8.2 Elektromigrační disperze

Rozdíl v pohyblivostech mezi analytem a spoluiontem pracovního elektrolytu se projevuje asymetrií elektroforetického píku. Pokud má analyt větší pohyblivost než spoluion, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Jestliže ionty na jeho čelním rozhraní opouštějí difúzí zónu, dostávají se do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší než by bylo při vlivu prosté difúze. Naopak na zadním rozhraní se ionty opouštějící zónu dostávají do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, jejich migrační rychlost se zvýší a jsou vráceny zpět. Dochází tak k zaostřování zadního rozraní zóny. Analogicky se tvoří asymetrická zóna při migraci analytu o menší pohyblivosti než má spoluion pracovního elektrolytu – čelní rozhraní je ostré a zadní je difúzní. Zóna iontu, který má stejnou pohyblivost jako spoluion pracovního elektrolytu, nebude elektromigrační disperzí ovlivněna. Čím větší je rozdíl mezi pohyblivostmi analytu a spoluiontu, tím je zóna více deformovaná.[1]

3.1.8.3 Jouleův ohřev

Průchod elektrického proudu pracovním elektrolytem způsobuje tvorbu Jouleova tepla. Zvýšení teploty vede ke zvýšení pohyblivosti iontů a je dosaženo kratších migračních časů.[1] Produkce tepla je závislá na rozměrech kapiláry, vodivosti elektrolytu a vloženém napětí.[2] Při chlazení dochází ke vzniku teplotního gradientu uvnitř kapiláry s nejvyšší teplotou ve středu. Ionty pohybující se v ose kapiláry se pohybují nejrychleji, ionty na obvodu naopak nejpomaleji. Detektor zaznamenává tento jev jako rozšíření zóny.[1]

3.1.8.4 Sorpce

Negativní vliv na kvalitu separace má i interakce solutu se stěnou kapiláry. Pokud jsou její podstatou silné coulombické interakce, může dojít k úplné sorpci analytu na stěnu kapiláry, což se projeví absencí píků v elektroforeogramu. V lepším případě vede sorpce k asymetrii a chvostování píku. Sorpcím se dá předcházet tvorbou ochranného filmu na stěně kapiláry.[1]

3.1.8.5 Délka detekční cely

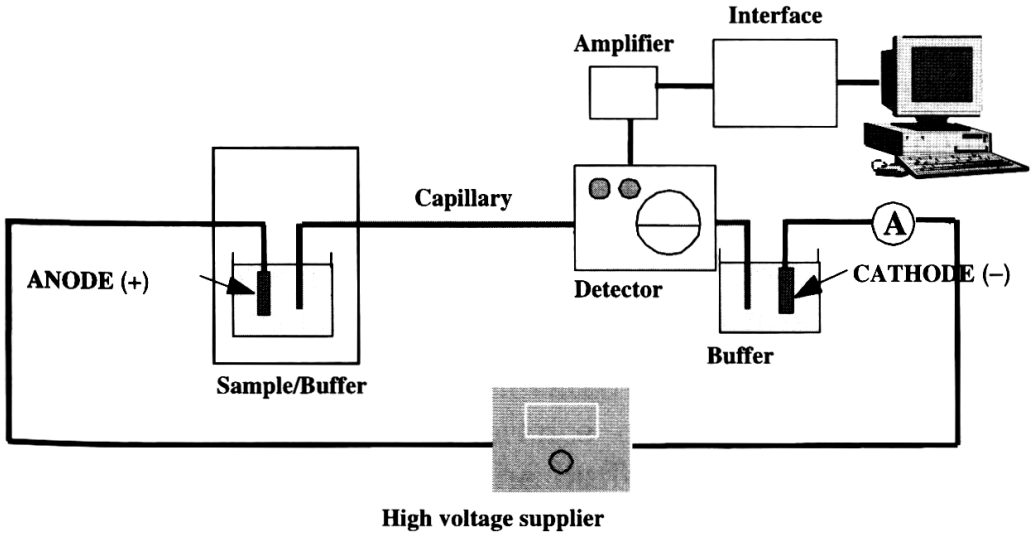
Pro zvýšení účinnosti separace je žádoucí délku detekční cely minimalizovat, to však vede ke snížení detekční citlivosti. Délka detekční cely je tedy kompromisem mezi účinností separace a citlivostí detekce.[1]

3.1.8.6 Délka nástřiku

Délku nástřikového pulsu je vhodné minimalizovat.[1]

3.1.9 Instrumentální uspořádání

Zařízení pro kapilární elektroforézu vždy obsahuje separační kapiláru, zdroj napětí, dávkovač vzorku, detektor a zařízení na zpracování analytického signálu.[1]



Obr. 3 Schéma instrumentálního uspořádání pro kapilární elektroforézu[7]

3.1.9.1 Separační kapilára

Nejčastěji používané jsou křemenné kapiláry, které jsou z důvodu lepší mechanické pevnosti pokryty ochrannou vrstvou polyimidu. Tato ochranná vrstva musí být v místě detekční cely odstraněna. Výjimečně jsou užívány kapiláry teflonové a skleněné. Vnitřní průměr kapiláry je obvykle 50 – 75 μm. Celková délka kapiláry bývá 20 – 100 cm.[1]

3.1.9.2 Zdroj vysokého napětí

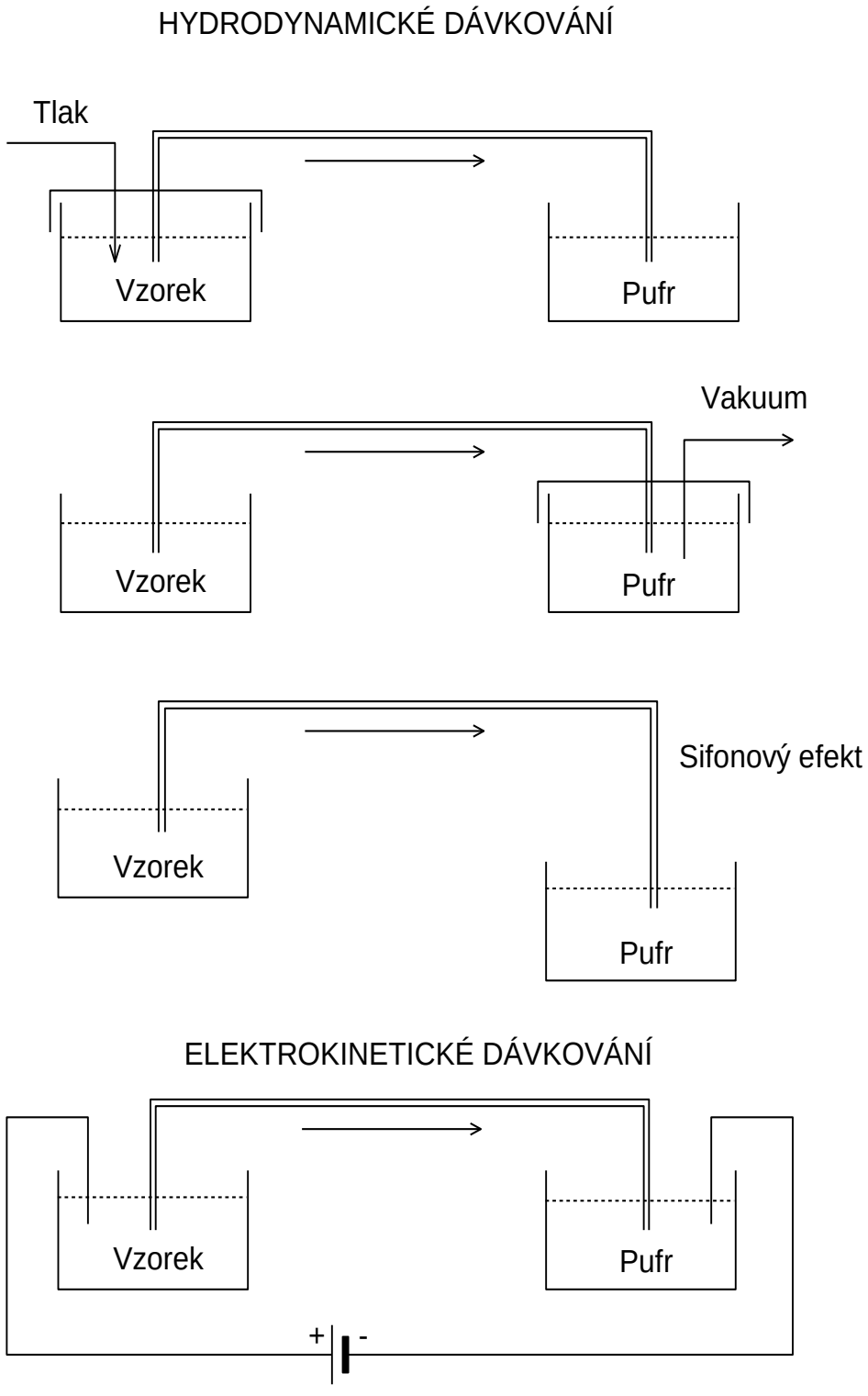
Do zásobníků pracovního elektrolytu jsou umístěny elektrody vysokonapěťového zdroje o rozsahu 0 – 30 kV. Vyšší napětí se neužívá kvůli nebezpečí ionizace vzduchu a elektrických výbojů.[1] Měla by zde být možnost přepínání polarity elektrod.[2]

3.1.9.3 Dávkování vzorku

Dávkování vzorku do kapiláry má vliv na kvantitativní výsledky měření. Nejběžnější je dávkování hydrodynamické a elektrokinetické.

Hydrodynamické dávkování spočívá ve vtlačování úzkého sloupce roztoku vzorku do kapiláry vlivem tlakových rozdílů podél kapiláry. Existují různé mechanismy pro dosažení tlakového spádu. Jedná se o aplikaci tlaku na „dávkovací“ konec kapiláry, použití vakua na distálním konci kapiláry nebo využití tzv. sifonového efektu, kdy je rezervoár se vzorkem na určitou dobu umístěn do větší výšky než výstupní zásobník. Při hydrodynamickém dávkování je množství vneseného vzorku téměř nezávislé na složení vzorku. Objem vneseného vzorku je funkcí rozměrů kapiláry, viskozity pufru v kapiláře, aplikovaného tlaku a času. Obvykle se dávkovací tlak pohybuje v rozmezí 25 - 100 mbar a čas 0,5 – 5 s. U sifonového efektu je rezervoár vzorku zdvižen o 5 – 10 cm na 10 – 30 s.[2]

Elektrokinetické (elektromigrační) dávkování spočívá v tom, že vstupní nádobka s pracovním elektrolytem je nahrazena nádobkou se vzorkem a po stanovenou dobu se aplikuje dávkovací napětí, které je několikrát nižší než pracovní. Vnesené množství je závislé na elektroforetické mobilitě jednotlivých solutů. Navíc je závislé na EOF a koncentraci vzorku.[2] Je to jediný možný způsob aplikace vzorku v kapilární gelové elektroforéze.[2]



Obr. 4 Způsoby dávkování v kapilární elektroforéze[2]

3.1.9.4 Detekce

Vhodný detektor je volen s ohledem na jeho citlivost, selektivitu, linearitu záznamu a hladinu šumu. Vhodně zvolený detektor přispívá ke správné identifikaci, neboť získaný signál je závislý na charakteru analytu.[8] U kapilární elektroforézy je nejběžnější on-line detekce, kdy je analytický signál získáván přímo na kapiláře.[1]

UV absorpce

UV (- VIS) absorpce je nejrozšířenější metodou detekce v kapilární elektroforéze, především kvůli své téměř univerzální povaze. S křemennými kapilárami může být užito detekce od 200 nm nahoru přes viditelnou oblast.[2]

Většina analytů totiž obsahuje chromofory, které umožňují absorpci v UV oblasti bez předchozí derivatizace. Vzhledem k velkému počtu sloučenin absorbujících v UV oblasti však dochází k častým interferencím, což vede k překrývání píků analyzovaných složek.[7] Pro identifikaci elektroforetických píků je užitečný diode-array detektor. Polychromatický paprsek světla je po průchodu kapilárou rozložen na jednotlivé pásy, z nichž každý je detekován jednou fotodiodou. Výsledkem je trojrozměrný elektroforeogram zachycující spektrum pro každý pík.[1]

Pro látky, které v UV oblasti neabsorbují, lze použít nepřímou UV detekci. Využívá se absorbujícího iontu, který je přítomen v pracovním elektrolytu.[1]

Laserem indukovaná fluorescence

Fluorescence a především laserem indukovaná fluorescence je vysoce citlivá metoda. Protože je jen málo sloučenin, které obsahují fluorofory, je většinou nutná jejich derivatizace. Pomocí fluorescenčních činidel jsou tyto látky převáděny na fluoreskující sloučeniny. Mezi fluorescenční činidla patří např. dansylchlorid, fluoresceinisothiokyanát nebo flureskamin. Je také možno využít nepřímé fluorescenční detekce.[1]

Hmotnostní spektrometrie

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostně spektrometrickou detekcí (CE-MS) je kombinace metod využívající migrace iontů v roztoku a ve vakuu. Pro každou látku lze získat hmotnostní spektrum, jež usnadňuje identifikaci píků.[1]

Amperometrie

Tímto způsobem lze snadno detekovat oxidovatelné ionty. Citlivost detekce není závislá na průměru kapiláry.[1]

Konduktometrie

Jde o univerzální způsob detekce, kde je využito rozdílné vodivosti zón analytu a pracovního elektrolytu.[1]

