

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra Analytické Chemie

Vývoj kapilárně elektroforetických metod pro analýzu  
biologicky aktivních látek s využitím tvorby  
komplexních sloučenin

Dizertační práce

V Hradci Králové, 2013

Mgr. Jitka Šíroková

# Poděkování

Chtěla bych poděkovat Doc. Poláškoví a Dr. Pavlu Jáčovi za odborné vedení, členům laboratoře elektromigračních metod Kláře Petřů, Lucii Pincové, Janu Honegrovi a Doc. Pospíšilové za konzultace a výměnu zkušeností. Kolektivu Katedry Analytické chemie za vstřícnost a podporu. Ing. Kučerové děkuji za pomoc při finální úpravě souboru dizertační práce. Dále děkuji rodině a přátelům.

Můj dík také patří profesorce Tavares z Univerzity v São Paulu a Fondu mobility Univerzity Karlovy za umožnění stáže v laboratoři elektromigračních metod na Univerzitě v São Paulu.

Tato práce vznikla za finanční podpory Univerzity Karlovy v Praze (projekty SVV: 263 002/2011, 265 002/2012, 267 002/2013), Fondu rozvoje vysokých škol (FRVŠ projekt 595/2011) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK projekt 263 811).

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2.4.2013

Jitka Šíroká

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Jitka Šíroková

Školitel: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Název dizertační práce: „VÝVOJ KAPILÁRNĚ ELEKTROFORETICKÝCH METOD PRO ANALÝZU BILOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK S VYUŽITÍM TVORBY KOMPLEXNÍCH SLOUČENIN“

Dizertační práce se zabývá vývojem kapilárně elektroforetických metod pro stanovení biologicky aktivních látek z oblasti forenzních, klinických a farmaceutických analýz za pomoci spektrofotometrické detekce.

Úvodní část obsahuje teoretické pozadí k jednotlivým experimentálním částem. Nejdříve se věnuje základním aspektům kapilární elektroforézy, dále pak problematice zvyšování selektivity a citlivosti v kapilární elektroforéze, závěrem představuje jednotlivé analyty.

První experimentální část tvoří stanovení izomerů chlorofenylpiperazinu (*ortho*, *meta*, *para*) v konfiskovaných tabletách za pomoci cyklodextrinu jako selektoru v kyselém prostředí fosfátového pufru.

Druhá experimentální část se věnuje stanovení biomarkeru oxidačního poškození DNA 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu v moči s využitím tvorby komplexů s borátem včetně předseparační úpravy vzorku a on-line zakoncentrování v cele s prodlouženou optickou dráhou.

Třetí experimentální část se zabývá stanovením citrusových flavonoidů (hesperidin, diosmin, rutin), troxerutinu a kyseliny askorbové v léčivých přípravcích a potravinových doplňcích s využitím komplexotvorného borátového pufru jako základního elektrolytu.

Ve čtvrté části je studován vliv přítomnosti komplexačních činidel wolframanu a borátu na stupeň zakoncentrování pomocí nástřiku dlouhé zóny vzorku s obrácením polarity na modelové směsi flavonoidů (apigenin, rutin, hyperosid, kvercetin, luteolin) a fenolických kyselin (chlorogenová, *para*-kumarová, skořicová kyselina).

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Jitka Šíroká

Supervisor: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Title of Doctoral Thesis: „DEVELOPMENT OF ELECTROPHORETIC METHODS FOR THE ANALYSIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS USING COMPLEX FORMATION”

The dissertation is dealing with the development of capillary electrophoretic methods with spectrophotometric detection for the determination of biologically active substances in forensic, clinical and pharmaceutical fields.

Theoretical background to the individual experimental parts is presented in the Introduction. Basic principles of capillary electrophoresis are explained, problems of separation selectivity and sensitivity are discussed and the analytes under study are characterised.

The first experimental part is devoted to electrophoretic determination of chlorophenylpiperazine isomers (*ortho*, *meta*, *para*) in confiscated pills using cyclodextrins as selectors in acidic phosphate buffer.

The second experimental part is devoted to the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (an oxidation stress biomarker) using complex formation with borate including sample pretreatment prior analysis and on-line preconcentration by sample stacking in a detection cell with long optical path.

The third part is dealing with the electrophoretic assay of citrus flavonoids (hesperidin, diosmin, rutin), troxerutin and ascorbic acid in pharmaceuticals and food supplements by using complex-forming borate buffer as the background electrolyte.

In the fourth experimental part the influence of the presence of complex forming anions (tungstate and borate) on the pre-concentration efficiency of the large volume sample stacking with polarity switching is studied on standard mixtures of flavonoids (apigenin, rutin, hyperoside, quercetin, luteolin) and phenolic acids (chlorogenic, *para*-coumaric, cinnamic acid).

# Seznam zkratek

8OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin
A	Amfetamin
AA	Kyselina askorbová (Ascorbic acid)
AD	Amperometrická detekce
API	Apigenin
A <sub>s</sub>	Asymetrie píku
BGE	Základní elektrolyt (Background electrolyte)
CD	Cyklodextrin
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CMC	Kritická micelární koncentrace (Critical micellar concentration)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis)
ČL	Český lékopis
CTAB	Hexadecyltrimethylamoniumbromid
DAD	Detekce pomocí diodového pole (Diode array detection)
DAPPI	Desorpční fotoionozace za atmosférického tlaku (Desorption atmospheric pressure photoionization)
DI	Diosmin
DM-β-CD	Dimetyl-β-cyklodextrin
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
ECD	Elektrochemická detekce
EME	Elektromembránová extrakce (Elektromembrane extraction)
EOF	Elektroosmotický tok (Electroosmotic flow)
EK	Elektrokinetický nástřik vzorku
EtOH	Etanol
FASS	Zakoncentrování pomocí zesíleného pole (Field amplified sample stacking)
FDA	Úřad pro léky a potraviny (Food and Drug Administration)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GLC	Plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází (Gas liquid chromatography)
HD	Hydrodynamický nástřik vzorku
HE	Hesperidin
HLB	Hydrofilně-lipofilní sorbent (Hydrophilic-lipophilic-balanced reversed-phase sorbent)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
HP-β-CD	Hydroxypropyl-β-cyklodextrin
HY	Hyperosid
CHES	N-Cyklohexyl-2-aminoetanesulfonová kyselina
CHLG	Chlorogenová kyselina
ICH	International Conference on Harmonization of Technological Requirements for registration of Pharmaceutical for Human Use
ID	Vnitřní průměr (Inner diameter)
IS	Vnitřní standard (Internal standard)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid chromatography)

LE	Vedoucí elektrolyt (Leading electrolyte)
LE-CE	Ligand exchange capillary electrophoresis
LLE	Extrakce kapalnou fází (Liquid liquid extraction)
LOD	Limit detekce (Limit of detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of quantification)
LU	Luteolin
LVSS	Zakoncentrování z velkého objemu vzorku s obrácením polarity (Large volume sample stacking with polarity switching)
Me	Metamfetamin
MAX	Mixed-mode anion exchange sorbent
mCPP	<i>Meta</i> -chlorofenylpiperazin
MCX	Mixed-mode cation exchange sorbent
MDA	3,4-metylendioxyamfetamin
MDEA	3,4-metylendioxy-N-etylamfetamin
MDMA	3,4-metylendioxymetamfetamin
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	Methanol
MIP	Molekulárně vtištěné polymery (Molecular imprinted polymers)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
M- $\beta$ -CD	Metyl- $\beta$ -cyklodextrin
N	Počet teoretických pater (Number of theoretical plates)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPD	Dusíko-fosforový detektor
oCPP	<i>orto</i> -chlorofenylpiperazin
pCPP	<i>para</i> -chlorofenylpiperazin
pH*	pH ve smíšeném vodně-organickém prostředí
p-KU	<i>para</i> - kumarová kyselina
Q	Kvercetin (Quercetin)
R	Korelační koeficient
R <sub>S</sub>	Rozlišení (Resolution)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative standart deviation)
RU	Rutin
s	Směrodatná odchylka
s <sub>R</sub>	Reziduální odchylka
SDS	Sodium dodecyl sulfát
SK	Skořicová kyselina
SPE	Extrakce na tuhé fázi (Solid phase extraction)
SPME	Mikroextrakce na tuhé fázi (Solid phase microextraction)
SST	Test vhodnosti systému (System suitability testing)
TE	Koncový elektrolyt
tITP	Přechodná isotachoforéza (Transient isotachopheresis)
TR	Troxerutin
TTAB	Tetradecyltrimetylamonium bromid
USP	Americký lékopis (United States Pharmacopeia)
UV	Ultra fialové záření (Ultraviolet)

# Obsah

1	Cíl práce.....	10
2	Teoretická část .....	11
2.1	Kapilární elektroforéza.....	11
2.1.1	Historie .....	11
2.1.2	Charakteristika.....	11
2.1.3	Instrumentace .....	12
2.1.4	Princip CE separace.....	14
2.1.5	Faktory vlivňující separaci .....	17
2.2	Způsoby zvyšování selektivity a citlivosti CE separací .....	18
2.2.1	Zvyšování selektivity prostřednictvím tvorby komplexů.....	18
2.2.2	Techniky zvyšování citlivosti .....	20
2.3	Charakteristika biologicky aktivních látek .....	27
2.3.1	Kriminalisticky významné analyty: chlorofenylpiperazinové deriváty .....	27
2.3.2	Klinicky významné biomarkery: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin.....	29
2.3.3	Farmaceuticky významné látky: flavonoidy, fenolkarboxylové kyseliny a jiné antioxidanty.....	31
3	Experimentální část.....	37
3.1	Materiál a chemikálie.....	37
3.1.1	Základní přístrojové vybavení.....	37
3.1.2	Základní chemikálie .....	37
3.2	Test vhodnosti systému (system suitability testing-SST).....	38
3.3	Validace metody .....	39
3.4	Parametry CE metody: .....	41
3.5	Experimentální část 1: Separace a stanovení izomerů chlorofenylpiperazinu v konfiskovaných tabletách metodou kapilární elektroforézy .....	43
3.5.1	Cíl .....	43
3.5.2	Materiál a metody .....	43
3.5.3	Výsledky a diskuze: .....	44
3.5.4	Závěr .....	51



3.6	Experimentální část 2: Vývoj citlivé elektroforetické metody pro stanovení 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu v moči.....	52
3.6.1	Cíl .....	52
3.6.2	Materiál a metody .....	52
3.6.3	Výsledky a diskuze .....	53
3.6.4	Závěr .....	59
3.7	Experimentální část 3: Analýza citrusových flavonoidů, troxerutinu a kyseliny askorbové v potravinových doplňcích a farmaceutických přípravcích metodou kapilární zónové elektroforézy .....	60
3.7.1	Cíl .....	60
3.7.2	Materiál a metody .....	60
3.7.3	Výsledky a diskuze .....	62
3.7.4	Závěr .....	67
3.8	Experimentální část 4: Studium separace flavonoidů a fenolických kyselin s využitím tvorby komplexů s kovovými ionty a on-line zakoncentrováním analytů .....	68
3.8.1	Cíl .....	68
3.8.2	Materiál a metody .....	68
3.8.3	Výsledky a diskuze .....	69
3.8.4	Závěr .....	74
4	Závěr .....	75
5	Seznam použité literatury .....	76
6	Přehled prací zahrnutých do dizertační práce .....	88
6.1	Odborné články .....	88
6.2	Přednášky a postery prezentované na konferencích .....	88
6.2.1	Přednáška .....	88
6.2.2	Postery .....	89

# 1 Cíl práce

Cílem mé práce byl vývoj kapilárně elektroforetických metod pro separaci a stanovení biologicky aktivních analytů z různých oblastí zájmu (forezní, klinické, farmaceutické) s využitím tvorby komplexů s borátem, kovovými ionty či cyklodextriny, jejich validace a aplikace k analýze reálných vzorků.

## 2 Teoretická část

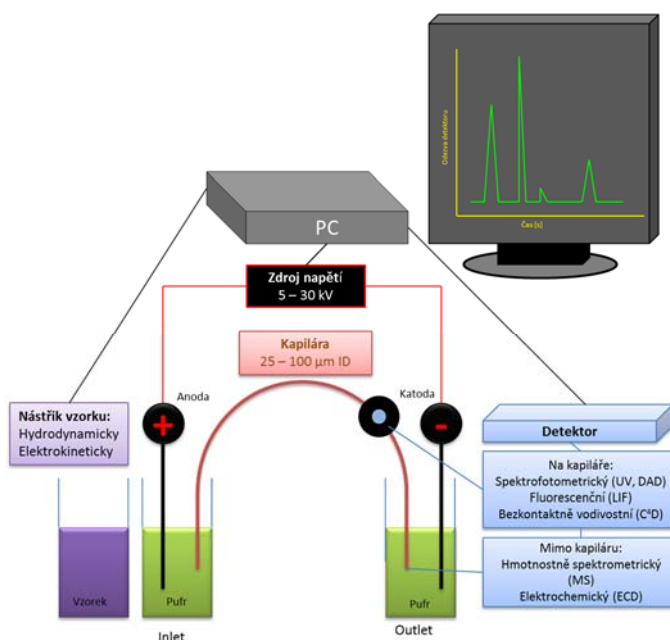
### 2.1 Kapilární elektroforéza

#### 2.1.1 Historie

V průběhu 19. století došlo k několika zásadním pokusům a snahám o formulování zákonů týkajících se elektroforézy (Kohlrausch, Helmholtz). V roce 1937 švédský chemik Tiselius na základě separace proteinů v séru popsal princip elektroforézy, v následujících letech sestrojil první elektroforetický přístroj. Vývoj pokračoval dále od elektroforézy ve volném roztoku k elektroforéze v trubicovém provedení (skleněné, teflonové trubice). Od 80. let se experimenty začínají provádět v úzkých křemenných kapilárách o průměru 25 – 100  $\mu\text{m}$ , díky čemuž se výrazně zlepšuje účinnost separací. V roce 1989 byl uveden na trh první plně automatický kapilárně elektroforetický systém (P/ACE™ 2000 Beckman Instruments).[1, 2]

#### 2.1.2 Charakteristika

Kapilární elektroforéza (CE) je separační elektromigrační metoda založená na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. V současnosti je jednou z nejrozšířenějších metod zejména pro analýzu a stanovování látek iontové povahy. Základní uspořádání kapilární elektroforézy je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 Obecné schéma elektroforetického analyzátoru.