3.1.10 Aplikace kapilární elektroforézy

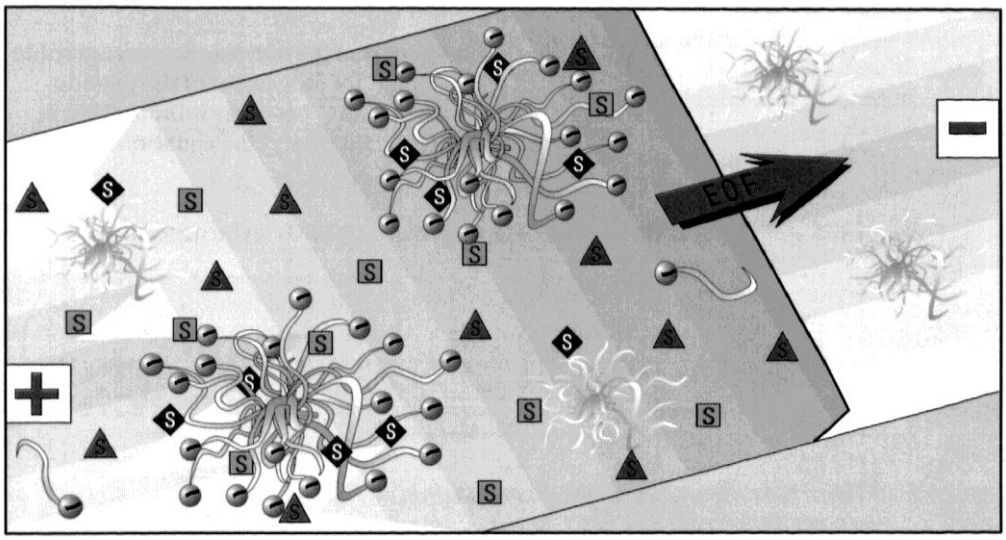
Využití kapilární elektroforézy je rozsáhlé a zasahuje do mnoha vědeckých i praktických oblastí. Lze ji použít pro určení aminokyselinového složení hydrolyzátu neznámých proteinů, stanovení sekvence aminokyselin v bílkovinách, studium peptidových map či k analýze nukleotidů a nukleových kyselin (určování sekvencí bazí v molekule DNA). Při analýze tělních tekutin se kapilární elektroforéza uplatňuje např. při separaci sérových bílkovin, studiu lipoproteinů, patologických metabolitů nebo stanovení toxických agens a monitorování lékových hladin. Možná je i analýza léčiv, potravin, průmyslových a mnoha dalších vzorků.[1]

3.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRAFIE

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), jež je v literatuře zmiňována též jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), byla představena v roce 1984 Terabem.[3] Její hlavní předností oproti jiným technikám kapilární elektroforézy je možnost separace nejen nabitých, ale i nenabitých solutů. Separace neutrálních látek je dosaženo použitím surfaktantu v pufru. Při koncentraci nad kritickou micelární koncentrací (CMC) jsou tvořeny micely, ve kterých jsou molekuly surfaktantu orientovány tak, že hydrofobní řetězce směřují do středu, aby se vyhnuly interakci s hydrofilním pufrem a polární nabité části jsou na povrchu micely.[2] Analyt vstupuje do micely v množství, které lze vyjádřit rozdělovacím koeficientem micela – voda P_{mw}.[3] Surfaktant a tudíž micely jsou obvykle nabité a migrují buď s EOF nebo proti němu v závislosti na náboji. Rychlost migrace nabitých micel v elektrickém poli je úměrná hustotě jejich náboje.

Během migrace mohou micely interagovat se soluty v určitém chromatografickém smyslu prostřednictvím hydrofobních a elektrostatických interakcí. Pro neutrální látky je to jen rozdělování do vnitřku a vnějšku micely, co způsobuje separaci. Čím víc solut interaguje s anionaktivní micelou, tím delší je jeho migrační čas,

poněvadž micela ho nese proti EOF. Když solut není v kontaktu s micelou, je jednoduše nesen EOF. Více hydrofobní sloučeniny interagují silněji s micelou a jsou „zadržovány" déle.[2] Nenabité soluty potom mohou být separovány díky rozdílným rozdělovacím koeficientům P_{mw}.[3]



Obr. 5 Separace v MEKC,[2] s - solut

Vedle primárního rozdělovacího mechanismu do micel se ve vodném roztoku uplatňují další chemické rovnováhy jako acidobazická, iontové párování nebo tvorba komplexů kovů s ligandy. Uplatnění acidobazické rovnováhy je zvláště důležité, protože řada farmaceuticky významných sloučenin je povahy slabých bazí nebo kyselin. Retenční chování ionizovatelných sloučenin je mnohem více komplikované než nenabitých solutů. Obě, nabité i nenabité, formy solutů mohou interagovat a migrovat s micelami. Nabitý solut migruje ve vodném prostředí také svou vlastní elektroforetickou mobilitou.[3]

Jelikož separační proces v MEKC spojuje hydrofobní a polární interakce, rozdělovací mechanismus a elektromigraci, může být na MEKC nahlíženo jako na hybrid RP-LC a CZE. Migrující micely, nebo jiný typ organizovaného média, bývají považovány za pseudostacionární fázi.[3]

3.2.1 Pseudostacionární fáze

Pseudostacionární fáze mohou být kategorizovány do dvou hlavních skupin. První a nejrozšířenější užívanou skupinou jsou micely, druhá skupina se skládá z kovalentně vázaných nebo polymerizovaných nabitých útvarů.[3]

3.2.1.1 Micely

Jak již bylo řečeno, micely jsou vytvářeny molekulami surfaktantů. Surfaktanty jsou amfifilní molekuly, které obsahují hydrofobní a polární část. Mohou být rozděleny podle náboje polární skupiny (neionogenní, aniontové, kationtové a amfoterní surfaktanty) nebo podle povahy hydrofobní části (uhlovodíky, žlučové soli a fluorované surfaktanty).

Nad kritickou micelární koncentrací surfaktanty začínají tvořit agregáty, které jsou v dynamické rovnováze s monomery v roztoku. Nejen hodnota CMC, ale i množství monomerů surfaktantu v agregované formě (agregační číslo) a velikost micel se mezi surfaktanty liší. Např. surfaktanty s alkylovými řetězci tvoří „ježaté“ micely s průměrem mezi 3 a 6 nm a agregačním číslem mezi 30 a 100. Na druhou stranu micely žlučových solí mají mnohem menší agregační číslo (typicky 2-10 pro primární micely) pravděpodobně se šroubovicovou strukturou. Pro MEKC separaci nenabitých solutů musí být pseudostacionární fáze nabitá, tedy neiontové a amfoterní surfaktanty mohou být užity jen ve smíšených micelách s nabitými surfaktanty.[3]

3.2.1.2 Polymerní fáze

Tato skupina zahrnuje pseudostacionární fáze, které mají rozdílné strukturální vlastnosti, ale sdílejí jeden společný rys: obsahují kovalentní vazby. Příklady tří typů, které byly použity v MEKC, jsou polymerní micely (monomerní surfaktanty jsou kovalentně vázány polymerizačním procesem), kaskádovité makromolekuly (dendritická struktura) a iontové blokové kopolymery. Tyto struktury poskytují místa pro interakce a mohou hrát efektivně roli pseudostacionární fáze v MEKC.[3]

3.2.2 Migrace v MEKC

Aniontové micely jsou přitahovány směrem k anodě, což je v nepotažené kapiláře proti směru EOF. Poněvadž EOF je v neutrálním nebo bazickém prostředí silnější než migrační rychlost micel, jejich výsledný pohyb je ve směru EOF, jsou tedy neseny ke katodě. Jestliže jsou užity kationtové micely, je stěna kapiláry potažena pozitivně nabitými surfaktanty, které častokrát vedou ke zvratu směru EOF. Je proto nezbytné obrátit polaritu elektrod k zajištění migrace kationtových micel a v důsledku toho nenabitých solutů skrz detekční okno.

Tzv. „eluční okno“ v MEKC je definováno hraničním chováním analytů. Analyty, které neinteragují s micelami ($P_{mw} \sim 0$), stráví všechen svůj migrační čas v základní vodné fázi a migrují elektroosmotickou mobilitou. Jsou to typicky nenabité polární molekuly jako methanol nebo acetonitril, které jsou elektroosmotickými markery a eluují při t_{eo}. Druhý případ je charakterizován elucí analytů, které interagují tak silně s micelami ($P_{mw} \sim \infty$), že tráví všechen svůj migrační čas uvnitř micel. t_{mc} markery jsou typicky velmi hydrofobní sloučeniny, které jsou špatně rozpustné ve vodném prostředí – uváděné příklady jsou Sudan III a dodekanofenon. Eluční časy pro tyto analyty se shodují s micelárním migračním časem, t_{mc}. Všechny nenabité soluty by měly být separovány mezi migračním časem nezadržovaného solutu, t_{eo}, a plně zadržovaného solutu, t_{mc}. Separovatelnost analytů může být zvýšena užitím organických modifikátorů nebo smíšených micel nebo modifikací stěn kapiláry.[3]

3.2.3 Kapacitní faktor

Jako v chromatografii, kapacitní faktor v MEKC k' je definován jako poměr látkového množství solutu v micelární pseudostacionární fázi n_{mc} a látkového množství v základní vodné fázi n_{aq}. Kapacitní faktor je přímo úměrný rozdělovacímu koeficientu P_{mw} a fázovému poměru Φ.

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = P_{mw} \cdot \Phi$$

Kapacitní faktor v MEKC může být určen užitím údajů o migračním času:[3]

$$k' = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo}\left[1 - \left(\frac{t_r}{t_{mc}}\right)\right]}$$

t_r – retenční čas solutu

t_{eo} – retenční čas neinteragujícího solutu (mrtvý čas)

t_{mc} – retenční čas micely

3.2.4 Rozlišení

Základní rovnice rozlišení R_S pro nenabité soluty v MEKC má stejný tvar jako v chromatografii. Ukazuje, že rozlišení závisí na třech členech vztahujících se k účinnosti, selektivitě a retenci, čtvrtý člen je jedinečný v MEKC a reprezentuje fenomén elučního okna.[3]

$$R_S = \left(\frac{N^{1/2}}{4}\right)\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2'}{1 + k_2'}\right)\left[\frac{1 - \left(\frac{t_{eo}}{t_{mc}}\right)}{1 + \left(\frac{t_{eo}}{t_{mc}}\right)k_2'}\right]$$

N – počet teoretických pater

α – separační faktor: $\alpha = k_2'/k_1'$

k_1', k_2' – kapacitní faktory solutů

t_{eo} – retenční čas neinteragujícího solutu (mrtvý čas)

t_{mc} – retenční čas micely

3.2.5 Faktory ovlivňující separaci

V MEKC je rozlišení funkcí retence (k'), selektivity (α), účinnosti (N) a velikosti elučního okna (t_{mc}/ t_{eo}). Tyto jsou ovlivněny chemickým složením micelárních roztoků jako je druh a koncentrace surfaktantu, typ a množství modifikátorů, pH a iontová síla. Dále se uplatňuje vliv experimentálních podmínek jako je teplota a velikost aplikovaného napětí.[3]

3.2.5.1 Koncentrace surfaktantu

Koncentrace surfaktantu zásadním způsobem ovlivňuje rozlišení. Může pozměnit velikost elučního okna a účinnost, nicméně má minimální vliv na selektivitu.[3]

3.2.5.2 Typy pseudostacionární fáze

Charakter hydrofobní části molekuly surfaktantu nebo typ jeho protiiontu může ovlivnit retenci, selektivitu, velikost elučního okna a účinnost v MEKC.[3]

Aniontové surfaktanty s alkylovým řetězcem

Aniontové surfaktanty s alkylovým řetězcem, především dodecylsíran sodný (SDS), jsou nejrozšířeněji užívaným typem surfaktantu. Výhodou SDS je jeho vysoká rozpustnost ve vodě, nízká CMC, malá UV molární absorpce dokonce i při nízkých vlnových délkách, dosažitelnost a cena. Dalším surfaktantem této skupiny je např. tetradecylsíran sodný.[3]

Kationtové surfaktanty

Z kationtových surfaktantů je používán např. dodecyltrimethylamonium-bromid, cetyltrimethylamoniumbromid, cetylmethylamoniumchlorid.[3]

Neiontové a amfoterní surfaktanty

Surfaktanty s nulovým nábojem jako jsou neiontové a amfoterní surfaktanty mohou být samostatně použity pro separace nabitých sloučenin jako např. aminokyselin a polypeptidů. Protože tyto surfaktanty nezvyšují vodivost pufru, mohou být užity ve vysokých koncentracích, může být vloženo vysoké napětí a použity kapiláry o vysokém vnitřním průměru.[3]

Žlučové soli

Soli žlučových kyselin jsou užívány např. pro separace kortikosteroidů. Ve srovnání s SDS vykazují větší selektivitu. Mohou být použity vyšší koncentrace organických modifikátorů (30 % organického rozpouštědla) bez porušení struktury těchto micel.[3]

Další typy surfaktantů

Méně rozšířené je užití fluorovaných surfaktantů. Zkoušeny byly také borátové komplexní surfaktanty, u kterých může být hustota náboje na micelách ovlivněna úpravou pH a koncentrací borátu. Některé obsahují chirální funkční skupiny a mohou proto být použity pro chirální separace stejně jako nové, mnohdy syntetické chirální aniontové surfaktanty či polymerizované chirální micely.[3]

Smíšené micely

Někdy nelze najít surfaktant, který by umožňoval dostatečné rozlišení. Zlepšení lze dosáhnout užitím smíšených micel. Kombinování rozmanitých surfaktantů s rozdílnými interaktivními vlastnostmi může vést k značným změnám v selektivitě pro danou směs.[3]

Polymerní pseudostacionární fáze

Základní výhodou užití polymerních fází je jejich stabilita v přítomnosti vyšších koncentrací organických modifikátorů. Ty jsou přitom nezbytné pro separaci vysoce hydrofobních solutů, které silně interagují s micelami. Polymerní micely s chirálními skupinami jsou využitelné pro separaci optických isomerů.[3]

3.2.5.3 Modifikátory

Modifikátory jako organická rozpouštědla, cyklodextriny a močovina jsou součástí vodných roztoků pufrů, aby redukovaly retenční faktory solutů silně vázaných do micel. Jejich přítomnost také může vést k vyšší selektivitě.[3]

Organické modifikátory jako methanol a acetonitril jsou rozsáhle využívány ke zdokonalení separací hydrofobních sloučenin, které interagují silně s micelami a migrují blízko migračního času micel nebo s micelami. Zatímco tyto polární modifikátory vykazují malou nebo žádnou interakci s micelami, jsou také používány hydrofobní alkoholy s delším řetězcem, jejichž interakce s micelami je větší a tím ovlivňování separace solutů odlišné.[3]

Močovina redukuje interakce hydrofobních sloučenin s micelami zvýšením jejich solubility ve vodných roztocích.[3]

Cyklodextriny mají hydrofobní kavitu, která představuje alternativní možnost pro interakci se solutem vedle standardní interakce solut – micela. Poněvadž nenabité cyklodextriny migrují s EOF rychlostí a v opačném směru než kam jsou přitahovány aniontové micely, „čistý“ retenční čas solutů se snižuje. Výsledkem je, že hydrofobní soluty, které by jinak eluovaly s micelami, mohou být lépe separovány.[3]

3.2.5.4 Vliv pH a teploty

Úprava pH hraje významnou roli u látek charakteru slabých kyselin nebo bazí, protože pH určuje stupeň acidobazické rovnováhy a tím velikost náboje na molekule a sílu interakce.[3]

Teplota není široce užívaný parametr k ovlivnění separace, jelikož její efekt na selektivitu není významný. Má ale velký vliv na viskozitu (a proto EOF) a toto může být signifikantní.[3]

3.3 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)

Migračním prostředím je při CZE jediný pracovní elektrolyt, který zaujímá celý migrační prostor. Jeho složení je všude stejné, v důsledku čehož je v celé kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé složky směsi putují rozdílnými rychlostmi úměrnými jejich pohyblivostem.

Po určité době migrace vznikne řada prostorově oddělených zón, které patří jednotlivým složkám původní směsi.[7] Vlivem difúze se zónová rozhraní s časem rozmývají.[1]

3.4 KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (ITP)

Specifikem této metody je přítomnost ostrých zónových rozhraní oddělujících odseparované zóny jednotlivých složek vzorku, které migrují za sebou stejnou rychlostí.

Vzorek je umístěn mezi dva různé elektrolyty – vedoucí a koncový.

Při ITP lze separovat jen složky migrující jedním směrem, během jedné analýzy lze tak rozdělit pouze kationty nebo jen anionty. ITP se proto dělí na kationtovou a aniontovou.[9]

3.5 IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

Jedná se o metodu, kterou lze použít pro dělení amfolytů. Při IEF dochází k oddělení látek v migračním prostředí s pH gradientem na základě rozdílných hodnot izoelektrických bodů. V místě, kde je pH prostředí rovno pI analytu, se látka stává elektroneutrální a dojde k jejímu zakoncentrování v tomto místě. Vzniká tak ostrá zóna analytu.[4]

3.6 KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE (CEC)

Kapilární elektrochromatografie je analytická separační technika kombinující v principu výhody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (vysoká selektivita) a kapilární elektroforézy (vysoká účinnost). Tok mobilní fáze kolonou je udržován spíše elektrickým polem než aplikovaným tlakem. Separační princip spočívá běžněji v rozdělování mezi kapalnou a pevnou fází, ačkoliv při použití pro nabité analyty lze očekávat rozdílné elektromigrace.[10] CEC využívá metod elektrického pole při použití mikro-HPLC kolon. Její předností je také vysoká rychlost separace. Výhodou CEC oproti většině metod CE je schopnost separovat molekuly, které mají stejný poměr náboj/hmota či jsou nenabité.[11]

3.7 MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRAFIE (MEEKC)

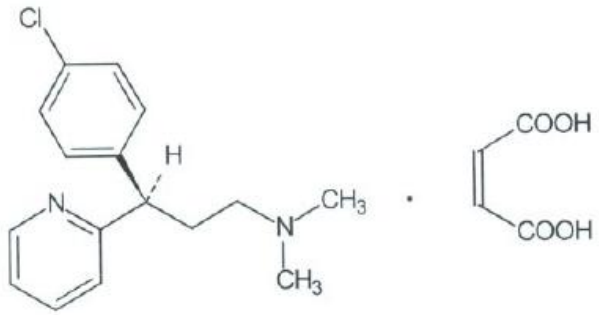
MEEKC je další variantou CE, ve které je separační princip obdobný jako v micelární elektrokinetické chromatografii. Pro neutrální sloučeniny je chromatografický a zahrnuje rozdělování solutu mezi vodnou a olejovou fází v mikroemulzním pufru. Ionizované analyty jsou separovány elektroforeticky.

Metoda je používána především pro vysoce hydrofobní soluty, lze ji však použít i k separaci jak iontových, tak neutrálních sloučenin, ve vodě rozpustných i nerozpustných.[5]

3.8 KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Kapilární gelová elektroforéza neboli elektroforéza v síťujícím prostředí využívá pro separaci kapiláru naplněnou gelem nebo roztokem polymeru, které působí jako molekulové síto. Složky vzorku migrují v kapiláře podle vloženého elektrického pole a jsou zadržovány síťujícím prostředím různou měrou podle velikosti a tvaru struktury. Metoda je využívána především pro analýzu vzorků biopolymerů jako např. proteinů a nukleových kyselin. Separuje molekuly na základě rozdílů jak náboje tak velikosti a umožňuje tedy i separaci polymerů, které mají stejný poměr náboje k hmotě, ale liší se molekulovou hmotností. Někdy je též používána pro měření molekulové hmotnosti biopolymerů.[6]

3.9 CHLORFENAMIN MALEÁT



Chlorphenamini maleas

$C_{20}H_{23}ClN_2O_4$

Mr = 390,87[12]

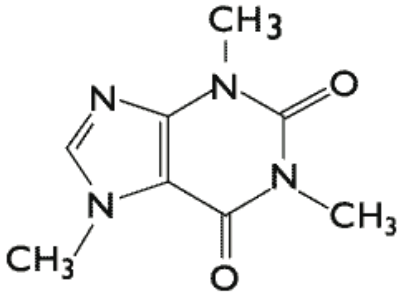
Chlorfenamin patří mezi H_1- antihistaminika, patřící do podskupiny alkylaminů. Jde o stabilní aminy rozpustné v tucích. H_1- antihistaminika blokují účinky histaminu na H_1- receptorech mechanismem reverzibilního kompetitivního antagonismu.[13]

Chlorfenamin je rychle a úplně absorbován z gastrointestinálního traktu, maximální hladiny v plazmě je dosaženo za 2- 6 hodin, z velké části je metabolizován při prvním průchodu játry. Vylučuje se močí z části nezměněn (20- 35%), z části ve formě metabolitů.[14]

Použití chlorfenaminu je poměrně úzké, obsažen je pouze v kombinovaných přípravcích ke zmírnění symptomů chřipky a nachlazení, kde snižuje otok sliznice, rýmu a slzení.[15]

Nežádoucí účinky mohou být dány vlivem chlorfenaminu na H_1- receptory v CNS (únava až spánek) a muskarinové receptory (sucho v ústech, retence moči, zácpa, změny srdeční frekvence). Antimuskarinové nežádoucí účinky mohou být ještě zvýšeny současným podáváním inhibitorů MAO. Dále jsou také popisovány dyskinéze, psychotické reakce, gastrointestinální obtíže jako nauzea, vomitus, pocit plnosti, změny chuti k jídlu. Ojediněle se uvádějí kožní projevy a možnost fotosenzibilizace.[13]

3.10 KOFEIN



Coffeinum

$C_8H_{10}N_4O_2$

1,3,7-trimethylxanthin

Mr = 194,19[12]

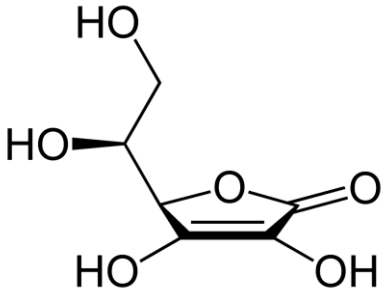
Kofein je řazen do skupiny psychostimulancií, podskupiny metylxantinů, kam dále patří také theofylin a theobromin. Metylxantiny se z trávicího ústrojí vstřebávají nepravidelně. Distribuují se do všech tkání, přecházejí do slin, placentární bariérou, do mléka. V organismu se demetylují a oxidují, poločas eliminace kofeinu je 3 - 5 hodin, vylučován je močí ve formě inaktivních metabolitů.[13]

Kofein, kromě toho, že blokuje fosfodiesterázu, čímž snižuje inaktivaci cAMP (ale i cGMP), je také antagonistou adenosinových receptorů. Má tedy účinky stimulační: stimuluje CNS, má anxiogenní účinky, snižuje průtok krve mozkem, zvyšuje uvolňování reninu, podporuje diurézu, v žaludku podporuje sekreci HCl, stimuluje respirační a vazomotorické centrum, má pozitivně inotropní vliv na myokard. Způsobuje dilataci některých arteriol a periferních cév, proto obvykle nezpůsobuje významnější vzestup krevního tlaku.

Mezi kontraindikace patří palpitace, tachyarytmie, hypertyreóza, úzkostné stavy, insomnie, těžší porucha funkce jater, nervozita, neklid, třes, průjem, vředová choroba gastroduodenální.[13]

Kofein je obsažen v kávě, čaji, kakau a mnoha nealkoholických nápojích.[13] Je také součástí některých kombinovaných farmaceutických přípravků, kde potencuje účinek analgetik, svými psychostimulačními účinky tlumí únavu a ospalost a působí jako centrální analeptikum dýchání a oběhu zvláště při horečnatých a infekčních onemocněních.[15]

3.11 KYSELINA ASKORBOVÁ



Acidum ascorbicum

synonymum: vitamin C

$C_6H_8O_6$

Mr = 176,13[12]

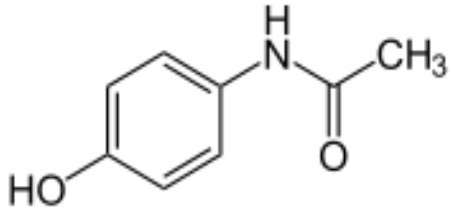
Vitamin C patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Jeho funkce v organismu je mnohostranná. Vitamin C je důležitý pro aktivitu mnoha enzymů, udržuje určitý redoxpotenciál a rovnováhu mezi některými enzymatickými skupinami. Má velký význam především pro růst a udržování zdravých kostí, dásní, zubů a krevních cév, dále pro tvorbu některých neurotransmiterů, hormonů nadledvin, pro reakci imunitního systému na infekce, pro hojení ran a pro absorpci železa z potravy. Mírnější deficience se projevují slabostí, celkovou únavou a bolestí, otoky dásní a krvácení z nosu. Závažnější deficience způsobuje kurděje a anémii. Denní potřeba vitaminu C pro dospělé je 60 mg, u kuřáků je potřeba vitaminu C až trojnásobná ve srovnání s nekuřáky.[14]

Vitamin C se snadno resorbuje z gastrointestinálního traktu a je rozsáhle distribuován do tkání. Reverzibilně se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou. Částečně je metabolizován na látky, které se vylučují močí, hlavním metabolitem je kyselina oxalová. Po překročení ledvinového prahu se vitamin C vylučuje nezměněný močí. Vitamin C prochází placentární bariérou a vylučuje se do mateřského mléka.[15]

Při užívání dávek vyšších než 1 g může dojít k zvýšenému výskytu nežádoucích účinků jako je iritace ezofageální a žaludeční sliznice s nauzeou, popř. vomitem; exantém, bolest hlavy, celková slabost,nespavost. Dávka vyšší než 4 g denně může zvýšit výskyt oxalátových ledvinných kamenů.[14]

Vitamin C se užívá při prevenci nebo terapii stavů nedostatku vitaminu C v organismu, zejména v období zvýšených nároků v dětství, růstu, v těhotenství, laktaci, při namáhavé práci, sportu, při infekčních nemocech nebo v rekonvalescenci.[15]

3.12 PARACETAMOL



Paracetamolum

$C_8H_9NO_2$

Mr = 151,16[12]

Paracetamol je v současnosti jediný používaný anilinový derivát. Jde o výborně tolerované účinné analgetikum, antipyretikum bez významného protizánětlivého působení. Jeho antipyretické účinky se vysvětlují inhibicí cyklooxygenázy v hypotalamu, centrální mechanismus se podílí též na jeho analgetickém účinku (nepřímé působení na serotoninové 5-HT_3-receptory v míše). Na periferii paracetamol urychluje přeměnu prostaglandinu G_2 na PGH_2 a tím snižuje prozánětlivé působení nestabilního endoperoxidu PGG_2. Analgeticko-antipyretické účinky paracetamolu jsou srovnatelné s kyselinou acetylsalicylovou, proti níž má mnohem lepší gastrointestinální snášenlivost a neovlivňuje krevní srážlivost.[13]

Paracetamol se rychle a téměř úplně vstřebává z gastrointestinálního traktu i z rekta, rychle se distribuuje do všech tkání a tělesných tekutin. Prochází hematoencefalickou bariérou, do slin a do mateřského mléka. Metabolizace probíhá v játrech, metabolity jsou vylučovány ledvinami.[15]

Po běžných terapeutických dávkách (jednotlivá dávka p.o. je 0.5 g) je výskyt nežádoucích účinků malý, někdy se objeví alergické kožní reakce. Při akutním předávkování (10-15 g) dochází k vyčerpání zásob glutathionu v játrech a vzniklý reaktivní metabolit N-acetylbenzochininimin poškozuje jaterní buňky a vyvolává selhání jater, které může skončit smrtí. Léčba spočívá v i.v. podání specifického antidota N-acetylcysteinu (donátor -SH skupin), nejpozději do 10 hodin po intoxikaci, i když také pozdější podání může být ještě prospěšné.[13]

Podání paracetamolu je kontraindikováno při deficitu glukózo-6-fosfátdehydrogenázy, hemolytické anémii, závažných poruchách funkce jater a ledvin, akutní hepatitidě.[15]

3.13 METODY STANOVENÍ PAR, KOF, KAS, CHF V PROTICHŘIPKOVÝCH PREPARÁTECH

Metody stanovení jednotlivých složek v protichřipkových preparátech jsou velmi rozmanité. Účinné látky byly stanovovány v lékových formách - v sáčcích[16], kapslích, tabletách, potahovaných tabletách, žvýkacích tabletách, sirupech.[17]

Iontově-párová kapalinová chromatografie byla použita ke stanovení pěti účinných a dvou pomocných látek v přípravku Frenadol (TM). Jedná se o sáčky obsahující mimo jiné paracetamol, kofein, vitamin C a chlorfenamin maleát. Pro detekci byly použity dvě vlnové délky. Pro rozlišení sedmi složek, bylo nezbytné použít tetrabutylamonium hydrogensulfát (TBA) a pentansulfonovou kyselinu (PSA). TBA snížil tailing chlorfenaminu a zkrátil čas analýzy. PSA zlepšil tvar píku chlorfenaminu a dextrometorfanu.[16]