Separace probíhá v křemenné kapiláře, která je během separace naplněna pufrém, konce kapiláry jsou umístěny v nádobkách s pufrém. Do nádobek jsou také ponořeny elektrody

(anoda a katoda), na které je přiváděno stejnosměrné vysoké napětí ze zdroje. Vzorek se dávkuje tlakem- hydrodynamické dávkování (HD) nebo působením elektrického pole- elektrokinetické dávkování (EK) z nádoby umístěné na dávkovacím konci kapiláry (inlet). Po nástřiku je nádoba se vzorkem nahrazena nádobkou s puřem, je vloženo elektrické napětí (desítky kV) a probíhá separace. V běžné CE je dávkovací konec kapiláry (inlet) umístěn do nádoby s anodou a druhý konec separační kapiláry (outlet) v nádobce s katodou, detekční okno je umístěno přímo na kapiláře blíže k outletu či je kapilára vyvedena do detektoru (hmotnostní spektrometrie).

Výhody a nevýhody kapilární elektroforézy v porovnání s jinými separačními technikami jsou shrnuty v Tab. 1.

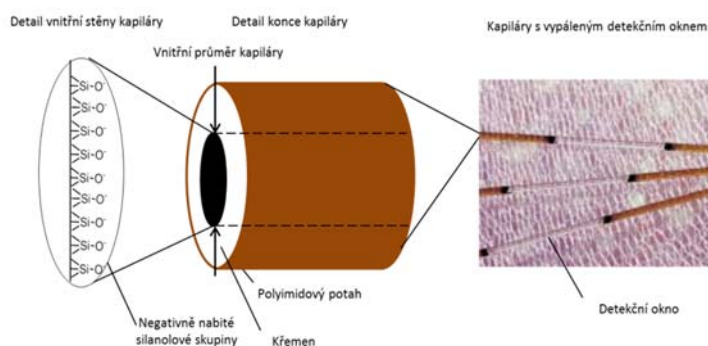
Tab. 1. Klady a zápory CE oproti jiným separačním technikám.

Výhody	Nevýhody
vysoká separační účinnost	nízká koncentrační citlivost při UV detekci
nízká spotřeba vzorku a chemikálií	problematická robustnost
málo odpadu	
mnohostranost využití (nabité, neutrální, chirální, vysoko i nízkomolekulární látky, bakterie, viry)	

## 2.1.3 Instrumentace

### 2.1.3.1 Kapilára

V kapilární elektroforéze se používají křemenné kapiláry o vnitřním průměru 25 – 100  $\mu\text{m}$  (nejčastěji 50 a 75  $\mu\text{m}$ ) na povrchu kvůli křehkosti potažené ochrannou polyimidovou vrstvou. Při spektrofotometrické detekci je třeba polyimidovou vrstvu v místě detekce odstranit, nejčastěji vypálením nebo vyleptáním (Obr. 2).



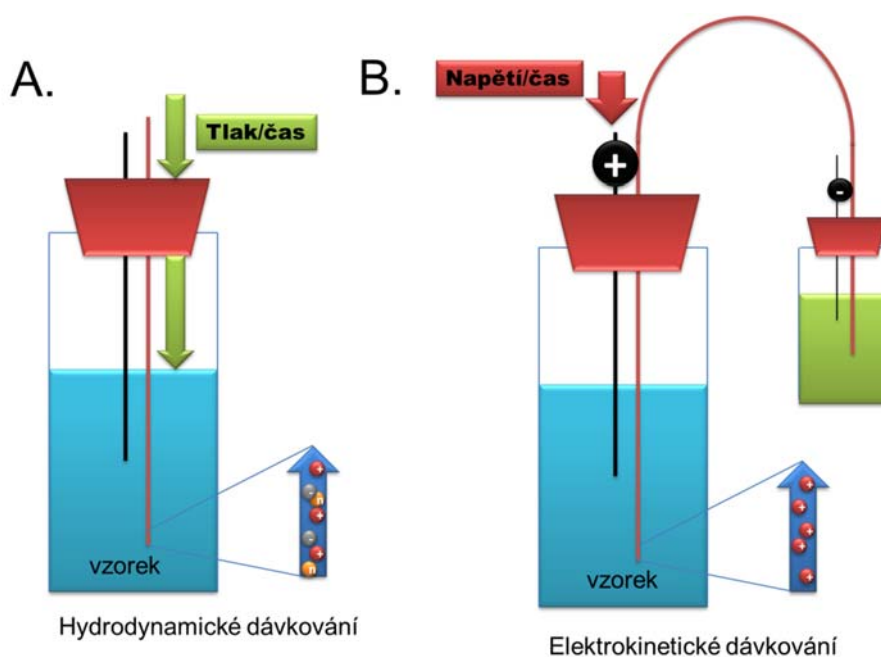
Obr. 2 Separací kapilára.

Úzký průměr kapiláry umožňuje její efektivní chlazení, které je nutné provádět, protože při průchodu elektrického proudu kapilárou po vložení vysokého napětí se uvolňuje teplo (Jouleovo teplo). Navíc úzký průměr kapiláry podporuje vznik elektroosmotického toku

(EOF), tj. hybné síly kapilárně elektroforetických separací. Na druhou stranu úzký průřez kapiláry má za následek poměrně nízkou citlivost CE při spektrofotometrické detekci.

### 2.1.3.2 Dávkování

CE se vyznačuje nízkou spotřebou vzorku, běžný objem nástřiku se pohybuje v rozmezí mezi 1 – 50 nL. Existují dva způsoby nástřiku hydrodynamický (HD) a elektrokinetický (EK) Obr. 3 A, B. [3]



Obr. 3 Způsoby dávkování v CE.

Nejpoužívanější je hydrodynamický způsob dávkování (Obr. 3 A), který spočívá v působení tlaku na hladinu vzorku. Běžné tlaky nástřiku jsou 25 - 150 mba po dobu 2 - 10 s. Složení vzorku se s jednotlivými nástřiky nemění. Dalšími minoritními způsoby HD nástřiku může být působení vakua na nádobku na opačné straně kapiláry než je vzorek nebo tzv. sifonovým efektem mezi rozdílnými hladinami. Objem nástřiku lze vypočítat níže uvedeným vztahem (1). [3]

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L} \quad (1)$$

$\Delta P$  = tlak nástřiku [Pa];  $d$  = průměr kapiláry [m];  $t_{inj}$  = doba nástřiku [s];  $L$  = celková délka kapiláry [m];  $\eta$  = viskozita pufru [N.s.m<sup>-2</sup>]

Při elektrokinetickém dávkování (Obr. 3 B) se uplatňuje především elektroforetická pohyblivost jednotlivých iontů ve vzorku. Na elektrody se vkládá dávkovací napětí  $\pm 5 - 10$  kV po dobu několika sekund, přičemž se do kapiláry nadávkuje vzorek, který je v závislosti na polaritě dávkovacího napětí a vlastní mobilitě iontů selektivně obohacen o pohyblivější kationty či anionty. Složení vzorku se s jednotlivými nástřiky mění; proto pro dosažení

přijatelné opakovatelnosti je třeba pro každý nástřik dávkovat z nové nádoby se vzorkem. Množství nastříknutého vzorku ( $Q$ ) v gramech či molech je možné vypočítat z níže uvedeného vztahu (2). [3]

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF})U\pi r^2 C t_{inj}}{L} \quad (2)$$

$\mu_e$  = elektroforetická mobilita analytu [ $m^2 \cdot V \cdot s$ ],  $\mu_{EOF}$  = mobilita elektroosmotického toku [ $m^2 \cdot V \cdot s$ ];  $U$  = napětí [V];  $r$  = poloměr kapiláry [m];  $C$  = koncentrace analytu;  $t_{inj}$  = doba nástřiku [s];  $L$  = celková délka kapiláry [m]

### 2.1.3.3 Detekce

I přes nižší citlivost je u CE podobně jako u kapalinové chromatografie (LC) spektrofotometrická detekce nejběžnější. Pokud tedy chceme dosáhnout nižších detekčních limitů, je třeba použít detektor elektrochemický, fluorescenční nebo hmotnostně spektrometrický. Porovnání jednotlivých detekčních technik ve spojení s CE je uvedeno v Tab. 2.

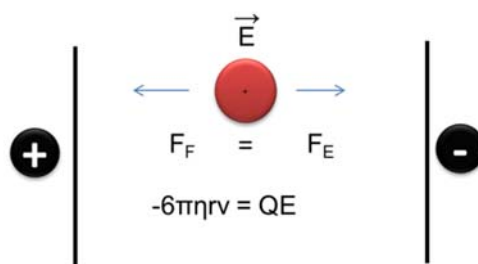
Tab. 2. Techniky detekce ve spojení s CE [3].

Způsob detekce	Koncentrační citlivost [mol]	Poznámka
Spektrofotometrická (UV, VIS)	$10^{-12}$ - $10^{-15}$	Univerzální
Fluorescenční (LIF)	$10^{-18}$ - $10^{-20}$	velmi citlivá
Vodivostní (CCD)	$10^{-15}$ - $10^{-16}$	Univerzální
Elektrochemická (ECD)	$10^{-18}$ - $10^{-19}$	Citlivá
Hmotnostně spektrometrická (MS)	$10^{-16}$ - $10^{-17}$	Citlivá
Nepřímá UV, fluorescenční, vodivostní, elektrochemická	10 – 100 krát nižší než u přímé UV/VIS metody	Univerzální

## 2.1.4 Princip CE separace

### 2.1.4.1 Elektroforéza

Výsledná migrační (efektivní) rychlost nabitě částice v elektrickém poli pohybující se k elektrodě opačného znaménka je dána interakcí síly elektrického pole ( $F_E$ ) a brzdě síly ( $F_F$ ) (Obr. 4). Síla elektrického pole ( $F_E$ ) způsobuje pohyb částic a je dána součinem intenzity elektrického pole ( $E$ ) a nábojem částice ( $Q$ ). Proti pohybu částic působí brzdě síla ( $F_F$ ), která je dle Stokesova zákona úměrná rychlosti ( $v$ ), poloměru částice ( $r$ ) a viskozitě kapaliny ( $\eta$ ). [4]



Obr. 4 Působení sil na částici v elektrickém poli.

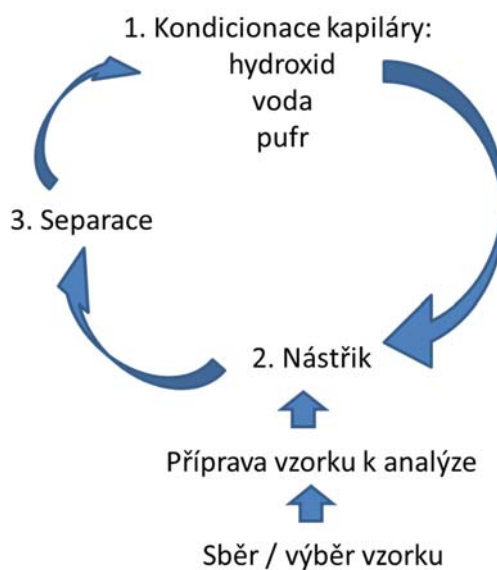
Z toho plyne, že elektroforetická rychlost ( $v$ ) je dána vztahem **(3)**.

$$v = \frac{QE}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

Elektroforetická rychlost může být také vyjádřena jako elektroforetická pohyblivost ( $\mu$ ), což je rychlost při jednotkové intenzitě elektrického pole **(4)**. [4]

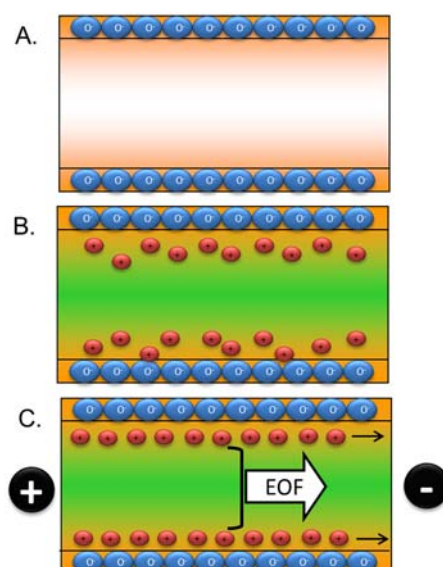
$$\mu = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

### 2.1.4.2 Elektroosmotický tok

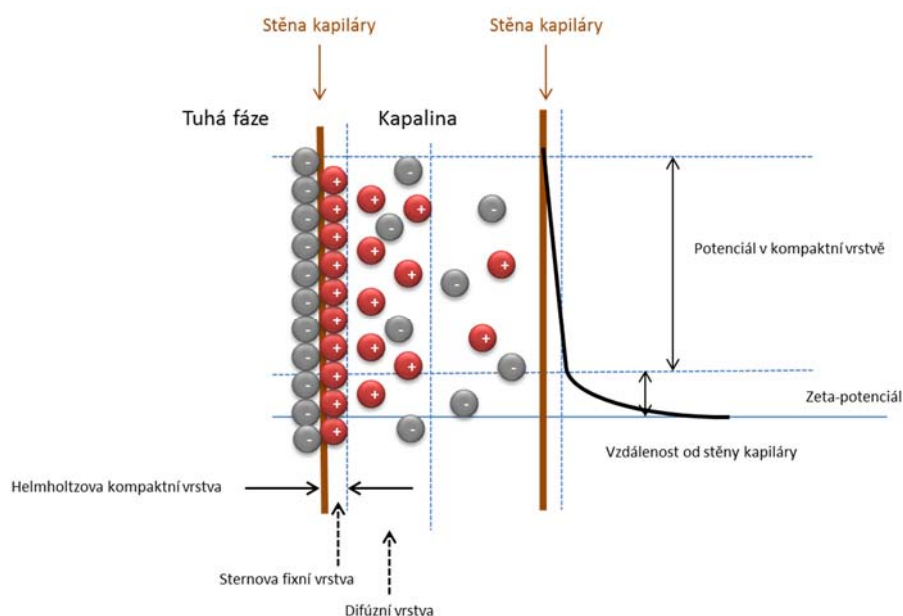


Obr. 5 Schéma CE analýzy.