14 farmaceutických přípravků s obsahem chlorfenaminu nebo některým z fenylethylaminů (pseudoefedrin, fenylefrin, fenylpropanolamin) bylo analyzováno micelární kapalinovou chromatografií. Přípravky dále obsahovaly např. paracetamol, kofein, vitamin C, acetylsalicylovou kyselinu, kodein fosfát, laktózu a další složky. Léčiva byla ve formě tablet, kapslí, žvýkacích tablet, potažených tablet, sirupů. Pro stanovení byla použita C_{18} kolona (120×4.6 mm, 5 μm), micelární mobilní fázi tvořil 0.15 M SDS v 6% pentanolu, pH 7.0, UV detekce.[17]

Micelární kapalinová chromatografie byla také použita pro analýzu 18.-ti přípravků obsahujících antihistaminika v kombinaci s různými anagetiky, antipyretiky, antitusiky v různých lékových formách: tabletách, tobolkách, čípcích, sirupech. Stanovována byla též kombinace chlorfenaminu s paracetamolem nebo kofeinem ve formě tablet. Použita byla kolona C_{18} (120×4.6 mm, 5 μm) a micelární mobilní fázi tvořil 0.04 M cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) v 0.05 M fosfátovém pufru s přídavkem 3% 1-butanolu. pH bylo nastaveno na 3.0. Pro analýzu byl použit UV-vis detektor.[18]

Pro stanovení paracetamolu, kofeinu a chlorfenamin maleátu byla použita HPLC metoda s fenacetinem jako vnitřním standardem. Separace a kvantifikace probíhala na koloně C_{18} (250×4.6mm, 5 μm). Mobilní fázi tvořil vodný roztok methanolu 0.05mol.l^{-1} a KH_2PO_4 v poměru 45:55 (v/v), obsahující 0.1% triethylaminu, upravený na pH 3.6 přídavkem kyseliny fosforečné. UV detekce probíhala při 260 nm. Analýza probíhala po dobu 12 minut.[19]

Další metodou vyvinutou pro stanovení paracetamolu, kofeinu a chlorfenamin maleátu byla izokratická kapalinová chromatografie využívající kolonu Diamonsil C_{18} a mobilní fázi tvořila dvojsložková směs methanolu a 1.5% vodného roztoku kyseliny octové v poměru 55:45 (v/v) a pH 3.6. UV detekce probíhala při 220 nm, analýza trvala necelých 10 minut.[20]

Pro analýzu 14.-ti účinných látek ke zmírnění symptomů chřipky a nachlazení (mimo jiné paracetamol, kofein, vitamin C) byla použita také CD-MEEKC. Separace účinných látek byla optimalizována změnami koncentrace SDS, organických modifikátorů a různých typů cyklodextrinů. Konečné optimální podmínky tvořil 0.81% (v/v) pentan, 6.61% (v/v) 1-butanol, 2% (v/v) 2-propanol, 4.47% (v/v) SDS a 86.11% (v/v) 10 mM roztok tetraboritanu sodného s 3 mM 2,6-di-O-methyl-beta-CD.[21]

V další práci byla porovnávána metoda CZE a MEKC pro analýzu přípravků obsahujících účinné látky v protichřipkových preparátech (např. paracetamol, chlorfenamin maleát, dextrometorfan). Pro práci byl zvolen 10mM roztok dihydrogenfosfátu sodného, zkoušeno bylo rozmezí pH 4.0 až 6.0. Paracetamol ovšem eluoval spolu s EOF, takže se takto zvolená metoda neosvědčila. Při použití MEKC pro analýzu těchto preparátů bylo nalezeno optimální složení: 10 mM tetraboritanový pufr obsahující 50 mM SDS, 5% methanolu a pH 9.0. UV detekce probíhala při 214 nm. Celková délka použité kapilára byla 60 cm, vnitřní průměr 75 μm.[22]

RP- HPLC byla použita pro stanovení chlorfenaminu, fenylefrinu a paracetamolu v tobolkách a to včetně nečistot. Konečné chromatografické podmínky byly tvořeny kolonou Supelco Discovery HS PEG poly(ethylenglycol) 15×0.46 cm, 5 μm. Mobilní fázi tvořil 20 mM fosfátový pufr o pH 7.0 a acetonitril (90:10, v/v). UV detekce byla sledována při 215 nm pro všechny analyty kromě paracetamolu, který byl měřen při 310 nm.[23]

RP-HPLC byla použita také ke stanovení paracetamolu a kofeinu ve farmaceutickém přípravku. Analýza byla provedena za pomoci kolony LiChroCART 250-4 Purospher RP-18 (4.6×250mm, 5 μm), mobilní fáze byla tvořena methanolem a vodou v poměru 40:60. Pro detekci byly použity dvě vlnové délky: 249 a 273 nm.[24]

HPLC metoda byla použita pro stanovení paracetamolu, chlorfenaminu, dalších antihistaminik a nečistot v tabletách a sáčcích. Eluce mobilních fází byla gradientová tvořená dvěma roztoky, první 40mM fosfátový pufr o pH 6.0 a druhý acetonitril. UV detekce probíhala při 215 nm.[25]

Paracetamol a chlorfenamin byly také stanovovány MEKC, spolu s dalšími sedmi látkami, obsaženými v tabletách na zmírnění symptomů nachlazení. Použit byl pufr tvořený dihydrogenfosfátem sodným a tetraboritanem sodným (10 mM, pH 9.0), 50mM SDS a acetonitril (26% v/v). Efektivní délka použité kapiláry byla 50 cm, napětí 15 kV a teplota 30°C. Použit byl také diode-array detektor nastavený na vlnovou délku 214 nm.[26]

Micelární kapalinová chromatografie byla použita pro analýzu protichřipkových preparátů, obsahujících různé kombinace antihistaminik, fenylethylaminů a dalších účinných látek (např. také paracetamol, kofein, vitamin C, acetylsalicylovou kyselinu, bromhexin) Stacionární fázi tvořila C-8 kolona, mobilní fázi 0.05 M SDS v 6% pentanolu nebo 0.15 M SDS v 2% pentanolu o pH 7.0.[27]

Bezvodá kapilární elektroforéza byla použita pro stanovení čtyř léčiv-chlorfenamin, pseudoefedrin, dextrometorfan, difenhydramin-často obsažených v protichřipkových přípravcích. Optimální složení pufru pro analýzu bylo 40 mM amonium acetát, 10% acetonitrilu v methanolu. Použita byla křemenná kapilární kolona (47 cm×75 μm), napětí 25 kV a teplota 25°C.[28]

4 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo vypracovat metodu pro separaci a stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové, kofeinu a chlorfenamin maleátu pomocí micelární elektrokinetické chromatografie a její aplikace na léčivý přípravek (Trigrip tobolky, STADA Arzneimittel AG, Bad Vibel, Německo).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

5.1.1 Chemikálie

- 4-Acetaminofenol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- n-Butylalkohol č., Lachema a.s. odštěpný závod, Neratovice, ČR
- α-Cyklodextrin p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- β-Cyklodextrin p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- γ-Cyklodextrin p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- 2,6-Di-O-methyl-β-cyklodextrin, Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko
- (2-Hydroxypropyl)-α-cyklodextrin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- (2-Hydroxypropyl)-β-cyklodextrin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- (2-Hydroxypropyl)-γ-cyklodextrin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- 18-Crown-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- BES – N,N-Bis[2-hydroxyethyl]2-aminoethansulfonová kyselina, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Butylparaben p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Dihydrogenfosforečnan sodný, RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové
- Diklofenak sodný, p. a., Amoli Organics Ltd., Bombaj, Indie
- Dodecylsíran sodný, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Glycyl-glycin, p. a., Sigma-Aldrich Company
- HEPES - [4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethan sulfonová kyselina], 99,5 %, Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko
- Chlorfenamin maleát. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- 2-Propanol č., Penta, Chrudim, ČR
- Kofein, 99 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina askorbová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina boritá, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina deoxycholová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina cholová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

- Methanol Chromasolv® pro HPLC, Sigma-Aldrich Laboratorchemikalien GmbH, Seelze, Německo
- Sudan III pro mikroskopii, Balex, Ing. Jaroslav Kroupa, CSc., Pardubice-Rosice n. L., ČR
- Tricin – N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin, p. a., Aldrich Chemical Company
- TRIGRIP, Stada Arzneimittel, Bad Vilbel, Německo
- TRIS – Trisma base – tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, USA, Mr = 121,1

5.1.2 Příprava roztoků

Na přípravu roztoků byla použita voda připravená zařízením Millipore MilliQRG, Bedford, MA, USA . Všechny roztoky byly před dávkováním do přístroje odplyněny 10 minut na ultrazvukové lázni.

5.1.2.1 Roztoky pracovních elektrolytů

Dle požadované koncentrace jsem navážila odpovídající množství SDS a kyseliny borité a na ultrazvukové lázni jsem je v 10% MetOH rozpustila. Poté jsem upravila pH* amoniakem na hodnotu 7,6 a v odměrné baňce doplnila po rysku.

Stejným způsobem byly připraveny z příslušných substancí další roztoky elektrolytů, které jsem zkoušela při hledání vhodného druhu elektrolytu.

5.1.2.2 Hledání vnitřního standardu (IS)

Navážila jsem přesně asi 40,0 mg paracetamolu, 30,0 mg kyseliny askorbové, 5,0 mg kofeinu a 0,5 mg chlorfenaminu do 10 ml odměrné baňky, rozpustila v 50% MetOH a doplnila vodou po rysku.

Poté jsem připravila jednotlivé roztoky IS (ethylparaben, diklofenak, butylparaben). Jednotlivé látky jsem navážila do 10 ml odměrných baněk, rozpustila v 25% MetOH a doplnila po rysku. Koncentrace roztoků byla 5 mg/10 ml. Roztoky jsem nechala na ultrazvukové lázni odplynit po dobu 10 minut. Před analýzou se roztoky mísily s roztokem zkoušených látek v poměru 1: 1.

5.1.2.3 Roztok standardů pro optimalizaci metody

Do 10 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 40,0 mg paracetamolu, 30,0 mg kyseliny askorbové, 5,0 mg kofeinu, 0,5 mg chlorfenaminu a 1 mg ethylparabenu. Látky jsem rozpustila v 50% MetOH a doplnila po rysku.

5.1.2.4 Kalibrační roztoky

Navážila jsem do 10 ml odměrné baňky přesně asi 5 mg ethylparabenu (IS), rozpustila v 25% MetOH a doplnila po rysku. Roztok jsem nechala 10 minut odplynit na ultrazvukové lázni.

Poté jsem připravila roztok zkoušených látek (ZR). Do 10 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 240 mg paracetamolu, 180 mg kyseliny askorbové, 30 mg kofeinu a 3 mg chlorfenaminu. Látky jsem rozpustila v 25% MetOH a doplnila po rysku.

Z těchto dvou roztoků jsem ředěním do 5 ml odměrných baněk připravila podle schématu sérii šesti roztoků s koncentrací léčiv v rozmezích uvedených v Tab. 1. K ředění jsem používala 25% MetOH, koncentrace IS byla ve všech roztocích 50µg/ml.

Tab. 1 Ředění kalibračních roztoků (ml ZR +ml IS ad 5 ml MetOH 25%)

Bod č.	1	2	3	4	5	6
ml ZR	0,15	0,25	0,75	1,25	1,75	2,5
ml IS	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
c (paracetamol) µg/ml	720	1200	3600	6000	8400	12000
c (kys.askorb.) µg/ml	540	900	2700	4500	6300	9000
c (kofein) µg/ml	90	150	450	750	1050	1500
c (chlorfenamin) mg/ml	9	15	45	75	105	150

5.1.2.5 Příprava vzorku

Do 25 ml odměrné baňky jsem vložila obsah dvou tobolek včetně obalu a doplnila methanolem po rysku. Odměrnou baňku jsem umístila na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 20°C. Poté jsem obsah baňky převedla do centrifugační zkumavky a nechala rychlostí 3000 ot/min 15 minut odstředit. Supernatant jsem čtyřikrát zředila vodou, odpipetovala 6,5 ml do 10 ml odměrné baňky , přidala 1 ml roztoku IS (5 mg/10 ml) a doplnila 25% MetOH po rysku.

5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
- Centrifuga EBA 21, Hettech Zentrifugen Tuttlingen, Německo
- Elektroda kombinovaná pH elektroda Red Rod. typ pHC2401-8, Radiometer, Francie
- Kapilární elektroforetický systém P/ACE^{TM} MDQ Capillary Electrophoresis System od firmy Beckman Coulter, USA, software Karat 32
- Laboratorní digitální pH metr PHM 220, Radiometer Kopenhagen, Francie (přístroj byl kalibrován standardními pufry)
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31, Bandelin Electronic, Německo

Kapilární elektroforetický systém Beckman byl vybaven UV detektorem (PDA-photo diode-array). Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm, celkové délce 60,0 cm a efektivní délce 50,0 cm. Pro zpracování a vyhodnocování dat byl použit software Karat 32.

5.3 PRACOVNÍ POSTUP

Po uvedení počítače a elektroforetického systému do chodu jsem, každý den před vlastním měřením, proplachovala kapiláru 10 minut 1 M hydroxidem sodným, 10 minut 0,1 M hydroxidem sodným a 10 minut vodou. Před každou analýzou jsem ještě kapiláru proplachovala 0,1 M hydroxidem sodným, vodou a elektrolytem, aby se odstranily adsorbované látky a byla zajištěna lepší separace a reprodukovatelnost. V závěru každého dne jsem kapiláru proplachovala postupně 10 minut 1 M NaOH, 0,1 M NaOH a vodou. Promývání probíhalo pod hydrodynamickým tlakem 1503,1 mBa.

Vzorek byl dávkován hydrodynamickým tlakem 48,3 mBa po dobu šesti sekund, vložené napětí odpovídalo 30kV a teplota kapiláry byla udržována na 20°C. Detekce probíhala při 214 nm. Každý vzorek byl před analýzou odplyněn po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni.

5.3.1 Měření kalibrační závislosti

Pro změření kalibrační závislosti jsem použila sérii šesti kalibračních roztoků o koncentracích:

PAR 720 μg/ml; KAS 540 μg/ml; KOF 90 μg/ml; CHF 9 μg/ml

PAR 1200 μg/ml; KAS 900 μg/ml; KOF 150 μg/ml; CHF 15 μg/ml

PAR 3600 μg/ml; KAS 2700 μg/ml; KOF 450 μg/ml; CHF 45 μg/ml

PAR 6000 μg/ml; KAS 4500 μg/ml; KOF 750 μg/ml; CHF 75 μg/ml

PAR 8400 μg/ml; KAS 6300 μg/ml; KOF 1050 μg/ml; CHF 105 μg/ml

PAR 12000 μg/ml; KAS 9000 μg/ml; KOF 1500 μg/ml; CHF 150 μg/ml

Koncentrace ethylparabenu jako vnitřního standardu byla ve všech kalibračních roztocích 50 μg/ml. S každým roztokem byla provedena 3 měření. Kalibrační závislost byla hodnocena pomocí programu lineární regrese na počítači jako závislost poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci stanovované látky v μg/ml.

5.3.2 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce LOD je nejnižší koncentrace (množství) analytu ve vzorku, která může být s jistotou detekována, ale ne nezbytně kvantifikována. Limit kvantifikace LOQ je nejmenší množství látky nebo koncentrace, které může být stanoveno danou metodou s vhodnou přesností a správností. LOD odpovídá koncentraci analytu při poměru signál/šum obvykle 3 : 1, resp. 10 : 1 (LOQ).[29]

5.3.3 Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti jsem použila roztok o koncentraci PAR 3600 μg/ml; KAS 2700 μg/ml; KOF 450 μg/ml; CHF 45 μg/ml. Obsah vnitřního standardu ethylparabenu byl 50,20 μg/ml. Provedla jsem šest měření. Hodnoty průměru, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsem vypočítala dle vztahů:

Průměr hodnot výsledků měření $\bar{x}$:

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

n – počet měření

x_i – jednotlivý výsledek měření

Směrodatná odchylka s:

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

Relativní směrodatná odchylka:

$$S_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

5.3.4 Účinnost separace

Účinnost chromatografické metody se vyjadřuje počtem dosažených teoretických pater N, případně výškovým ekvivalentem teoretického patra H. Počet teoretických pater se počítá podle vztahu:[1]

$$N = \left(\frac{t_m}{\sigma}\right)^2 = 16\left(\frac{t_m}{w}\right)^2$$

t_m – migrační čas [s]

σ - vzdálenost, kterou urazí difúzí průměrný ion za dobu t [s]

w – šířka píku při základní linii [s]

Výškový ekvivalent teoretického patra se počítá podle vztahu:

$$H = \frac{l}{N}$$

l_t – celková délka kapiláry (efektivní délka kapiláry) [m]

5.3.5 Rozlišení

Rozlišení R_S je kvantitativní parametr pro určení separační účinnosti. Rozlišení lze spočítat podle obecného vzorce:[1]

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

t_1, t_2 - migrační časy látek [s]

w_1, w_2 – šířky píků při základní linii [s]

Hodnota R_S větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků až na základní linii.

5.3.6 Správnost metody

Znamená co největší shodu výsledků měření s absolutní správnou hodnotou. Správnost vypracované metody byla ověřena metodou přídavku standardů.

5.3.6.1 Ověření správnosti metodou s přídavkem standardů

Stanovení jsem provedla tak, že jsem připravila roztok standardů a roztok vzorku HVLP.

A. Roztok standardů jsem připravila do 5 ml odměrné baňky a po doplnění po rysku byly koncentrace PAR 24,1 mg/ml; KAS 18,07 mg/ml; KOF 3,01 mg/ml; CHF 0,3 mg/ml (ZR ST). Měřený roztok standardů (MR ST) byl připraven: 1 ml ZR ST + 1 ml IS (5 mg/10ml) ad 10,00 ml 25 % MetOH (c_{ST}).

B. Do 25 ml odměrné baňky jsem navážila množství odpovídající dvojnásobné průměrné hmotnosti obsahu jedné tobolky (experimentálně zjištěná průměrná hmotnost obsahu tobolky je 0,4740 g) a doplnila methanolem po rysku. Dále jsem postupovala stejně jak je uvedené v kapitole Příprava vzorku. Supernatant získaný centrifugací jsem čtyřikrát zředila vodou, odpipetovala 6,5 ml do 10 ml odměrné baňky, přidala 1 ml roztoku vnitřního standardu (5mg/10ml) a doplnila 25% MetOH po rysku (c_{HVLP}).

C. Do další 10 ml odměrné baňky jsem odpipetovala také 6,5 ml zředěného supernatantu, přidala 1ml roztoku vnitřního standardu (5mg/10ml) a 1 ml připraveného roztoku standardů (ZR ST) a doplnila 25% MetOH po rysku ($c_{HVLP+ST}$).

Byly změřeny roztoky A-MR ST, roztok B a roztok C.

Vložená koncentrace standardů byla vypočtena z navážek standardů; nalezená koncentrace podle $c_{HVLP+ST}$ - c_{HVLP}.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 OPTIMALIZACE METODY

6.1.1 Detekce

Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter je vybaven UV diode array detektorem. Pro stanovení optimální vlnové délky jsem změřila UV spektra látek v borátovém pufru o pH 8.0 a 20% MetOH od 190 do 300 nm. UV spektra paracetamolu a kofeinu vykazovala maximum při 230 nm, UV spektrum kyseliny askorbové při vyšší vlnové délce kolem 260 nm. Vzhledem k tomu, že chlorfenamin je v přípravku obsažen v mnohem nižší koncentraci než ostatní složky, bylo nutné zvolit vlnovou délku při které je citlivost pro chlorfenamin větší – tedy 214 nm.

6.1.2 Volba pracovního elektrolytu

Bylo nutné nalézt složení elektrolytu, které by umožnilo úplnou separaci jednotlivých složek tak, aby mohly být stanoveny. Byly vyzkoušeny tyto elektrolytové systémy:

- borátový pufr
- fosfátový pufr
- kombinace borátového a fosfátového pufru
- glycylglycin
- tricin
- kombinace tricin a borát
- TRIS v kombinaci s MOPSO, HEPES, MES, BES

Ve všech těchto elektrolytových systémech byl jako surfaktant použit dodecylsíran sodný v koncentraci 30 mmol/l, pH* 8.0 a 20% MetOH. U systémů s tricinem, borátem a glycylglycinem byly jako surfaktanty zkoušeny též cholát v koncentraci 30 mmol/l, deoxycholát v koncentraci 30 mmol/l a směsné micely SDS v koncentraci 30 mmol/l a cholát 10 mmol/l a dále směsné micely o složení SDS 30 mmol/l a deoxycholát 10 mmol/l.

Zkoušené látky většinou migrovaly v pořadí paracetamol (PAR), kofein (KOF), kyselina askorbová (KAS), chlorfenamin (CHF), látky byly identifikovány přídavkem standardů.

Při použití borátového pufru s použitím SDS jako surfaktantu docházelo k migraci všech složek do 20 minut, PAR a KOF byly ovšem nedokonale separovány. Při použití cholátu jako surfaktantu nebyla jednak zaznamenána migrace CHF ani do 30 minut a u PAR a KOF docházelo k překrytí. Za použití deoxycholátu a u směsných micel docházelo též k překrytí PAR + KOF a CHF migroval před KAS. U fosfátového pufru docházelo k velmi špatné separaci PAR + KOF a doba analýzy se protáhla až na 35 minut. Kombinace borátového a fosfátového pufru se neosvědčila, doba analýzy se ještě prodloužila a u PAR + KOF došlo k překrytí.

Při použití TRIS organického pufru byla doba analýzy delší než u borátového pufru a separace PAR + KOF velmi špatná, v případě TRIS + HEPES došlo dokonce k překrytí. V systému obsahujícím tricin a SDS byla separace PAR + KOF výrazně lepší, ovšem celková doba analýzy byla 33 minut. Při použití cholátu a deoxycholátu jako surfaktantů došlo sice k výraznému zkrácení délky analýzy, ale také k úplnému překrytí PAR + KOF.

Kombinace tricinu a borátového pufru prokázala velmi špatnou separaci PAR + KOF a dlouhou dobu analýzy kolem 30 minut.

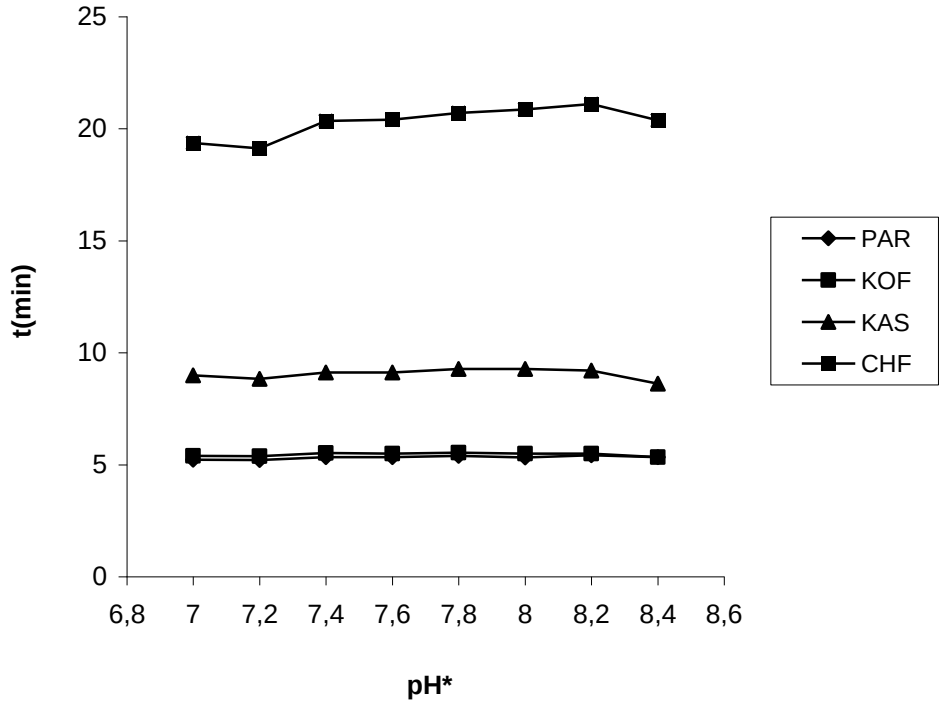
Zkoušela jsem také systém glycylglycin a různé surfaktanty. Při použití SDS byly patrné velmi nesymetrické píky KAS a CHF a nedokonalá separace PAR + KOF. Ani použití dalších surfaktantů a směsných micel nevedlo ke zlepšení symetrie píků a naopak došlo k úplnému překrytí PAR + KOF.

Pro další práci jsem zvolila elektrolytový systém o složení borátový pufr se surfaktantem SDS a rozpouštědlo methanol. Rozlišení píků PAR + KOF sice nebylo úplné, ale dalo se ho dosáhnout postupnou optimalizací složek a prostředí. Také doba trvání analýzy byla přijatelná.

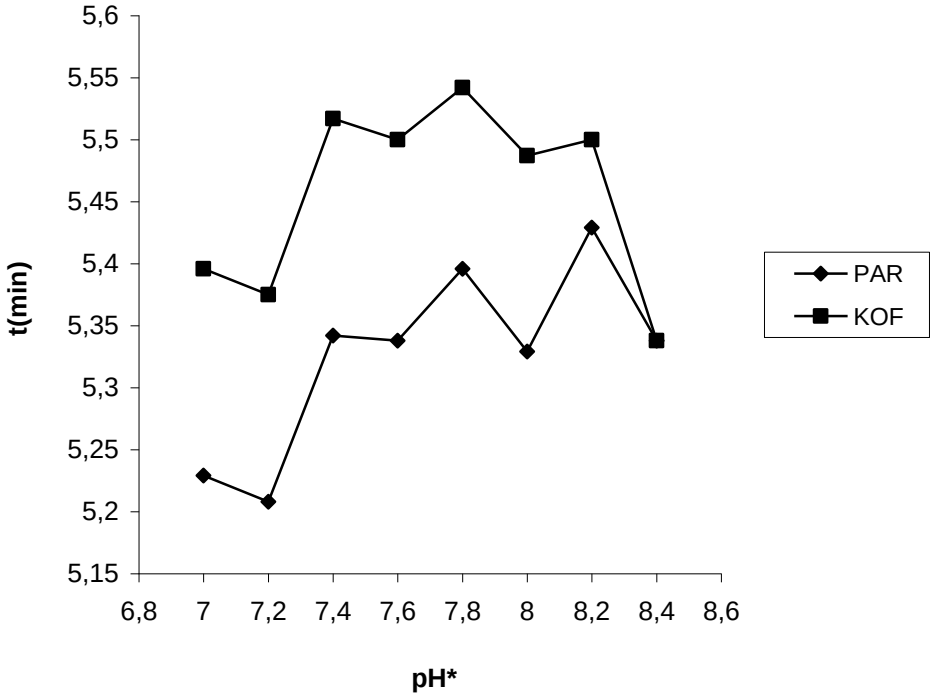
6.1.3 Optimalizace pH BGE

Vlivem změn pH* dochází ke změnám disociace molekul a tak k různým interakcím látek s micelami. Elektroforetická pohyblivost se mění podle velikosti interakce látky s micelami. Optimalizace pH* probíhala v pufru složeném z 50 mmol/l

borátu, 30 mmol/l SDS, 20% MetOH. pH* bylo upravováno pomocí amoniaku v rozmezí 7,0 až 8,4. S rostoucím pH* bylo pozorováno zhoršování částečné separace prvního píku PAR + KOF, doba analýzy se mírně prodlužovala. Při pH* 8,2 již oba píky PAR + KOF migrovaly spolu. Pro další práci jsem vybrala hodnotu pH* 7,6 a to i přesto, že při nižších hodnotách pH* byly píky PAR + KOF o něco lépe separovány, ale ne úplně. Při hodnotách pH* nižších než 7,6 docházelo ke znatelnému zhoršení tvaru píku kyseliny askorbové. Při pH* 7,8 byla částečná separace PAR + KOF o něco nižší než při pH* 7,6.