Separční CE metoda se zpravidla skládá ze tří základních kroků: promytí kapiláry, nástřiku vzorku a separace (Obr. 5). Promývání kapiláry roztokem hydroxidu způsobuje hydrolýzu a disociaci silanolových skupin vnitřního povrchu kapilár, který tím získá záporný náboj (Obr. 6 A). Na rozhraní fází, které obsahují nabitě částice, vzniká na základě elektrostatických zákonů elektrická dvojvrstva: Helmholtzova vrstva a difúzní vrstva (Obr. 6 B, Obr. 7). Rozdíl potenciálu mezi vnitřní a vnější hranicí difúzní vrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál (zeta-potenciál). [4]



Obr. 6 Vznik elektroosmotického toku (EOF). (A) negativně nabitá stěna kapiláry. (B) Naplnění kapiláry elektrolytem, vznik dvojvrstvy. (C) Katodický elektroosmotický tok po aplikaci napětí.



Obr. 7 Vznik elektrické dvojvrstvy v kapiláře [4].

Vloží-li se na elektrody napětí, začnou se kationty difúzní vrstvy pohybovat ke katodě a jejich prostřednictvím dojde k pohybu celého objemu kapiláry směrem ke katodě. Tento jev se nazývá elektroosmotický tok (EOF) a je hnací silou CE separací (Obr. 6 C). Vlivem EOF dochází k pohybu kationtů, aniontů i neutrálních látek. Jeho rychlost je úměrná zeta potenciálu ( $\xi$ ), intenzitě elektrického pole ( $E$ ), relativní permeabilitě roztoku ( $\epsilon$ ) a nepřímo úměrná viskozitě ( $\eta$ ) jak vyjadřuje vztah (5). [4]



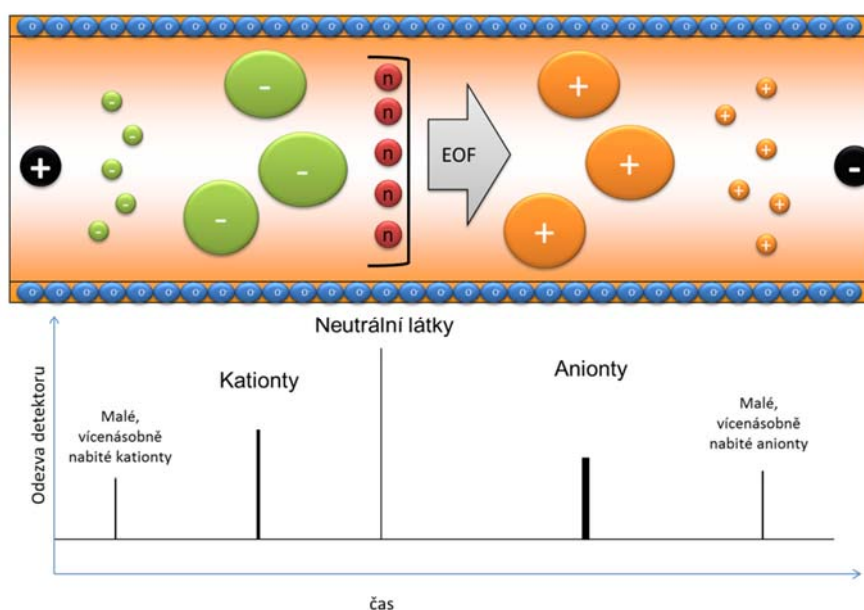
$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \xi}{\eta} \quad (5)$$

Pro pohyblivost EOF platí vztah (6). [4]

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \xi}{\eta} \quad (6)$$

Při separaci se analyty pohybují ke katodě různými rychlostmi, které závisí na jejich elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti EOF. Rychlost EOF se přičítá k migrační rychlosti částic, které migrují stejným směrem, a odečítá od migrační rychlosti částic, které migrují opačným směrem. [4]

Při postupu zóny vzorku směrem k detektoru (katodě) dochází k oddělení jednotlivých analytů vzhledem k poměru velikosti a náboje. Během jedné analýzy je možné oddělit, detekovat a stanovit kationty i anionty, neutrální látky oddělit nelze (migrují s EOF). Kationty migrují nejrychleji, jelikož jsou přitahovány katodou a neseny EOF stejným směrem. Neutrální látky jsou unášeny rychlostí EOF, ale nedochází k jejich separaci. Anionty migrují nejpomaleji, jelikož jsou přitahovány k anodě, ale EOF je unáší směrem ke katodě (Obr. 8). [3]



Obr. 8 CE separace.

## 2.1.5 Faktory vlivňující separaci

### 2.1.5.1 Jouleovo teplo

Vlivem průchodu elektrického proudu (desítky až stovky  $\mu\text{A}$ ) vzniká Jouleovo teplo, které deformuje rychlostní profil analýzy (způsobuje rozšiřování píků, rozmývání zón, lokální změny ve viskozitě). Čím vodivější pufr a čím větší průměr kapiláry, tím více Jouleova tepla vzniká, což vede ke zhoršení separace. Pro udržení konstantní teploty a zamezení vzniku

joulova tepla je třeba kapiláru ochlazovat. V provedení různých firem se kapilára chladí kapalinou (Beckman Coulter), vzduchem (Prince) nebo vakuem (Agilent).

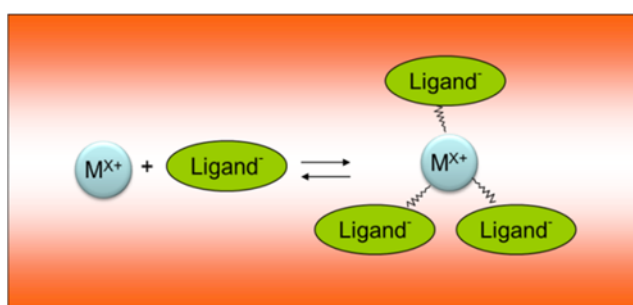
## 2.2 Způsoby zvyšování selektivity a citlivosti CE separací

### 2.2.1 Zvyšování selektivity prostřednictvím tvorby komplexů

Při separaci látek podobné struktury a vlastností se může stát, že relativní rozdíly efektivních elektroforetických pohyblivostí analytů jsou malé a selektivita separace je nedostatečná. V některých případech se toto dá odstranit úpravou pH pufru, v jiných případech je výhodné využít interakcí mezi analyty a speciálními složkami přidanými do pufru tzv. selektory (surfaktanty, organická rozpouštědla, komplexační činidla, atd.).

#### 2.2.1.1 Tvorba komplexů s borátem a kovovými ionty

Schopnost analytů tvořit kladně nebo záporně nabité komplexy může vylepšit jak selektivitu separace, tak i citlivost detekce [5]. Komplexy vznikající na základě donor- akceptorových vazeb mezi kovovým- centrálním iontem (poskytuje elektrony) a organickou nebo anorganickou sloučeninou- ligandem (přijímá elektrony) se liší ve stabilitě, ve velikosti náboje, hmotnosti a tedy i v elektroforetické pohyblivosti. V praktickém provedení separační pufr obsahující ligand/centrální ion uvnitř kapiláry interaguje s analytem a vzniknou komplexy (Obr. 9). Jedná se o dynamický proces vzniku a disociace nabitých komplexů [6]. Komplexace je možné využít jak pro separaci centrálních kovových iontů [5, 6], tak i pro separaci organických ligandů [7, 8].

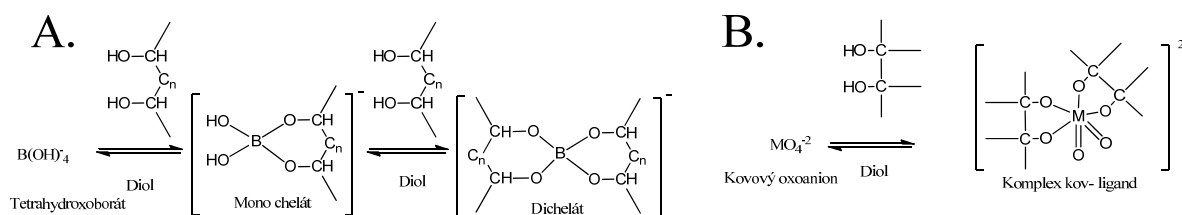


Obr. 9 Vznik komplexu kovový ion a ligand přímo v kapiláře.

Borátový pufr je nejčastěji používané komplexační činidlo pro separaci látek, které mají ve struktuře vhodně stericky uspořádané substituenty (sousední hydroxy a karboxy skupiny). Mohou to být například cukry [9, 10], fenolické látky (polyfenoly, flavonoidy) [11, 12], nukleosidy [13]. Rozmezí pH 8 – 10 borátového pufru zajistí ionizaci  $-OH$  či  $-COOH$  skupin, které reagují s borátem za vzniku záporně nabitých chelátů  $BL^-$  (monochelát) nebo  $BL_2^-$  (dichelát) (Obr. 10 A) [10]. Borát se také může uplatnit jako centrální ion při chirálních

separacích v ligand-exchange kapilární elektroforéze (LE-CE) [14, 15]. Jistou nevýhodou tohoto elektrolytu je nebezpečí oxidace analytů (hlavně antioxidantů) vzdušným kyslíkem, ke kterému dochází při vyšším pH [16].

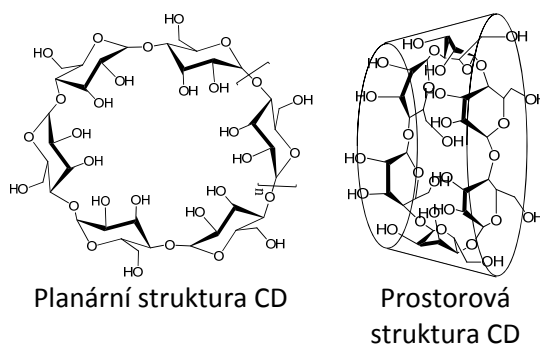
Na rozdíl od borátu ionty wolframanu a molybdenanu mohou vytvářet s analyty, které mají vhodně stericky uspořádané (vicinální) hydroxy a karboxy skupiny, dostatečně stabilní aniontové komplexy i při nižších hodnotách pH (slabě kyselé až neutrální) [16, 17] (Obr. 10 B).



Obr. 10 Schéma vzniku komplexů s borátem a kovovými ionty (molybdenan a wolframan) [7].

### 2.2.1.2 Tvorba komplexů s cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou nejčastěji používané selektory v analytické chemii. Dle počtu glukózových jednotek existují tři typy CD:  $\alpha$  (6)  $\beta$  (7) a  $\gamma$  (8). Molekula CD má kuželovitý tvar (Obr. 11). Glukózové jednotky mohou obsahovat nabitě (karboxy, amino, sulfo) i nenabitě (methyl, hydroxypropyl) substituenty. Na povrchu hydrofilní, uvnitř kuželu ukrývají hydrofobní dutinu, ve které se zadržují hydrofobní části analytů. Vznik hostitelských (inkluzních) komplexů je založen na hydrofobních interakcích mezi analytem a hydrofobní dutinou CD, společně s polárními interakcemi mezi substituenty analytu a polárním okrajem CD [3, 18, 19]. Vlastnosti základních neutrálních CD jsou uvedeny v Tab. 3.

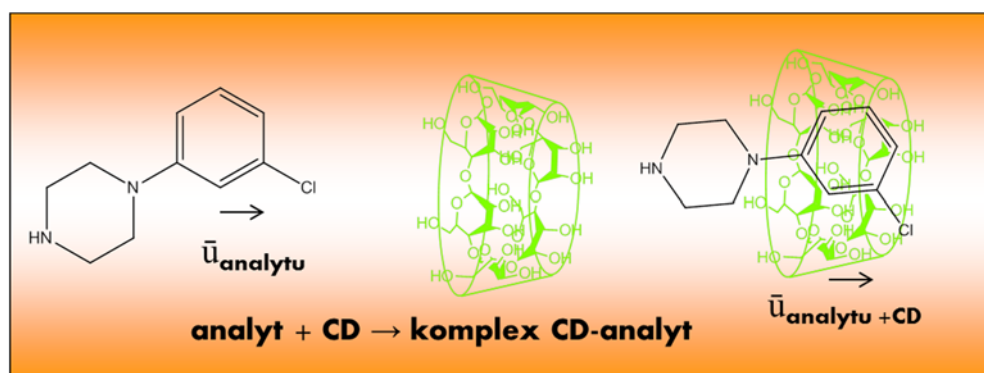


Obr. 11 Základní struktura cyklodextrinů [19].

Tab. 3. Vybrané vlastnosti neutrálních CD [19].

Vlastnosti CD	Druh CD		
	A	$\beta$	$\gamma$
Počet glukózových jednotek	6 (n=0)	7 (n=1)	8 (n=2)
Molekulová hmotnost	972	1135	1297
Vnitřní průměr [nm]	0,57	0,8	0,1
Hloubka [nm]	0,78	0,78	0,78
Rozpustnost [g/100 mL vody]	14,5	1,85	23,2
pKa	12,33	12,20	12,08

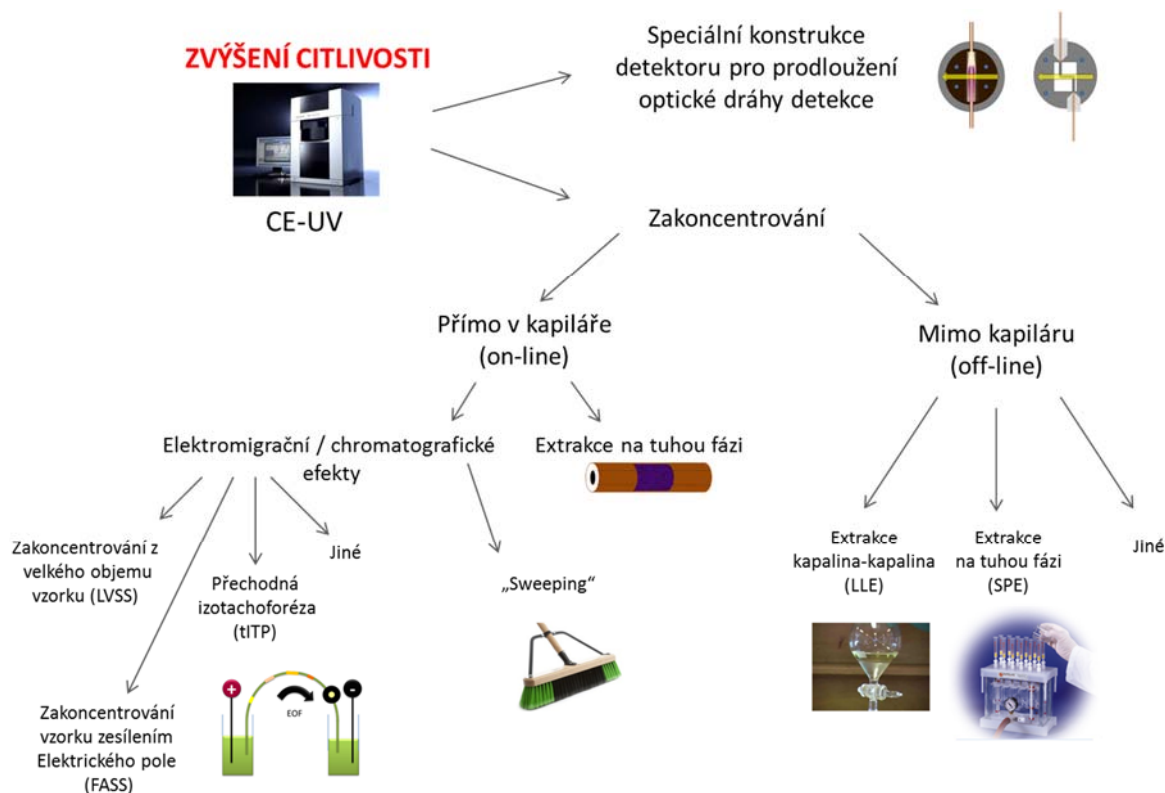
Migrační čas analytů je závislý na jejich vlastní mobilitě a stupni interakce s CD. Separace je způsobena rozdíly ve stabilitě komplexu CD-analyt (Obr. 12) [2].



Obr. 12 Grafické znázornění vzniku komplexu analyt-CD.

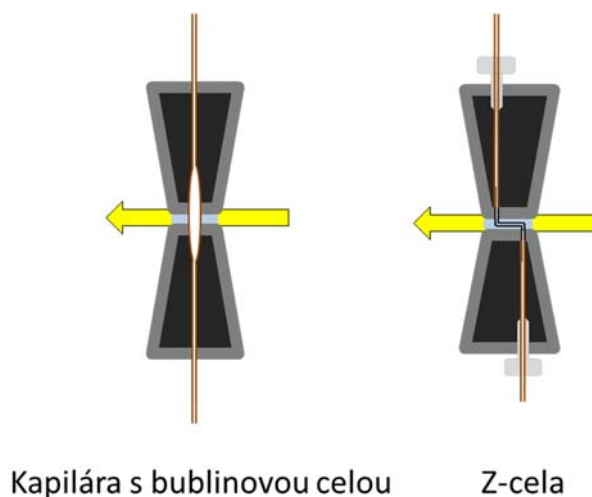
## 2.2.2 Techniky zvyšování citlivosti

Mezi nevýhody CE oproti chromatografickým metodám je nízká citlivost při UV detekci. Důvodem je krátká absorpční dráha světelného paprsku v kapilárách o malém vnitřním průměru a dávkování malých objemů vzorku [20]. Elegantní řešení zvýšení citlivosti v CE představují prekoncentrační techniky přímo v kapiláře (on-line zakoncentrování) a speciální řešení konstrukce detektoru tzv. vysokocitlivostní detekční cely. Schéma možností zvyšování citlivosti v CE je znázorněno na Obr. 13.



Obr. 13 Schéma možností zvyšování citlivosti v CE s spektrofotometrickou detekcí [21].

### 2.2.2.1 Vysokocitlivostní detekční cely



Obr. 14 Kapiláry s prodlouženou délkou optické dráhy.

Citlivost detekce může být zvýšena zvětšením vnitřního průměru kapiláry. Aby však nedošlo ke ztrátě separační účinnosti a rozlišení oproti běžným kapilárám, je výhodné rozšíření pouze v místě detekce. Byly navrženy dva typy: kapilára s bublinovou celou, jejíž vnitřní průměr v místě detekce je přibližně třikrát větší než průměr zbytku kapiláry a z-cela, kde optický paprsek prochází příčně kapilárou ohnutou do tvaru Z a prodloužení optické dráhy je asi

desetkrát větší (Obr. 14). Ke zvýšení citlivosti dochází zvýšením poměru signálu k šumu (S/N). [3]

### 2.2.2.2 Zakoncentrování v kapiláře

Zakoncentrování v kapiláře je jeden ze způsobů zvyšování citlivosti. Může být založeno jak na principu elektromigračním (vlastní stacking), tak i na principu chromatografickém (tzv. sweeping) [20]. V Tab. 4. jsou uvedena pozitiva a negativa on-line zakoncentrování.

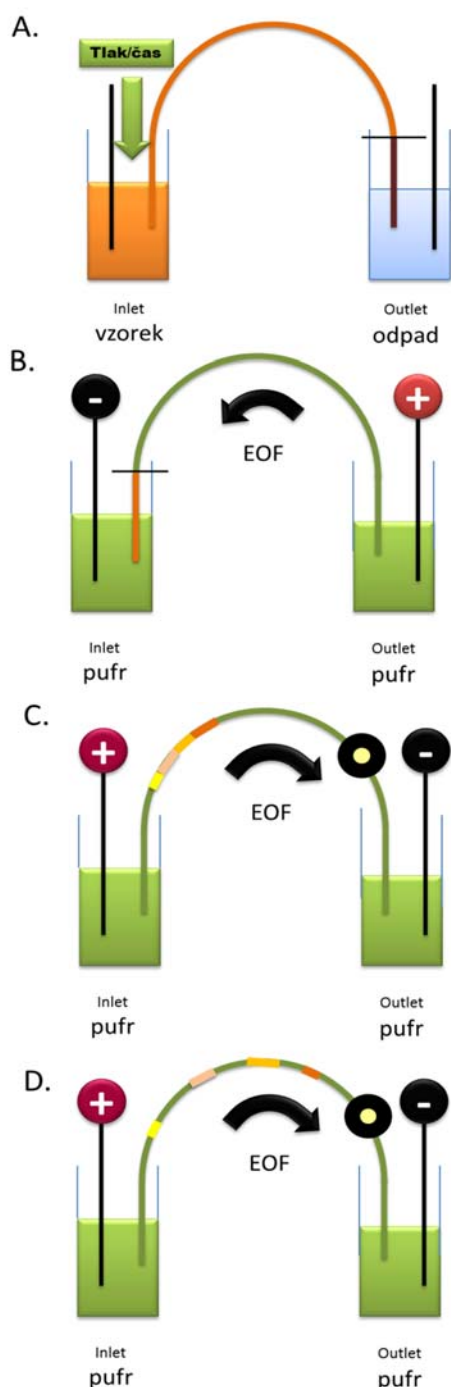
Tab. 4. Klady a zápory on-line zakoncentrování v CE.

Výhody	Nevýhody
Není nutná úprava CE systému	Nutná optimalizace - silný vliv matrice
Rychlé a snadné provedení	Není univerzální
Nedochází ke ztrátám vzorku	Není možno zakoncentrovat jakýkoli analyt Současně se zakoncentrují i balastní látky

Pro uskutečnění některých typů zakoncentrování je podmínka nízké vodivosti matrice vzorku (LVSS, FASS), což není proveditelné u většiny reálných typů vzorku (biologický materiál, environmentální vzorky atd.). Aby se snížila vodivost vzorku oproti vodivosti elektrolytu, je třeba vzorek buď silně naředit, nebo z matrice vysolit či vyextrahovat analyt [20]. V Tab. 5. jsou přehledně shrnuty některé aspekty, podle kterých je třeba se orientovat při výběru on-line zakoncentrovací techniky [20, 21].

Tab. 5. Aspekty stackingu v základním uspořádání (bez použití obracečů EOF).

Druh stackingu	LVSS	FASS	tITP	Sweeping
<b>Matrice vzorku</b>	Nízká vodivost	Nízká vodivost	Vodivá	Stejná vodivost jako BGE
<b>Analyty</b>	Anionty	Kationty	Anionty/kationty	Neutrální/anionty/kationty
<b>Nástřik</b>	Delší zóna (až 75% kapiláry)	EK delší zóna/ HD max. 2% kapiláry	Delší zóna	Delší zóna



Obr. 15 Schéma LVSS.

### 2.2.2.2.1 Zakoncentrování z velkého objemu vzorku s obrácením polarit (large volume sample stacking with polarity switching LVSS)

Princip LVSS spočívá v nástřiku dlouhé zóny vzorku o nízké vodivosti (Obr. 15 A). Častěji se používá hydrodynamický způsob nástřiku, ale lze provést i elektrokineticky.

Dále je aplikováno napětí s opačnou polaritou než při vlastní separaci (anoda na inletu, katoda na outletu), což má za následek vytlačování nevodivé matrice vzorku z kapiláry. Analyty se koncentrují na hranici základního elektrolytu vlivem elektroosmotického toku a spolu s ním se pohybují směrem ke katodě (Obr. 15 B). Postupné vytlačování nevodivé matrice elektrolytem můžeme sledovat na proudovém záznamu jako postupný pokles proudu.

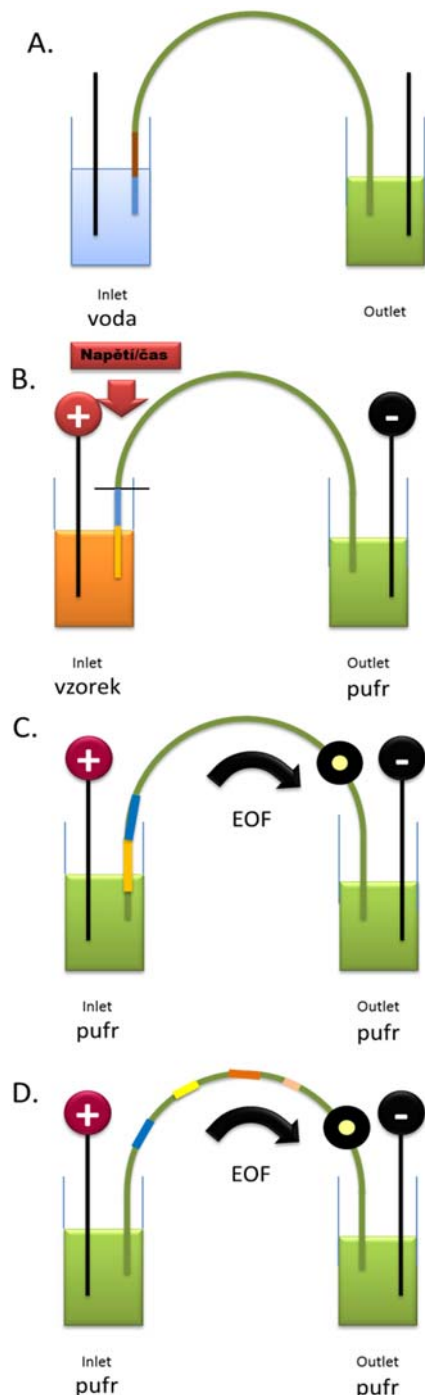
Polarita musí být přepnuta v momentě, kdy proud dosahuje přibližně 95% hodnoty, které by dosáhl, kdyby byla kapilára naplněna pouze elektrolytem. Úspěšné realizaci napomáhá sledování proudového záznamu, díky kterému odhadneme čas přepnutí polarit do kladného módu „klasické“ zónové kapilární elektroforézy (CZE), když jsou již analyty zakoncentrované a převážná část matrice vytlačena z kapiláry. Tento krok je třeba optimalizovat.