Obr. 6 Vliv pH* na migrační čas analytů; BGE: 50mM borát, 30mM SDS, 20% MetOH

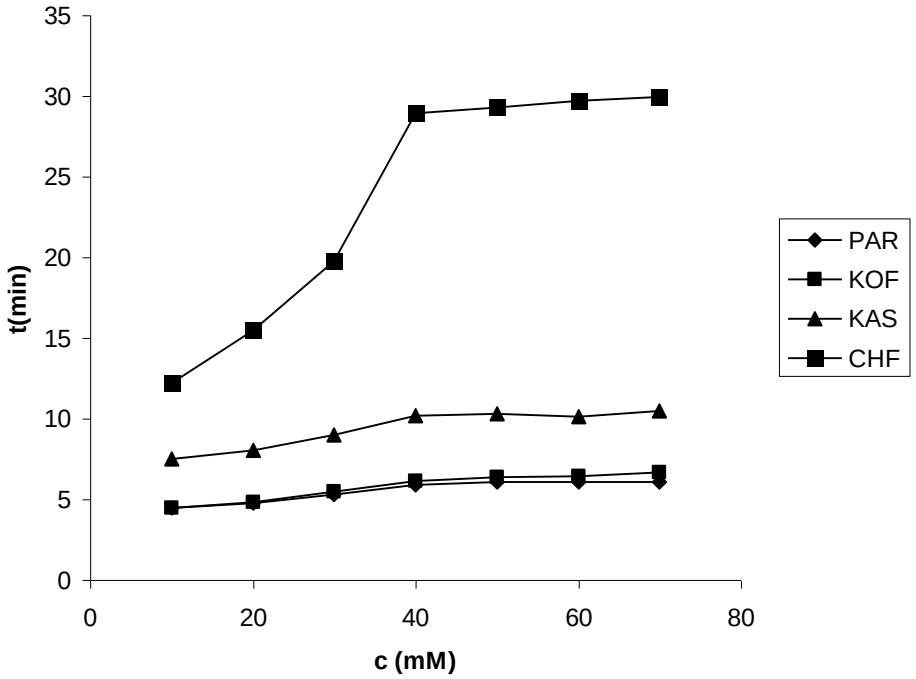


Obr. 7 Detail vlivu pH* na migrační čas PAR a KOF

6.1.4 Optimalizace koncentrace SDS

Jako CMC pro SDS je v literatuře udávána koncentrace 8,1mM[3], používané koncentrace bývají v řádu desítek mM. Druh a koncentrace tenzidu ovlivňují rozdělovací koeficient micelární fáze – vodná fáze, rozlišení a selektivitu oddělení. Pro optimalizaci koncentrace SDS v elektrolytovém systému jsem použila koncentrace 10, 20, 30, 40, 50, 60 a 70mM. Elektrolytový systém obsahoval 50 mM borátu, 20% MetOH a pH* 7,6 (upraveno amoniakem). Se zvyšující se koncentrací SDS docházelo k prodloužení analýzy až na téměř 30 minut. Od koncentrace 30mM SDS byla pozorována částečná separace prvních dvou píků PAR a KOF, která se dále zlepšovala. Při 70mM SDS byly píky PAR a KOF rozděleny až na základní linii. Od koncentrace 40mM výše byla doba analýzy téměř stejná. V rámci optimalizace koncentrace tenzidu jsem zkusila též kombinace směsných micel a to SDS + cholát a SDS + deoxycholát. Koncentrace cholátu a deoxycholátu byly 2,5mM, 5mM a 10mM a koncentrace SDS 40 a 70mM. Směsné micely vykazovaly buď velmi špatnou separaci prvních dvou píků PAR a KOF nebo dokonce jejich překrytí. Doba analýzy se pohybovala kolem 20 až 23 minut.

Pro další práci jsem vybrala koncentraci SDS 70mM, protože separace PAR a KOF byla při této koncentraci až na základní linii, tvar píků byl symetrický, doba analýzy byla sice delší, ale předpokládala jsem její zkrácení při dalších krocích optimalizace.

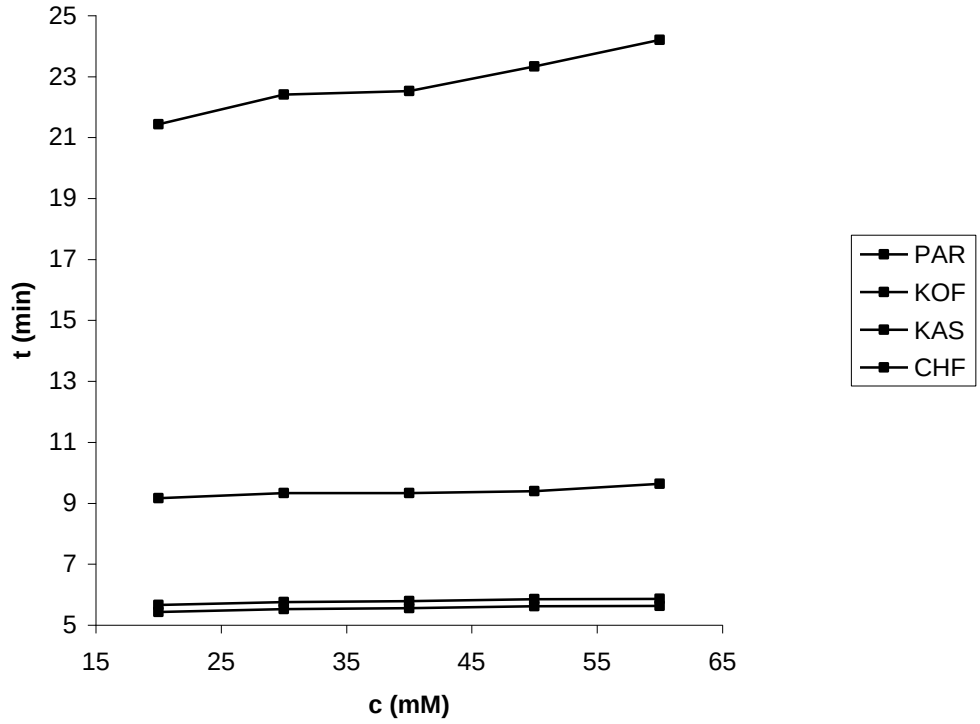


Obr. 8 Závislost migračních časů na koncentraci SDS. BGE: 50mM borát, 20% MetOH, pH* 7,6 (upravený amoniakem)

6.1.5 Optimalizace koncentrace základního elektrolytu

Zjišťovala jsem vliv koncentrace borátu v pracovním elektrolytu na citlivost a délku analýzy. Použité koncentrace borátu byly 20, 30, 40, 50 a 60 mmol/l. Elektrolytový systém obsahoval 70mM SDS, pH 7,6 a 20% MetOH. Se zvyšující se koncentrací elektrolytu se podle předpokladu prodlužovala i celková doba analýzy. Při koncentraci 20 a 30 mM borátu byl patrný velmi špatný tvar píku KAS a také píku CHF. Pro další analýzy jsem zvolila koncentraci borátu 40 mM, byla zde nejlepší

separace prvních dvou píků PAR a KOF, lepší tvar píku KAS a kratší analýzy než u koncentrace 50 mM. Při koncentraci 60 mM docházelo ke zhoršené separaci prvních dvou píků.



Obr. 9 Vliv koncentrace borátu na migrační čas analytů; BGE: 70mM SDS, pH* 7,6, 20%MetOH

6.1.6 Optimalizace koncentrace methanolu

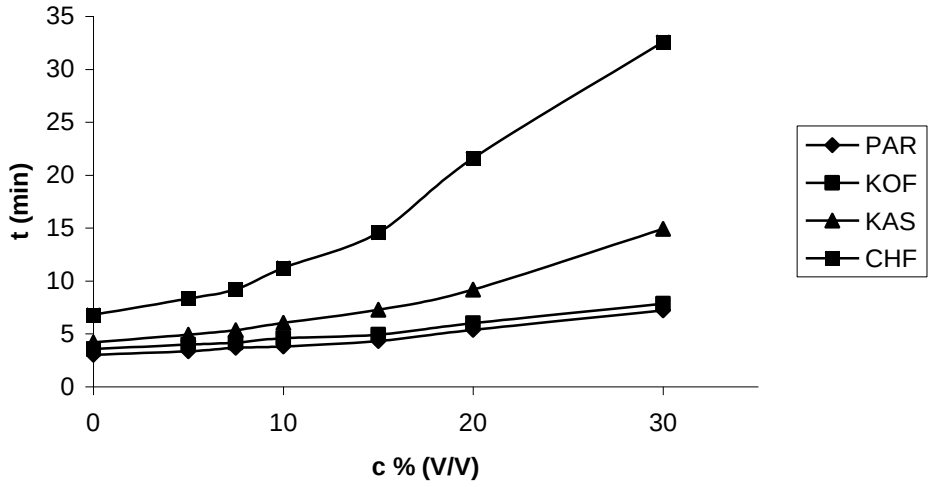
Vliv přídavku organického rozpouštědla k elektrolytickému systému je zásadní pro ovlivnění separace, viskozity i EOF v MEKC. Ovlivňuje též kritickou micelární koncentraci. Při vysokém obsahu organického rozpouštědla může dojít až k rozpadu micel. Patrné jsou změny selektivity a migračního času.

Zkoušela jsem jak vodný pracovní elektrolyt, tak i systém s obsahem 5, 7,5, 10, 15, 20 a 30% (V/V) methanolu.

Přídavek methanolu měl vliv na rychlost migrace analytů. S rostoucí koncentrací methanolu se podle předpokladu prodlužoval i migrační čas jednotlivých analytů, nejvíce patrný byl tento jev u chlorfenaminu a kyseliny askorbové.

Dále jsem zkoušela kombinaci methanolu a 2-propanolu v koncentracích 9% + 1%, 9,5% + 0,5% a 6,5% + 1%. Tato kombinace ovšem vedla k prodloužení analýzy oproti samotnému methanolu a k deformaci píku kyseliny askorbové.

Pro další analýzy jsem zvolila systém s 10% methanolu ve kterém docházelo k úplné separaci PAR a KOF oproti koncentraci 7,5%, kde sice byla kratší doba analýzy, ale horší separace PAR a KOF.



Obr. 10 Vliv koncentrace methanolu na migrační čas analytů; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, pH* 7,6

6.1.7 Vliv cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou cyklické látky, které do své kavity mohou navázat molekuly jiných látek a ovlivnit tak rychlost migrace dané látky. Sledovala jsem vliv přídavku různých nenabitých cyklodextrinů do systému o složení 70mM borátu, 40mM SDS, 10% MetOH a pH 7,6. Z cyklodextrinů jsem vyzkoušela 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 a 18-crown-6 všechny v koncentraci 10mM.

Celkově se projevovala poměrně špatná separace prvních dvou píků PAR a KOF, které dokonce v případě použití 18-CROWN-6 a (2-hydroxypropyl)-γ-cyklodextrinu migrovaly spolu. Velmi špatný tvar píku KAS byl pozorován za použití γ-cyklodextrinu, 2,6-di-O-methyl-β-cyklodextrinu, (2-hydroxypropyl)-γ-cyklodextrinu.

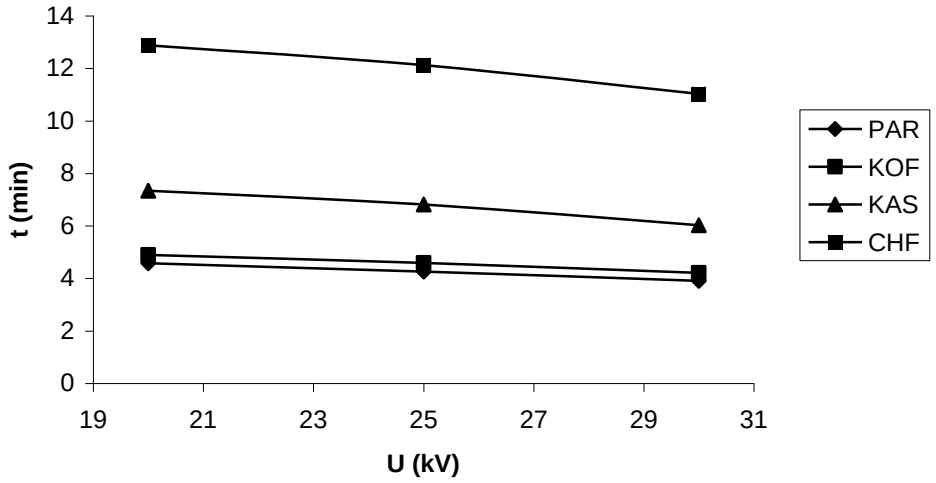
Doba trvání analýzy se neměnila, zůstávala kolem 12 až 13 minut. U α-, β- a γ-cyklodextrinu jsem zkoušela použít i nižší koncentraci a to 5mM, ale ve všech případech se zhoršil tvar píků PAR a KOF.

6.1.8 Vnitřní standard

Jako vnitřní standard jsem zkoušela ethylparaben, butylparaben a diklofenak. Píky paracetamolu, kofeinu a diklofenaku od sebe byly nedostatečně odděleny. Migrační čas propylparabenu byl výrazně delší oproti ostatním analytům. Jako optimální vnitřní standard jsem zvolila ethylparaben. Migroval jako čtvrtý mezi kyselinou askorbovou a chlorfenaminem. Jeho pík byl symetrický, dobře oddělený od okolních látek.

6.1.9 Vliv napětí

Analýzu látek jsem prováděla postupně s napětím 20 kV, 25 kV a 30 kV a sledovala jsem vliv různé síly napětí na vzhled píků, plochu píků a migrační čas. Podle očekávání s rostoucím napětím se zkracovala doba analýzy, plochy píků a pořadí píků se neměnily. Pro další práci jsem zvolila napětí 30 kV.



Obr. 11 Vliv napětí na migrační čas analytů; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10% MetOH, pH* 7,6

6.1.10 Vliv teploty

S rostoucí teplotou se zvyšuje i pohyb iontů a analýza tím pádem bývá rychlejší, dále je ovlivňován také rozdělovací koeficient látky mezi tlumivým roztokem a micelami, kritickou micelární koncentrací a viskozitou. Systém Beckman Coulter obsahuje kapalinové chlazení kapiláry a umožňuje průběh analýzy za konstantní teploty. Vyzkoušela jsem teplotu 20°C a 25°C. Při 25°C byla zhoršena kvalita analýzy, proto jsem pro další práci zvolila teplotu 20°C.