Dále separace probíhá v módu klasické kapilární elektroforézy (anoda na inletu/ katoda na outletu), jednotlivé zakoncentrované zóny analytů jsou separovány a unášeny směrem k detektoru (Obr. 15 C, D).

Za použití obracečů EOF lze zakoncentrovat anionty bez přepnutí polarit nebo kationty s přepnutím polarit. [20]

### 2.2.2.2.2 Zakoncentrování vzorku zesílením elektrického pole (field amplified sample stacking FASS)

Podstata FASS spočívá v nadávkování krátké zóny o nízké vodivosti, většinou vody případně i jiného rozpouštědla jako např. acetonitril, methanol, nebo jejich směsi s vodou (Obr. 16 A,



Obr. 16 Schéma FASS.

B.) do kapiláry naplněné pufrům. Poté následuje elektrokinetické (EK) dávkování vzorku o nízké vodivosti. Vzorek je možné dávkovat také hydrodynamicky (HD), ale u EK nástřiku je možno díky redukovanému elektroosmotickému toku očekávat menší vliv matrice na separaci a mnohem výraznější zvýšení citlivosti oproti HD. Krok nástřiku zóny vody / rozpouštědla je třeba optimalizovat (tlak a dobu nástřiku).

Vysoká intenzita elektrického pole v zóně vody / rozpouštědla urychluje migraci kationtů ze vzorku směrem k hranici mezi vodou a elektrolytem (Obr. 16 B). Analyty se koncentrují na pomezí zóny vody a elektrolytu. U elektrokinetického dávkování je třeba optimalizovat hodnotu napětí a dobu jeho působení.

K separaci zakoncentrovaných analytů dochází v momentě, kdy je inletová vialka se vzorkem nahrazena vialkou s elektrolytem a na elektrody je vloženo napětí (Obr. 16 C, D).

Přepnutím polarity během EK nástřiku lze provést souběžné dávkování jak aniontů, tak kationtů. [20]

#### 2.2.2.2.3 Přechodná izotachoforéza (tITP)

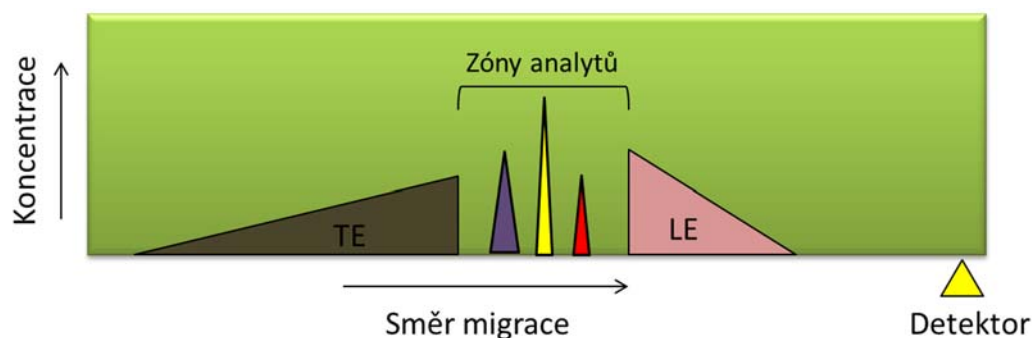
Předpokladem pro uskutečnění přechodné izotachoforézy je existence diskontinuálního elektrolytového systému, kdy jedna z komponent je schopna hrát roli vedoucího (LE) nebo koncového (TE) elektrolytu. V takovém systému analyty migrují v úzkých zónách v pořadí dle jejich mobilit, za přechodným LE nebo před přechodným TE. LE/TE může tvořit součást vzorku, základního elektrolytu (BGE) tzv. ko-iont nebo to může být látka samostatně nastříknuta před/za zónu vzorku. Aby látka mohla plnit roli LE/TE, je

třeba, aby byla v dostatečné koncentraci. Existují tři uspořádání tITP:

1. Složka BGE plní úlohu LE, látka s nízkou mobilitou plní roli přechodného TE.



2. Látka s vysokou mobilitou je přechodný LE, složka BGE je TE.
3. Vzorek obsahuje látku fungující jako přechodný LE i látku fungující jako přechodný TE (Obr. 17).

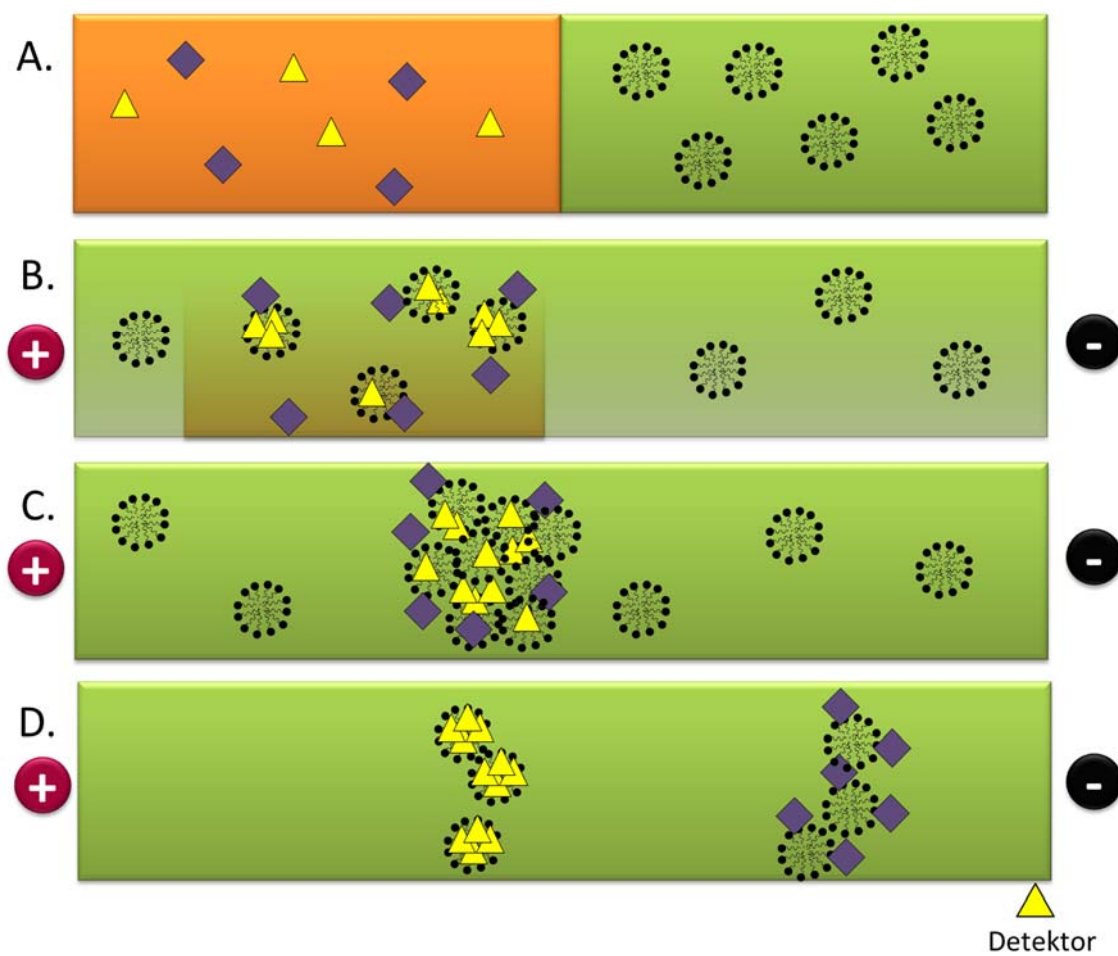


Obr. 17 Přechodná izotachforéza.

Cílem tITP je nalézt takové podmínky, které po nástřiku delší zóny vzorku umožní zakoncentrování analytů při udržení vysoké separační účinnosti a ostrosti zón analytů. [20]

#### 2.2.2.2.4 „Sweeping“

Metoda sweepingu využívá interakcí mezi analytem (může být kationt, aniont, neutrální látka) a micelami (kladně, záporně nabitě, neutrální), vzniklými v základním elektrolytu (BGE) z micelotvorných látek (tzv. tenzidů, surfaktantů) o koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace (CMC). Micely tvoří pseudostacionární fázi, na které se zachycují analyty dle svých rozdělovacích koeficientů, stejně jak tomu je v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC). Koncentrační krok spočívá v nástřiku delší zóny vzorku (neobsahuje micely) o stejné vodivosti jako je vodivost BGE (obsahuje micely) (Obr. 18 A). Zóna vzorku se vlivem elektromigrace smíchává s micelami (Obr. 18 B). Faktor zakoncentrování závisí na afinitě analytů k pseudostacionární fázi. Zakoncentrovávací krok končí v momentě, kdy jsou všechny analyty ze vzorku extrahovány v micelární zóně (Obr. 18 C). Dále separace pokračuje dle principu MEKC (Obr. 18 D). [20, 21]



Obr. 18 Děje v kapiláře při sweepingu neutrálních analytů záporně nabitými micelami.

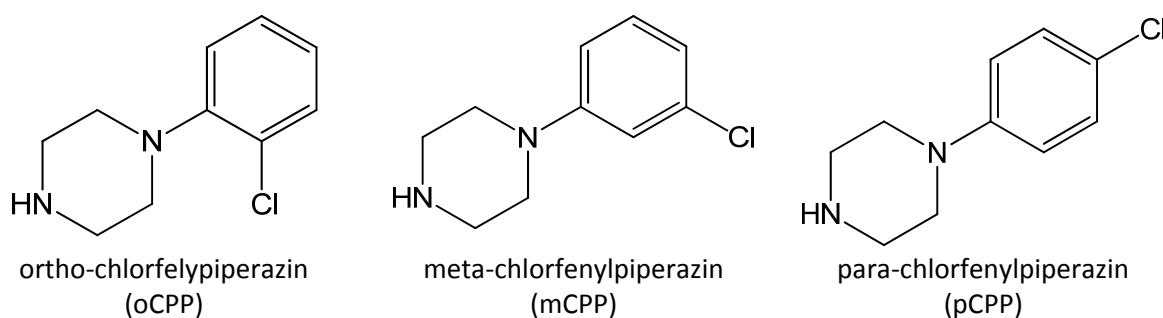
## 2.3 Charakteristika biologicky aktivních látek

### 2.3.1 Kriminálně významné analyty: chlorofenylpiperazinové deriváty

V poslední době narůstá počet případů zneužívání drog syntetického původu, tzv. „designer drugs“ - psychoaktivních látek, získaných chemickou syntézou, které byly vytvořeny obměnou struktury již existujícího farmaka nebo drogy. Nové struktury jsou „konstruovány“ tak, aby jejich účinky byly silnější než účinky originální látky a hlavně aby se tímto krokem obešly právní normy vztahující se ke zneužívání známých, zákonem zakázaných drog.

1-(chlorfenyl)piperazinové deriváty jsou relativně novou skupinou designových drog odvozených od piperazinu [22]. Podle pozice atomu chloru na benzenovém jádru můžeme odvodit 3 polohové izomery: *orto*, *meta* a *para* (Obr. 19). Jak plyne ze studií prováděných na látkách podobné struktury, pro reakci s cílovým receptorem je důležitá konformace celé molekuly, která je dána substitucí. Tedy od každého z izomerů se dají očekávat rozdílné vlastnosti vzhledem k rozdílné schopnosti vazby na receptor [23].

Z trojice izomerů jsou nejlépe prostudovány účinky 1-(3-chlorofenyl)piperazinu (mCPP) používaného v psychiatrii jako modelové látky pro výzkum serotonergních funkcí v lidském mozku či známého jako aktivní metabolit antidepressiva trazodonu [24] (v ČR registrován pod názvem Trittico®).



Obr. 19 Struktura chlorofenylpiperazinů.

V současnosti je mCPP zneužíván jako psychoaktivní látka [25], která se na drogovém trhu prodává a kupuje většinou jako pilulka extáze (MDMA, 3,4-metylendioxymetamfetamin) [26]. Kromě mCPP, takto zakoupené tablety mohou obsahovat i jiné stimulační látky (amfetaminy, jiné piperaziny, kokain, kofein atd.). Dle policejních hlášení některé zabavené tablety obsahovaly i pCPP [26-28]. Žádoucí účinky mCPP jsou uživateli popisovány jako podobné účinkům extáze - stimulační, halucinogenní, vyvolávající pocity empatie [29]. Ačkoliv na rozdíl od extáze, mCPP není neurotoxický [30], po požití u uživatelů pravidelně vyvolává nepříjemné nežádoucí účinky: nevolnost, úzkosti, bolesti hlavy, zvracení, těžké halucinace [28]. Požití více tablet a překročení fyziologických dávek mCPP může vyústit až v serotoninový syndrom [29]. Ze strany uživatelů je mCPP v současnosti spíše nežádoucí

příměsí v jejich tabletách extáze [29]. V závislosti na přítomnosti jiných látek se běžné množství mCPP v tabletě pohybuje v rozmezí mezi 1 a 80 mg [26, 29].

### Metody stanovení 1-chlorofenylpiperazinů

Analytické postupy ve forenzní toxikologii se zpravidla skládají z rychlé screeningové metody (imunologické, chromatografické metody) na niž navazují metody potvrzující identitu dané zakázané látky (metody spojené se spektrometrickou detekcí, případně NMR) [22].

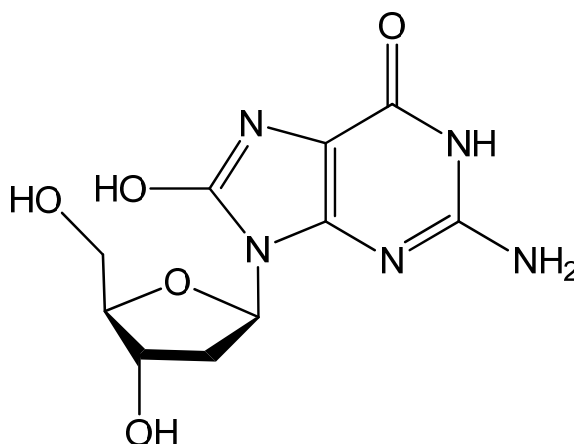
Separace a identifikace třech izomerů 1-chlorofenylpiperazinu v tabletách zabavených policií, bylo dosaženo metodou HPLC-DAD [31] a CE-MS-MS [32]. Další publikace týkající se 1-chlorofenylpiperazinů se věnují pouze mCPP. Zatímco ve starších publikacích je mCPP stanovován v rámci výzkumu serotonergních účinků či jako aktivní metabolit léčiv, současné publikace se zabývají stanovením mCPP jako zneužívané látky. V Tab. 6. jsou přehledně uvedeny metody použité ke stanovení *meta*-chlorofenylpiperazinu v různých matricích.

Tab. 6. Metody stanovení mCPP v různých matricích.

Matrice	Další analyty	Metoda – detekce	Ref.
<b>Plazma a mozková tkáň (výzkum na myších)</b>	mCPP, trazodon	GLC-NPD	[33]
	mCPP, trazodon	HPLC-ECD	[34]
	mCPP, trazodon	HPLC-UV	[35]
	mCPP	GC-MS	[36]
<b>Lidská plazma</b>	mCPP	HPLC-UV	[37]
	mCPP, trazodon	HPLC-UV	[38]
	mCPP, trazodon	HPLC-UV	[39]
	mCPP, etoperidon, 5-(1-hydroxyetyl)etoperidon	HLPC-UV	[40]
<b>Lidská plazma, červené krvinky</b>	mCPP, nefazodon, p-hydroxynefazodon, hydroxynefazodon	HLPC-UV	[41]
	mCPP, trazodon	LC-MS	[42]
<b>Lidská plazma, mléko</b>	mCPP, nefazodon, hydroxynefazodon, trazodon	HPLC-UV	[44]
<b>Screeningové metody designových drog v tělních tekutinách</b>	Sérum: 31 designových drog (amfetaminy, fenyletylaminy, triptaminy, piperaziny), kathinon, metkathinon, fencyklidin, ketamin	LC-MS	[45]
	Moč: 10 designových drog (MDMA, fenyletylaminy, triptaminy)	LC-MS	[46]
	Plazma: 12 designových drog (amfetaminy, pipetaziny)	GC-MS	[47]
	Moč: mCPP, 3-fluorometylfenylpiperazin, benzylpiperazin, MDMA	GC-MS	[48]
<b>Vlasy</b>	mCPP, 3-fluorometylfenylpiperazin, benzylpiperazin	GC-MS	[49]
<b>Konfiskovaný materiál</b>	Mnoho látek	DAPPI-MS	[50]

### 2.3.2 Klinicky významné biomarkery: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin

Molekula 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (Obr. 20) je produktem oxidačního poškození DNA a její tvorba je spojována s řadou civilizačních chorob, především rakovinou [51]. Od chvíle, kdy byla v roce 1984 objevena [52], je rozsáhle zkoumána pro svoji mutagenitu, přítomnost v genech spojených s rakovinným bujením, vliv na stárnutí a molekulární epidemiologii lidských chorob [51-56].



Obr. 20 Struktura 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8OHdG).

Jako nukleová báze s nejnižšímu oxidačním potenciálem je guanin ze všech nukleových bází nejčastěji oxidačně poškozen (především v poloze C-8 guaninu) [53]. Poškozená DNA je enzymaticky opravena a vzniklý 8OHdG je bez další metabolizace vyloučen z organismu močí [54]. V případě, že poškozená DNA není před replikací včas opravena, 8OHdG působí mutageně [55]. Oxidačním poškozením DNA vznikají i jiné produkty, ale 8OHdG díky vyšší četnosti vzniku a dobré stanovitelnosti slouží jako významný biomarker a prostřednictvím jeho kvantifikace je možné neinvazivně sledovat míru poškození DNA v organismu [51, 56].

V moči zdravých jedinců, nekuřáků, byly experimentálně zjištěny koncentrace 8OHdG v jednotkách až desítkách nanomolů na litr. U kuřáků byly naměřeny koncentrace přibližně o 50% vyšší než u nekuřáků [57, 58]. Vysoké hladiny byly zjištěny u pacientů s onkologickým onemocněním, zvláště vysoké pak u pacientů po chemoterapii či radioterapii [59, 60].

#### Metody stanovení 8OHdG

V posledním desetiletí byly vyvinuty separační a imunologické [61] metody pro stanovení 8OHdG. Ze separačních metod podstatnou část tvoří kapilární elektroforéza (Tab. 7.) a kapalinová chromatografie (Tab. 8.), dále pak plynová chromatografie [62] i průtokové metody [63, 64].

Tab. 7. Přehled publikací pro stanovení 8OHdG v lidské moči kapilární elektroforézou.

Metoda – detekce	BGE	Úprava vzorku	Stacking	LOD	Ref.
CE – ECD	20 mM borát pH 9,0; 20% MeOH	SPE C18 (500 mg/6 mL)	-	50 nM	[65]
CE – UV	300 mM SDS, 10 mM fosfát, 6 mM borát pH 8,1	SPE C18OH (500 mg/6 mL)	-	1400 nM	[66]
CE – AD	30 mM borát pH 9,12	SPE C18OH (500 mg/6 mL)	pH dynamic junction	20 nM	[67]
CE – UV	10 mM borát pH 9,0	-	-	850 nM	[59]
CE – AD	30 mM borát pH 9,1	SPE C18OH (500 mg/6 mL)	pH dynamic junction	4,3 nM	[58]
CE – AD	30 mM borát pH 9,1	SPE C18OH (500 mg/6 mL)	pH dynamic junction	4,3 nM	[68]
CE – UV	80 mM CHES pH 8,6 (LiOH); 0,1 mM CTAB	-	-	4,2 nM	[60]
CE – ECD	30 mM borát pH 9,12	SPE C18OH (500 mg/6 mL)	pH dynamic junction	20 nM	[69]
CE – ECD	20 mM borát pH 9,4	MIP, SPME	-	2,6 nM	[70]
CE – AD	40 mM borát pH 9,23	SPE, cation Exchange	-	670 nM	[71]

Tab. 8. Přehled publikací pro stanovení 8OHdG v biologickém materiálu chromatografickými metodami.

Metoda – detekce	Matrice	Úprava vzorku	LOD	Ref.
LC – MS	Moč	-	0,49 nM	[72]
LC – MS	Moč	SPE HLB 3cc	0,2 nM	[73]
LC – MS	Plazma	SPE On-line	0,03 nM	[74]
HPLC – MS	Moč	SPE MCX 96-well	350 nM (LOQ)	[75]
LC – MS	Moč	SPE HLB 3cc	3,5 nM (LOQ)	[76]
HPLC – MS	Moč	SPE MCX 1cc	350 nM (LOQ)	[77]
HPLC – ECD	Moč	SPE MAX	17 nM	[78]
LC – MS	Moč	-	8,8 nM (LOQ)	[79]
HPLC – ECD	Moč	-	25 nM	[80]
HPLC – MS	Moč	SPE ENV+ 500 mg/1 mL	0,7 nM	[81]
LC – MS	Moč	SPE C18 1cc	0,08 nM	[82]
LC – MS	Moč	-	3,5 nM	[83]
HPLC – ECD	Moč	SPE C18OH 500 mg/2,8 mL	3,5 nM	[84]

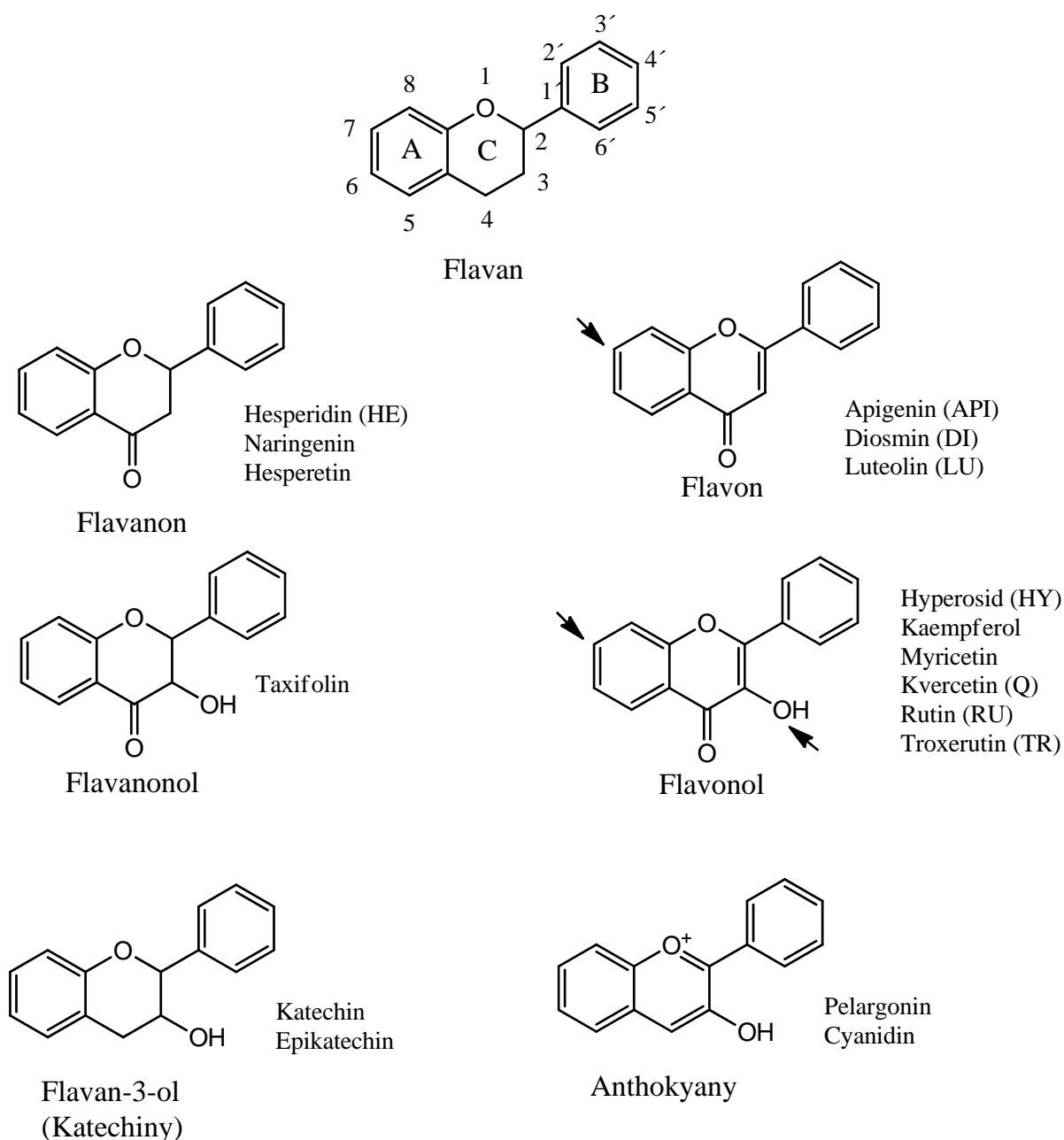
## 2.3.3 Farmaceuticky významné látky: flavonoidy, fenolkarboxylové kyseliny a jiné antioxidanty

### 2.3.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky vznikající v rostlinách syntézou ze dvou aromatických aminokyselin (fenylalaninu a tyrosinu) a z malonátu. Jsou to sekundární metabolity sloužící jako ochrana proti slunečnímu záření nebo proti patogenům [85]. Kromě ovoce a zeleniny se nachází v semech, ořechách, koření, léčivých rostlinách, olivovém oleji a nápojích jako je víno (zvláště červené), pivo (nižší koncentrace) a čaj [86]. Z živočišných materiálů se nacházejí flavonoidy například v propolisu [87].

Jde o rozmanité sloučeniny, jejichž základní struktura je odvozena od flavanové kostry, skládající se z 15 uhlíkových atomů uspořádaných do tří kruhů (A, B, C). Dle typu heterocyklu mohou být rozděleny do 6 skupin: flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, flavanoly a antokyany (Obr. 21). Zatímco různé skupiny flavonoidů se liší stupněm oxidace a substitucí na kruhu C, jednotlivé sloučeniny v rámci skupiny se liší substitucí na kruzích A a B [86]. Nejčastější místa glykosylace jsou u flavonů: hydroxyl v pozici 7 a u flavonolů hydroxyly v pozici 3 a 7; běžné glykosidy obvykle obsahují molekuly glukózy, galaktózy, rutinózy či rhamnózy [88].