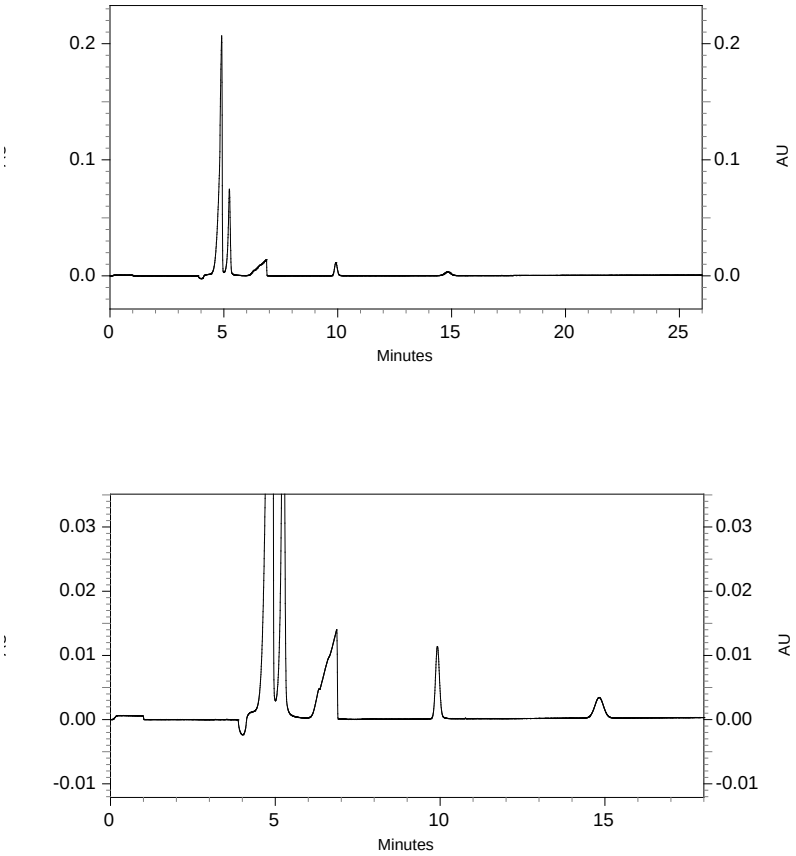
6.1.11 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Optimální složení elektrolytu a podmínky měření jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab. 2. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Rozpouštědlo	10% methanol
Složky pufru, c	borát, 40mM
Surfaktant, c	SDS, 70mM
pH*	7,6
Teplota	20°C
Napětí	30 kV
Detekce	214 nm
Dávkování	hydrodynamickým tlakem 48,3 mBar, 6s

Obr. 12 zobrazuje elektroforeogramy standardů získané měřením za optimálních podmínek.



Obr. 12 Elektroforeogram standardů: zleva-paracetamol (PAR), kofein (KOF) kyselina askorbová (KAS), ethylparaben (IS), chlorfenamin (CHF); dolní obrázek-zvětšeno;

BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10% MetOH, pH* 7,6, teplota 20°C, λ = 214 nm

6.1.12 Rozlišení

Pro výpočet rozlišení jsem použila vzorec uvedený na straně 30. K výpočtu jsem použila průměrné hodnoty kalibračního měření s roztokem obsahujícím paracetamol 3600 μg/ml, kofein 450 μg/ml, kys. askorbová 2700 μg/ml, chlorfenamin 45 μg/ml a ethylparaben 50 μg/ml. Výsledky výpočtu jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3. Rozlišení mezi jednotlivými píky

Dvojice analytů	Rozlišení Rs
Paracetamol - kofein	1,84
Kofein - kys. askorbová	3,91
Kys. askorbová - ethylparaben	6,71
Ethylparaben - chlorfenamin	13,92

6.1.13 Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje pomocí počtu dosažených teoretických pater N, případně výškovým ekvivalentem teoretického patra H. Výpočty jsem provedla pomocí vzorců uvedených na straně 49. Hodnoty počtu teoretických pater a hodnoty H jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab.4. Parametry charakterizující účinnost elektroforetické separace (v závorce jsou uvedeny hodnoty H vzhledem k efektivní délce kapiláry)

Analyt	N	H (μm)
Paracetamol	10370	57,8 (48,2)
Kofein	17484	34,3 (28,6)
Kys. askorbová	1538	390,1 (325,1)
Chlorfenamin	13047	46,0 (38,3)

Nejvyšší hodnota N a nejnižší H byly zjištěny u kofeinu.

6.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Kalibrační závislost jsem měřila za použití optimálního pracovního elektrolytu. Jako kvantitativní parametr byl použit poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu.Velikosti ploch píků jsem získala ze záznamu vyhodnoceného počítačovým programem. Pro každou koncentraci jsem provedla tři měření. Kalibrační závislost jsem zpracovala metodou lineární regrese.

Obecný tvar rovnice přímky.

$y = kx + q$

x – koncentrace látky (μg/ml)

y – plocha píku analytu / plocha píku vnitřního standardu

k – směrnice přímky

q – absolutní člen

6.2.1 Kalibrační závislost pro paracetamol

Měření jsem prováděla pro koncentrace: 720 μg/ml, 1200 μg/ml, 3600 μg/ml, 6000 μg/ml, 8400 μg/ml a 12000 μg/ml.

Počet bodů: 6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

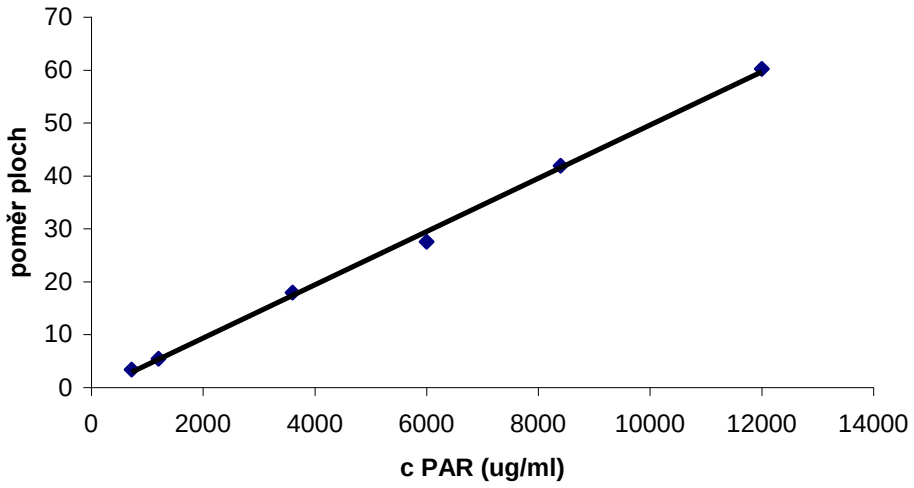
$k = 4{,}4899 \qquad s_k = 0{,}1993$

$q = 0{,}2431 \qquad s_q = 0{,}8966$

Koeficient korelace: 0,9961

Reziduální odchylka: 1,4507

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%.



Obr. 13 Kalibrační závislost pro paracetamol; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10%MetOH, pH* 7,6

6.2.2 Kalibrační závislost pro kofein

Měření jsem prováděla pro koncentrace: 90 µg/ml, 150 µg/ml, 450 µg/ml, 750 µg/ml, 1050 µg/ml a 1500 µg/ml.

Počet bodů: 6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

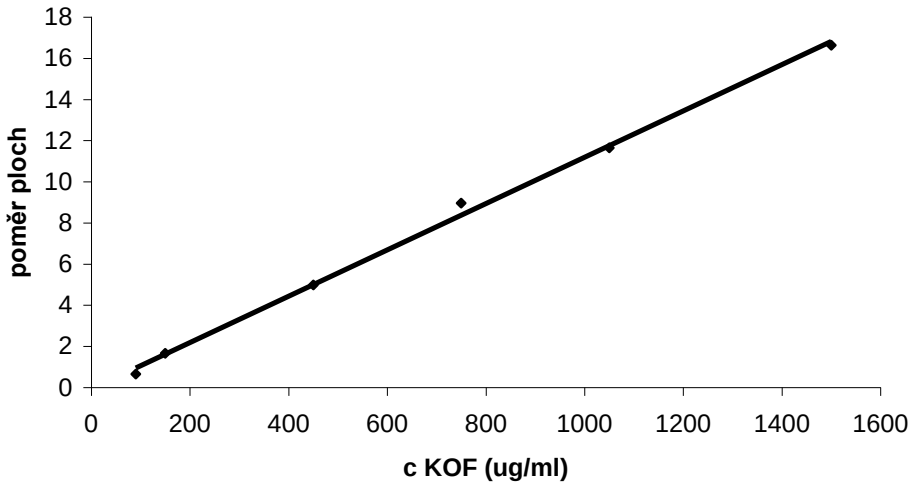
k = 10,7801 s_k = 0,4785

q = - 0,1369 s_q = 0,2695

Koeficient korelace: 0,9961

Reziduální odchylka: 0,4361

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%.



Obr. 14 Kalibrační závislost pro kofein; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10%MetOH, pH* 7,6

6.2.3 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou

Měření jsem prováděla pro koncentrace: 540 μg/ml, 900 μg/ml, 2700 μg/ml, 4500 μg/ml, 6300 μg/ml a 9000 μg/ml.

Počet bodů: 6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

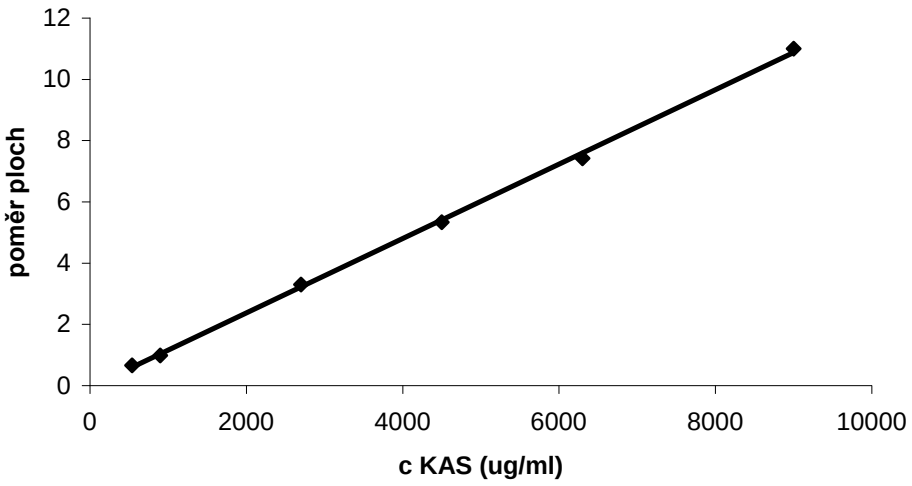
k = 1,1656 s_k = 0,0529

q = - 0,0743 s_q = 0,1786

Koeficient korelace: 0,9959

Reziduální odchylka: 0,2890

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%.



Obr. 15 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10%MetOH, pH* 7,6

6.2.4 Kalibrační závislost pro chlorfenamin

Měření jsem prováděla pro koncentrace: 9 µg/ml, 15 µg/ml, 45 µg/ml, 75 µg/ml, 105 µg/ml a 150 µg/ml.

Počet bodů: 6

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

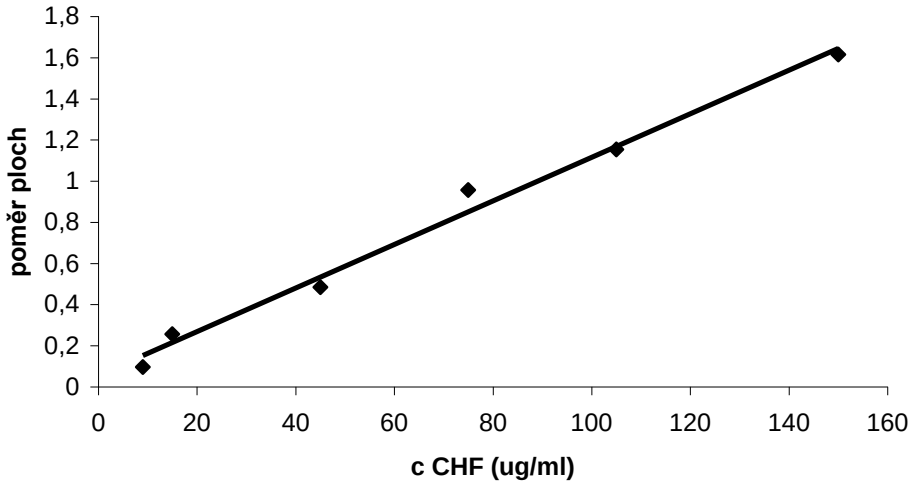
k = 10,9351 s_k = 09558

q = 0,0485 s_q = 0,0797

Koeficient korelace: 0,9851

Reziduální odchylka: 0,1173

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%.



Obr. 16 Kalibrační závislost pro chlorfenamin; BGE: 40mM borát, 70mM SDS, 10%MetOH, pH* 7,6

6.2.5 Kapacitní faktor

Vypočítala jsem kapacitní faktor pro jednotlivé analyty dle vzorce na straně 30. Retenční čas neinteragujícího solutu byl 2,97 minut a retenční čas micely (SUDAN III) 15,44 minut.

Tab. 5. Kapacitní faktor

Analyt	t_{eo} (min)	k´
PAR	3,861	0,398
KOF	5,241	0,541
KAS	6,906	1,427
CHF	14,885	79,55

6.2.6 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce a limit kvantifikace jsou parametry, které vyžaduje Státní ústav pro kontrolu léčiv u metod stanovení nečistot. Přestože všechny čtyři stanovované látky

nejsou nečistotami, ale účinnými látkami, provedla jsem pro představu zjištění těchto hodnot. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6. Zjištěné limity byly experimentálně ověřeny.

Tab. 6. Limit detekce a limit kvantifikace

Analyt	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Paracetamol	54,5	180
Kofein	13,6	45
Kys. askorbová	81,8	270
Chlorfenamin	2,7	9

6.3 OPAKOVATELNOST METODY

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů jsem provedla šest měření s danou koncentrací. vypočítala jsem směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7 a Tab. 8.