Flavonoidy jsou známé širokým spektrem biologických účinků: protirakovinnými, antivirovými, antimikrobními [89], protizánětlivými, chrání před kardiovaskulárními chorobami atd. [90, 91]. Ačkoliv přesné mechanismy účinků nejsou detailně prozkoumány, je známo, že důležitou roli v nich hraje antioxidační aktivita [90, 92]. Antioxidační kapacita jednotlivých flavonoidů je úzce spjatá s jejich strukturou a spočívá ve vysoké reaktivitě s různými druhy radikálů (hydroxylové, kyslíkové, peroxidové) a stabilitě molekuly po reakci s radikálem [90].



Obr. 21 Základní strukturní kostry flavonoidů [86].

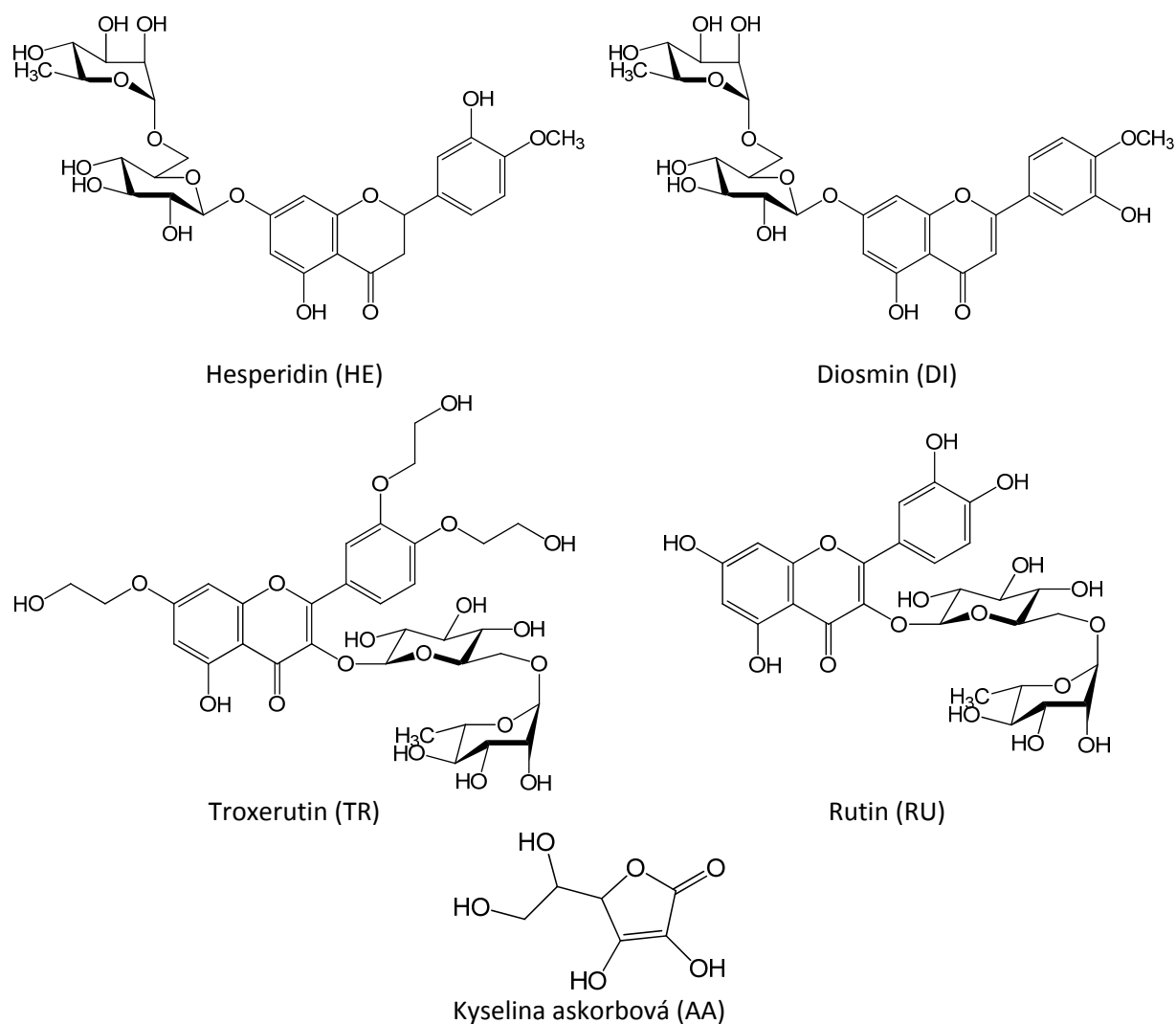
### 2.3.3.1.1 Citrusové flavonoidy, troxerutin a kyselina askorbová

Citrusové flavonoidy jsou důležité sloučeniny bohatě se vyskytující v citrusových plodech (rod routovitých). Nejvyšší obsah citrusových flavonoidů se nachází ve slupce a semenech, které se běžně nekonzumují [93]. Z těchto levných vedlejších produktů se citrusové flavonoidy dají snadno získat [94]. Nejvýznamnějšími zástupci jsou rutin, hesperidin a jeho derivát diosmin (Obr. 22). Citrusové flavonoidy jsou známy především svým pozitivním účinkům na krevní oběh, zabraňují vzniku aterosklerózy, mají vliv na křehkost žilních kapilár a agregaci krevních destiček [92, 93, 95]. Z epidemiologických studií vyplývá, že pravidelný přísun citrusových flavonoidů je spojený se sníženým rizikem vzniku kardiovaskulárních chorob [92].



Ve farmaceutických přípravcích se v kombinaci s citrusovými flavonoidy často vyskytuje kyselina askorbová (vitamin C) či jiné antioxidanty ( tokoferol, karotenoidy). Byl zkoumán vliv součinnosti kyseliny askorbové a flavonoidů na celkový antioxidační efekt. Dle výsledků jsou důležitější interakce směsi jako celku než interakce jednotlivých flavonoidů s kyselinou askorbovou. [96, 97]

V Tab. 9. jsou uvedeny příklady metod pro stanovení citrusových flavonoidů a kyseliny askorbové v různých matricích.

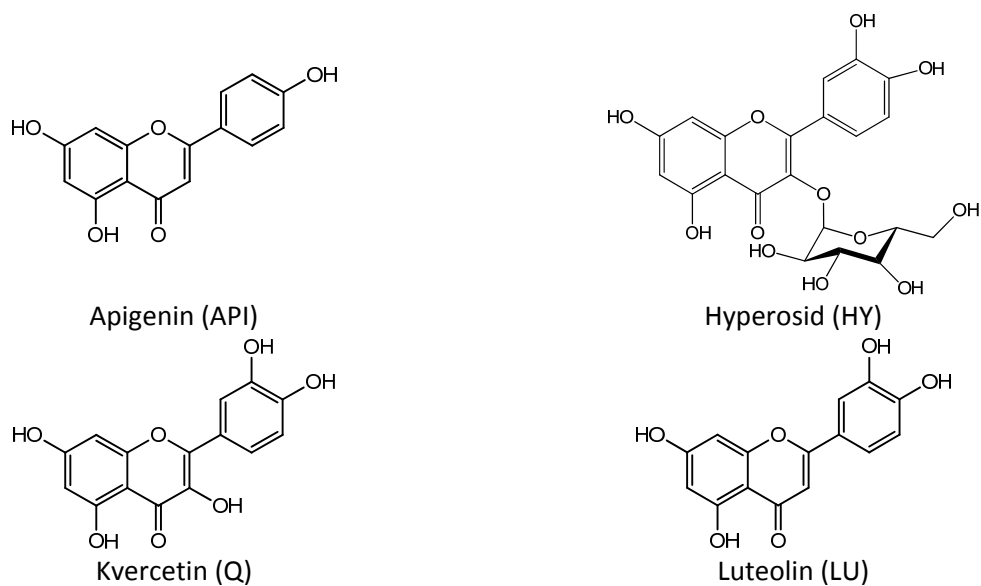


Obr. 22 Struktura citrusových flavonoidů, troxerutinu a kyseliny askorbové.

Tab. 9. Příklady metod pro stanovení citrusový flavonoidů a AA v různých matricích.

Matrice	Analyty	Metoda-detekce	Ref.
Citrusové plody	HE, neohesperidin, synefrin, tyranin, naringin, chlorogenová, ferulová, kávová, p-kumarová kyselina	HPLC-DAD-MS	[98]
Citrusové slupky (pomeranč, mandarinka, citron)	HE, DI, neohesperidin, isorhofolin, nobiletin, tangeritin, hesperetin	HPLC-MS	[99]
Plazma	TR	LC-MS	[100]
Moč	HE, RU, katechin, epikatechin, neohesperidin, kvercitrin, hesperetin	UHPLC-UV	[101]
Farmaceutické preparáty, listy rostliny <i>Barosma betulina</i> (Egypt)	DI, HE	HPLC-UV	[102]
Myší moč, kuřecí plazma	TR, LU, Q, RU, kaempferol, puerarin, morin	HPLC-UV	[103]
Pomerančový plod (různé oblasti Číny)	HE, naringin, naringenin	CE-ECD	[104]
Grepfruitová slupka, šťáva	HE, RU, AA, naringin, hesperidin, naringenin)	CE-ECD	[105]
Oplodí ( <i>citrus reticulata</i> )	HE, synephrin	CE-ECD	[106]
Brazilská vína	RU, Q, resveratrol, katechin, kaempferol, myricetin, syringová, kumarová, kávová, galová kyselina	CE-UV	[107]
Tradiční čínská medicína Zhike Zhishi	HE, naringin	MEKC-UV	[108]
Lidské slzy	AA, kyselina močová, malondialdehyd	CE-UV	[109]
Moč	AA, katechin, epikatechin	CE-UV	[110]

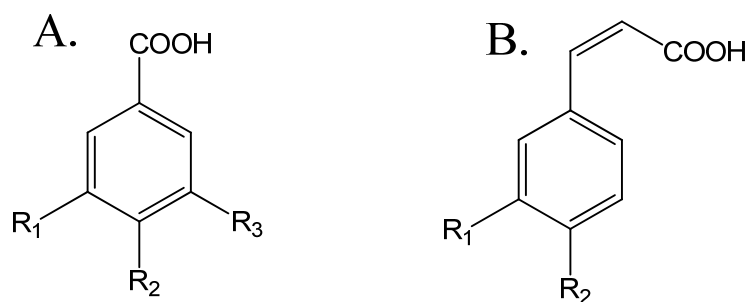
### 2.3.3.1.2 Ostatní flavonoidy



Obr. 23 Struktury významných flavonoidů.

### 2.3.3.2 Fenolické kyseliny

Dle struktury můžeme rozdělit fenolické kyseliny do dvou skupin: deriváty kyseliny benzoové (A) a deriváty kyseliny skořicové (B) (Obr. 24) [85]. Jejich antioxidační aktivita se odvíjí od počtu hydroxylových skupin v molekule [111].

**Hydroxybenzoové kyseliny:**

Kyselina galová

Kyselina syringová

**Hydroxyskořicové kyseliny:**

Kyselina o-/ m-/ p- kumarová (p-KU)

Kyselina kávová

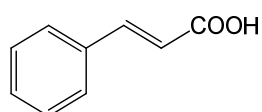
Kyselina ferulová

Kyselina skořicová (SK)

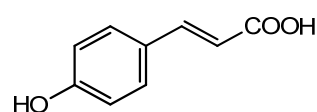
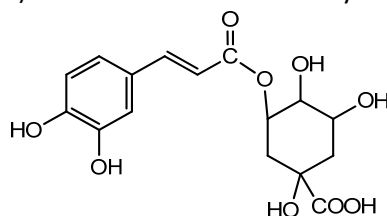
Obr. 24 Základní struktury fenolických kyselin.

Obsah hydroxybenzoových kyselin v rostlinách je nevýznamný s výjimkou čaje (kyselina galová), ředkve seté a červených plodů. Vyskytují se volně nebo estericky vázané v komplexu s taniny. [85]

Hydroxyskořicové kyseliny jsou výskytem častější. V rostlinách se téměř vůbec nenacházejí volně, ale vázané esterovou vazbou na kyselinou chinovou nebo šikimovou [85]. Vznikají z L-fenylalaninu a L-tyrozinu, fenolické hydroxylové skupiny nejsou glykosylovány [111]. Kyselina kávová a chinová vytváří kyselinu chlorogenovou (vysoký obsah v kávě) (Obr. 25) [85]. Nejvyšší obsah hydroxyskořicových kyselin byl zjištěn v ovoci jako například v borůvkách, třešních, jablkách, švestkách [85].



Kyselina skořicová (SK)

Kyselina *para*-kumarová (p-KU)

Kyselina chlorogenová (CHLG)

Obr. 25 Struktury fenolických kyselin odvozených od kyseliny hydroxyskořicové.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 Základní přístrojové vybavení

##### **Kapilárně elektroforetické systémy**

Beckman Coulter P/ACE™ MDQ (Fullerton, CA, USA) vybavený spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem (DAD) a softwarem 32Karat™ verze 5.0.

Beckman Coulter Proteomelab™ PA 800 (Fullerton, CA, USA) spojený se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem (DAD) a softwarem 32Karat™ verze 7.0.

Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), vybavený DAD detektorem a softwarem ChemStation verze B04.03.

##### **pH metry**

PHM 220 (Radiometer, Dánsko) s PHC2401-8 kombinovanou skleněnou elektrodou a kalibračními pufrů o pH 4,00 a 10,00 (WTW, Weilheim, Německo).