Tab.7. Opakovatelnost ploch píků

Analyt	c (µg/ml)	plocha píku/plocha píku IS	s	s_r (%)
Paracetamol	3600	17,95541	0,64653	3,60
Kofein	450	4,99082	0,1701	3,41
Kys. askorbová	2700	3,29891	0,09536	2,89
Chlorfenamin	45	0,48452	0,02748	5,67

Relativní směrodatná odchylka velikosti poměru ploch píků analytu k ploše píku vnitřního standardu byla v rozmezí 2,89 – 5,67%, největší hodnota byla zjištěna u chlorfenaminu.

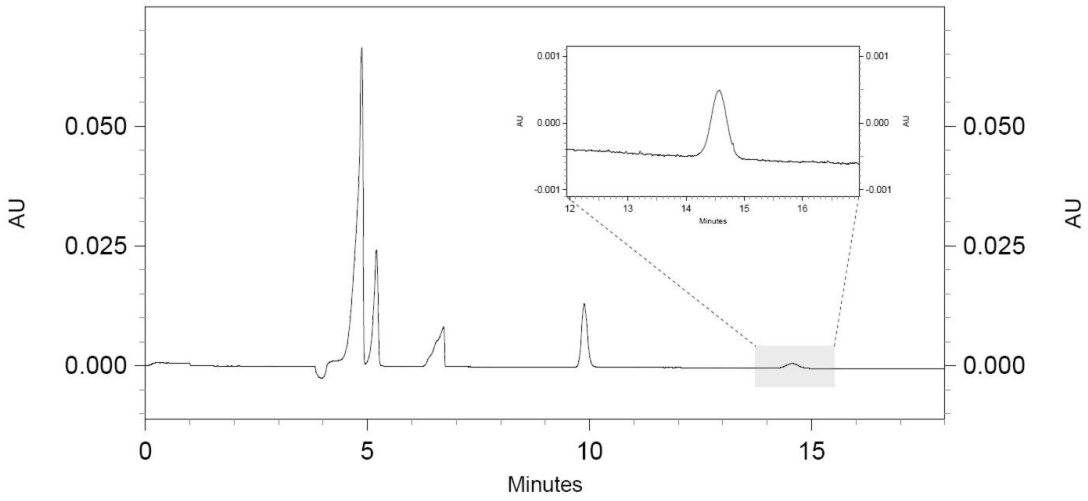
Tab.8. Opakovatelnost migračních časů (n = 6)

Analyt	c (ug/ml)	t (min)	s	s_r (%)
Paracetamol	3600	4,91	0,02822	0,57
Kofein	450	5,24	0,02627	0,50
Kys. askorbová	2700	6,91	0,0349	0,51
Chlorfenamin	45	14,89	0,13327	0,90

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybovala v rozmezí 0,50 – 0,90%, což je velmi dobrý výsledek.

6.4 ANALÝZA HVLP

Vypracovanou metodu jsem použila pro analýzu léčivého přípravku Trigrip tobolky metodou vnitřního standardu. Elektroforeogram je zobrazen na Obr. 17.



Obr. 17 Elektroforeogram přípravku Trigrip, BGE; 40mM borát, 70mM SDS, 10% MetOH, pH* 7,6; napětí 30 kV, teplota 20 °C, λ = 214 nm. Pořadí migrujících látek zleva: paracetamol, kofein, kys. askorbová, ethylparaben (IS), chlorfenamin.

Ačkoliv analyzovaný přípravek obsahuje ještě další pomocné látky, oproti analýze standardů nebyly zaznamenány žádné další píky. Pomocné látky UV záření neabsorbují, resp. jedná se o látky nerozpustné ve vodě a v extraktu z tobolek nejsou již

přítomny.nebo jsou elektroforeticky inaktivní (PL = gelatina, glyceroli tristearas, lactosum monohydricum, titanii dioxidum, flavum quinolini, erythrosinum natricun).

Měření HVLP jsem provedla pro dvě navážky po třech měřeních. Pro navážku standardů také tři měření. Množství stanovovaných látek jsem vypočítala podle vzorce:

$$m = \frac{c_{st} \cdot P_{vz} \cdot m_P \cdot f_Z \cdot 10}{P_{st} \cdot n}$$

m – obsah léčiva v tobolce v mg

c_{st} – koncentrace měřeného roztoku standardu [mg/ml]

P_{vz} – poměr plochy píky analytu k ploše píku vnitřního standardu u HVLP

P_{st} – poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu v měřeném roztoku standardů

f_Z - faktor zředění (dle pracovního postupu 15,4)

m_P – průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky (0,474 g)

n – navážka vzorku [g]

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9 Analýza přípravku Trigrip tobolky metodou MEKC

Léčivo	Obsah MEKC mg/tob.	s_r (%), n=3	Deklarovaný obsah mg/tob.
Paracetamol	195,2	1,89	200
Kofein	27,0	1,71	25
Kys.askorbová	139,1	1,23	150
Chlorfenamin	2,5	2,75	2,5

Pozn.“ Experimentálně zjištěna hmotnost obsahu 1 tobolky byla 474 mg

Obsah účinných látek zjištěný MEKC se pohybuje v rozmezí 92,73 % (KAS) až 108,00 % (KOF) deklarovaného obsahu.

6.5 OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY

6.5.1 Analýza vzorku s přídavkem standardních látek

Správnost metody jsem ověřila metodou analýzy vzorku s přídavkem standardních látek.

Recovery jsem vypočítala dle vzorce:

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

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10. Hodnoty R v rozsahu 90,43 % až 99,59 % vypovídají, že metoda MEKC poskytuje správné výsledky.

Tab. 10. Recovery zjištěné metodou přídavku standardů k HVLP

Analyt	Vložená (μg/ml)	Nalezená (μg/ml)	Recovery (%)
Paracetamol	2410	2360	97,94
Kofein	301	300	99,59
Kys. askorbová	1807	1766	97,74
Chlorfenamin	30	27	90,43

7 ZÁVĚRY

- Pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie jsem současně analyzovala paracetamol, kofein, kyselinu askorbovou a chlorfenamin.
- Vyzkoušela jsem několik elektrolytových systémů a jako nejvhodnější se ukázal borátový elektrolytový systém.
- Hledala jsem optimální podmínky pro analýzu - koncentrace borátu, pH, koncentrace SDS, přídavek organických rozpouštědel, velikost napětí a teploty.
- Jako optimální elektrolyt jsem zvolila 40 mM borát s obsahem 70 mM SDS v 10% methanolu, pH* elektrolytu jsem upravila pomocí amoniaku na hodnotu 7,6.
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm, celkové délce 60 cm, efektivní délce 50 cm. Vkládané napětí mělo hodnotu 30 kV a teplota kapiláry byla udržována na 20 °C. Detekce probíhala při vlnové délce 214 nm.
- Jako vnitřní standard pro kvantitativní analýzu jsem vybrala ethylparaben.
- Provedla jsem kalibrační závislost léčiv metodou s vnitřním standardem. Kalibrační závislosti jsem měřila pro koncentrace c (PAR) 720 - 12000 μg/ml, c (KOF) 90 - 1500 μg/ml, c (KAS) 540 - 9000 μg/ml a c (CHF) 9 - 150 μg/ml. Korelační koeficienty: r =0,9961 (PAR), r = 0,9961 (KOF), r = 0,9959 (KAS), r = 0,9851 (CHF).
- Ověřila jsem opakovatelnost metody. Pro ověření jsem provedla šest po sobě jdoucích měření pro koncentraci PAR 3600 μg/ml, KOF 450 μg/ml, KAS 2700 μg/ml, CHF 45 μg/ml. Obsah ethylparabenu (IS) byl 50 μg/ml. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 2,89 - 5,67 %, relativní směrodatná odchylka migračních časů byla 0,5 - 0,9 %.
- Migrační čas paracetamolu byl 4,91 minut, kofeinu 5,24 minut, kyseliny askorbové 6,91 minut a chlorfenaminu 14,89 minut. Ethylparaben (IS) migroval jako čtvrtý v pořadí v čase 9,62 minut.
- Vypočítala jsem kapacitní faktory pro analyty: k´ = 0,398 (PAR), k´ = 0,541 (KOF), k´ = 1,427 (KAS) , k´ = 79,55 (CHF).
- Stanovila jsem limity detekce a kvantifikace. Limit detekce: LOD = 54,5 μg/ml (PAR), LOD = 13,6 μg/ml (KOF), LOD = 81,8 μg/ml (KAS), LOD = 2,7 μg/ml

(CHF). Limit kvantifikace: LOQ = 180 μg/ml (PAR), LOQ = 45 μg/ml (KOF), LOQ = 270 μg/ml (KAS) , LOQ = 9 μg/ml (CHF).

- Vypočítala jsem rozlišení mezi jednotlivými píky. Hodnoty R_s byly v rozmezí 1,84 - 13,93. Analyty byly dokonale separovány.
- Vypočítala jsem počet teoretických pater N a výškový ekvivalent teoretického patra H. Hodnota N se pohybovala v rozmezí 1538 - 17484, hodnota H pro celkovou délku kapiláry 34,3 - 390,1, pro efektivní délku kapiláry 28,6 - 325,1.
- Vypracovanou MEKC metodu jsem použila pro stanovení paracetamolu, kofeinu, kyseliny askorbové a chlorfenaminu v průmyslově vyráběném kombinovaném přípravku TRIGRIP por. cps. dur., ve kterém jsou všechny tyto látky obsaženy. Zjištěný obsah účinných látek ve všech případech odpovídal deklarovanému obsahu. Pohyboval se v rozmezí 92,73% až 108,00%.
- Správnost metody jsem ověřila metodou analýzy vzorku s přídavkem standardních látek. Recovery se pohybuje v rozmezí 90,43 % až 99,59 %.

8 LITERATURA

1. Dolník, V.: Úvod do kapilární elektroforézy. 1. vyd. Brno: Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, Chromspec, 1994
2. Heiger, D. N.: High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction. Waldbronn: Hewlett - Packard Company, 1992
3. Khaledi, M. G.: High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications. New York, John Wiley & Sons, 1998
4. Majer, J.: Analytická chémia. 1. vyd., Martin, Osveta, 1989
5. Altria, K. D.: Application of Microemulsion Elektrokinetic Chromatography to the Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients, J. Chromatogr. A, 1999, 844(1-2), 371-386
6. Foret, F., Křivánková, L, Boček, P.: Capillary Zone Electrophoresis. Edice Electrophoresis Library, Wenheim: VCH, 1993
7. Marina, M. L.: Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis. Elsevier, Amsterdam, Elsevier B. V., 2005
8. Grossman, P-D., Colburn, J. C.: Capillary Elektrophoresis. Theory and Practice, London, Academic Press, 1992
9. Boček, P., Deml, M., Gebauer, P., Dolník, V.: Analytická kapilární izotachoforéza. Praha, Academia, 1987
10. Bartle, K. D., Myers, P.: Theory of Capillary Electrochromatography. J. Chromatogr. A., 2001, 916, 3 - 23
11. http://www.microsolvtech.com/hplc/cec_col.html, 20. 4. 2009
12. Český lékopis 2009. 1. vyd., Praha, Grada Publishing a. s., 2009, str. 1682
13. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. 1. vyd., Praha, Galén,2002
14. Švihovec, J., Novotná, H. et al.: Pharmindex Kompendium. MediMedia Information, Český Těšín, 2001, str.450
15. Mikro-verze Automatizovaného informačního systému léčivých přípravků (AISLP) 2007.2 pro MS Windows
16. Thomas, Br., Fang, XG., Shen, P., Ghodbane, S.: Mixed ion-pair liquid-chromatography metod for the simultaneous assays of ascorbic acid, caffeine,

chlorpheniramine maleate, dextromethorphan HBR monohydrate and paracetamol in Frenadol (TM) sachets. J. Pharm. Biomed. Anal., 1994, 12, 85-90

17. Gil-Augusti, M., Monferrer-Pons, L., Garcia-Alvarez-Coque, MC., Esteve-Romero, J.: Determination of active ingredients in cough-cold preparations by micellar chromatography. Talanta, 2001, 54, 621-630
18. Martinez- Algaba, C., Bermudez-Saldana, JM., Villanueva-Camanas, RM., Sagrado, S., Medina-Harnandez, MJ.: Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, 40, 312-321
19. Sun, S., Liu, G., Wang, Y.: Simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorpheniramine maleate in paracetamol and chlorpheniramine maleate granules. Chromatographia, 2006, 64, 719-724
20. Qi, ML., Wang, P., Chen, J.: LC method for the determination of multiple components in a compound cold formulation. Chromatographia, 2004, 60, 105-108
21. Okamoto, H., Nakajima, T., Ito, Y., Aketo, T., Shimada, K., Yamato, S.: Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrine-modified microemulsion electrocinetic chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 37, 517-528
22. Suntorsulk, L.: Separation of cold medicine ingredients by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 2001, 22, 139-143
23. Garcia, A., Ruperez, FJ., Marin, A., de la Maza, A., Barbas, C.: Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephryne and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. J. Chromatogr. B., 2003, 785, 237-243
24. Prodan, M., Gere-Paszti, E., Farkas, O., Forgacs, E.: Validation and simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations by RP-HPLC. Chemia Analityczna, 2003, 48, 901-907
25. Martin, A., Garcia, E., Garcia, A., Barbas, C.: Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in

pharmaceutical formulations: Capsules and sachets. J. Pharm. Biomed. Anal., 2002, 29, 701-714

26. Suntornsuk, L., Pipitharome, O., Wilairat, P.: Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 2003, 33, 441-449
27. Gil-Augusti, M., Capella-Peiro, E., Monferrer-Pons, L., Garcia-Alvarez-Coque, MC., Esteve-Romero, J.: Chromatographic analysis of phenethylamine-antihistamine combinations using C-8 and micellar sodium dodecyl sulfate-pentanol mixtures. Analyst, 2001, 126, 457-464
28. Dong, YM., Chen, XF., Chen, YL., Chen, XG., Hu, ZD.: Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by nonaqueous capillary electrophoresis. J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 39, 285-289
29. Huber, L.: Good laboratory practice: A Primer for high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, and UV-Visible spectroscopy. Hewlett-Packard Company, 1993, s. 138