DIGIMED pHmetro DM20 (São Paulo, Brazílie). Používány originální skleněné elektrody a kalibrační pufrů o pH 4,1 a 6,86.

##### **Analytické váhy**

Analytické váhy Sartorius 2004 MP (Německo).

Analytické váhy Mettler-Toledo AB 204 (Švýcarsko).

#### 3.1.2 Základní chemikálie

##### **Složky pufrů**

Pro experimentální část 2, 3, 4: acetonitril (ACN),  $\alpha$ -cyklodextrin hydrát ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -cyklodextrin hydrát ( $\beta$ -CD), dimetylsulfoxid (DMSO), dodecylsulfát sodný (SDS), ethanol (EtOH), ethylacetát, kyselina boritá, deoxycholová, fosforečná 85% a cholová, methanol (MeOH), tetraboritan sodný dekahydrát a Tris zakoupeny od Sigmaly Aldrich (St. Luis, MO, USA). Methylparaben a propylparaben zakoupeny od firmy RNDr. Jan Kulich (Hradec Králové, Česká Republika). Propan-2-ol (IPA), hydroxid amonný 26%, kyselina chlorovodíková 35% od Penty a.s. (Česká Republika). Butan-1-ol od Lachemy a.s. (Česká Republika). Hydroxid sodný (NaOH) od firmy MERCK (Darmstadt, Německo). *N*-(2-hydroxyethyl)piperazin-2'-(2-

ethansulfonová kyselina) (HEPES), kyselina mravenčí 98% a ledová kyselina octová od firmy Fluka (Německo). Wolframian sodný dihydrát od Riedel-de-Haën (Seelze, Německo).

### Voda

Na přípravu všech roztoků byla použita ultra-čistá voda z Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA).

## 3.2 Test vhodnosti systému (system suitability testing-SST)

SST tvoří součást optimalizace analytické metody. Slouží k ověření vhodnosti systému jako celku. Provádí se na roztocích standartních látek o koncentracích blízkým koncentracím očekávaných ve vzorku. V jednotlivých pracích byly parametry SST vypočítány z naměřených dat softwaru CE systémů. Opakovatelnost byla vyhodnocena statistickými funkcemi Microsoft Excel. Mezi SST parametry patří:

### Počet teoretických pater vyjadřuje účinnost metody (N)

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (7)$$

Kde „ $t_R$ “ je migrační čas (nebo vzdálenost mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku), „ $w_h$ “ je šířka píku v polovině výšky. Čím je pík vyšší a užší, tím vyšší je účinnost separace a vyšší počet teoretických pater. [112]

### Faktor symetrie píku ( $A_s$ )

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (8)$$

„ $w_{0,05}$ “ je šířka píku v jedné dvacetině výšky a „ $d$ “ je vzdálenost od kolmice vedené z vrcholu píku k vzestupné části píku v jedné dvacetině jeho výšky. Ideální pík má faktor asymetrie 1,0. Dle USP jsou přijatelné i asymetrické píky za podmínky, že jsou reprodukovatelné. [112, 113]

### Rozlišení ( $R_s$ )

$$R_s = \frac{1,18 (t_{R1} - t_{R2})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (9)$$

„ $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ “ jsou migrační časy (nebo vzdálenosti mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholů píků), kdy platí že  $t_{R1} < t_{R2}$  a „ $w_{h1}$ ,  $w_{h2}$ “ jsou šířky píků v polovině jejich výšky. [112]

Rozlišením se určuje, jak moc jsou od sebe píky odděleny. Nízké rozlišení značí špatné rozseparování píků.

### Opakovatelnost nástřiku (RSD)

Hodnotí se relativní směrodatné odchyly (RSD, %) průměrů hodnot migračních časů, ploch píků, korigovaných ploch analytů jejich migračním časem nebo korigovaných ploch analytu ku korigovaným plochám vnitřního standartu. Pro vyhodnocení opakovatelnosti se používá výsledků šesti po sobě jdoucích nástřiků vzorku o stejné koncentraci nebo ve speciálních případech třech nástřiků o třech různých koncentracích vzorku [114]. Pokud je metoda opakovatelná, RSD by mělo být pod 5%.

Běžné statistické operace:

**Průměr ( $\bar{x}$ ):**

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{n=1}^n x_i \quad (10)$$

**Směrodatná odchylnka (s):**

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{n=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{(n-1)} \quad (11)$$

**Relativní směrodatná odchylnka ( $s_R$ , RSD):**

$$s_R = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (12)$$

Pro rovnice (10-12) platí: „n“ je počet měření, „ $x_i$ “ je hodnota jednoho měření.

### 3.3 Validace metody

Validace analytické metody je posledním krokem při vývoji a jejím cílem je ověřit vhodnost pro dané použití. Při validaci metody se může analytik řídit ICH normami [115] (International Conference on Harmonization of Technological Requirements for registration of Pharmaceutical for Human Use), americkými směrnici Úřadu pro léky a potraviny FDA [114] (Food and Drug Administration), či platnými lékopisy: český (ČL 2009) [112], evropský (Ph.Eur.) či americkým USP [113]. Stanovují se obvykle následující parametry:

#### Selektivita

Selektivita určuje schopnost metody jednoznačně rozpoznat konkrétní analyt v přítomnosti ostatních očekávaných složek vzorku (nečistoty, rozkladné produkty, složky matrice, metabolity atd.) [115]. Testuje se analýzou dané látky v přítomnosti předpokládaných látek (nečistot, pomocných látek atd.), analýzou blanku (v případě biologického materiálu, třeba minimálně blank ze šesti zdrojů) [114] nebo porovnáním s paralelní ověřenou metodou.

#### Linearita

Linearita určuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu, tedy schopnost získat výsledky, které jsou přímoúměrné koncentraci analytu ve vzorku [115]. Kalibrační přímka by

měla být připravena ve stejné matrici jako vzorky naspikování známou koncentrací analytu. [114]

Obvykle se měří 5-7 koncentrací v rozsahu, pro který je metoda určena. Lineární závislost popisuje rovnice přímky **(13)** a korelační koeficient ( $r$ ).

$$y = kx + q \quad (13)$$

„ $x$ “ je koncentrace analytu, „ $y$ “ je poměr korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu, „ $k$ “ je směrnice a „ $q$ “ je absolutní člen rovnice přímky.

### Rozsah

Rozsah je rozmezí koncentrací, ve které by metoda měla být správná, přesná a lineární. [115]

### Limity

**Limit detekce (LOD)** je nejnižší koncentrace analytu, která může být danou metodou rozpoznána od šumu pozadí [114] či jako nejnižší koncentrace, která může být detekována (a nemusí být kvantifikována) [115].

**Limit kvantifikace (LOQ)** určuje nejnižší možnou koncentraci, kterou jsme schopni detekovat a kvantifikovat s náležitou správností s přesností [114].

Limity lze stanovit na základě poměru signálu k šumu ( $S/N$ ) vztahem (14):

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} \quad (14)$$

Kde „ $H$ “ je výška píku analytu a „ $h$ “ je hodnota šumu nejlépe v oblastech, kde se pík nachází. Limit detekce odpovídá případu, kdy  $S/N = 3$ ; pro limit kvantifikace platí  $S/N = 10$ . Dále lze hodnoty LOD a LOQ určit vizuálně z elektroferogramu nebo se mohou vypočítat z rovnice kalibrační přímky.

### Přesnost

Přesnost vyjadřuje shodu naměřených výsledků za předepsaných podmínek. Vyjadřuje se v procentech jako relativní směrodatná odchylka (RSD), **(10-12)**. Pro výpočet byly používány poměry korigovaných ploch analytů a vnitřního standardu. Dle ICH se rozděluje na:

*Opakovatelnost*- přesnost v rámci jedné série analýz vzorků připravených stejným postupem vykonaných jedním pracovníkem ve stejné laboratoři v krátkém časovém úseku. Hodnotí se na třech koncentračních hladinách třemi nástřiky nebo šesti nástřiky jedné koncentrační hladiny.

*Intermediární přesnost*- přesnost mezi různými sériemi měření vykonaných při změně faktorů (analytik, přístroj, jiný den).



*Reprodukovatelnost*- porovnání výsledků z dvou různých laboratoří.

### Správnost

Správnost vyjadřuje míru shody mezi nalezenou hodnotou a hodnotou považovanou za referenční [115]. Je vyjádřena hodnotou výtěžnosti (recovery, %) a relativní směrodatnou odchylkou (RSD, %) **(10-12)**. Použitá metoda standardního přidavku spočívá v přidavku roztoku standardu o třech různých koncentracích k matici vzorku o známé koncentraci analytu. Porovnání koncentrace standardu ve vzorku v poměru ke skutečné koncentraci standardu se recovery vypočítá podle vztahu **(15)**:

$$\text{Recovery} = \frac{C_{\text{vzorek+standard}} - C_{\text{vzorek}}}{C_{\text{standard}}} \cdot 100 \quad (15)$$

Pro výpočet byly použity poměry korigovaných ploch analytů a vnitřního standardu.

### Robustnost

Robustnost metody vyjadřuje míru ovlivnění získaných výsledků malými změnami kritických parametrů [115].

Tab. 10. Validační parametry a jejich limity.

Validační parametry	Vyjádření	Limity
Selektivita	Demonstrace na elektroferogramech	Žádné interference
Linearita	Rovnice přímky / korelační koeficient (r)	-/ r ≥ 0,9990
LOD	[g/mL]	-
LOQ	[g/mL]	-
Přesnost	% RSD	RSD < 5%
Správnost	% recovery / % RSD	100% ± 5% / RSD < 5%

## 3.4 Parametry CE metody:

- Kapilára:
  - rozměry kapiláry (celková délka, délka k detektoru, vnitřní/vnější průměr,
  - materiál, ze kterého je kapilára vyrobena,
  - vnitřní potah (pokud existuje);
- Ostatní parametry:
  - kondicionace kapiláry: před prvním použitím, před prvním použitím během dne, mezi analýzami,
  - separační pufr: složení, koncentrace, postup přípravy,
  - nástřik: způsob nástřiku (HD/ EK), parametry (čas, tlak/napětí),
  - detekce: detektor, parametry detekce,
  - migrační časy, celkový čas analýzy,

- model CE systému, software,
- napětí,
- proud,
- polarita.

## 3.5 Experimentální část 1: Separace a stanovení izomerů chlorfenylpiperazinu v konfiskovaných tabletách metodou kapilární elektroforézy

Rukopis pod názvem: SEPARATION AND DETERMINATION OF CHLOROPHENYLPIPERAZINE ISOMERS IN CONFISCATED PILLS BY CAPILARY ELECTROPHORESIS je v současné době v recenzním řízení v časopisu *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

### 3.5.1 Cíl

Cílem této práce bylo vyvinout kapilárně elektroforetickou metodu se spektrofotometrickou detekcí pro separaci a stanovení izomerů ortho-, meta- a para-chlorfenylpiperazinu (CPP) v tabletách zabavených policií státu São Paulo (Brazílie), tuto metodu optimalizovat, validovat a aplikovat při analýze vzorků zabavených tablet.

### 3.5.2 Materiál a metody

#### Instrumentace

Práce byla vykonána v laboratoři elektromigračních metod v Chemickém Institutu Univerzity v São Paulo (Instituto de Química, Universidade de São Paulo) na elektroforetickém systému Beckman Coulter Proteomelab PA 800 (Fullerton, CA, USA) vybaveném detektorem s diodovým polem a softwarem 32Karat (verze 7.0). pH bylo měřeno na DIGIMED pHmetro DM20 (São Paulo, SP, Brazílie) s originální skleněnou elektrodou, která byla kalibrována pufrů o pH 4,10 a 6,86. Separace byly prováděny ve vnitřně nepokrytých křemenných kapilárách o celkové délce 60 cm (efektivní délce 50 cm) s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ . Byly zakoupeny od firmy ISB (Bom Princípio, RS, Brazílie).

#### Elektroforetické postupy

Před prvním použitím byla nová kapilára kondicionována 1 M roztokem hydroxidu sodného po dobu 30 minut při tlaku 1500 mbar s následným třicetiminutovým promytím ultra čistou vodou. Denní údržba kapiláry spočívala v postupném promytí 1 M hydroxidem sodným a vodou po dobu 10 minut při tlaku 1500 mbar před první analýzou a po poslední analýze dne. Mezi jednotlivými analýzami byly kapilára propláchnována 3 minuty separačním pufrům.

Nástřik vzorků probíhal hydrodynamicky tlakem 50 mbar po 8 s.

#### Chemikálie

1-(3-chlorfenyl)piperazin (mCPP), 1-(2-chlorfenyl)piperazin (oCPP) a 1-(4-chlorfenyl)piperazin (pCPP) byly zakoupeny u firmy Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Standardy amfetaminu,

metamfetaminu, 3,4-methylendioxyamfetaminu (MDA), 3,4-methylendioxyamfetaminu (MDMA), 1-(3-trifluormethylfenyl)piperazinu (TFmPP), 3,4-methylendioxy-N-ethylamfetaminu (MDEA) a kokainu byly zapůjčeny jako roztoky o objemu 1 mL a koncentraci 1 mg/mL od policie státu São Paulo. Prokain a lidokain byly získány od firmy Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA).

Acetonitril, kyselina fosforečná 85%, methanol, propan-2-ol, triethylamin (TEA) byly zakoupeny od firmy Tedia (Fairfield, USA); 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin (HP- $\beta$ -CD) od firmy Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA);  $\alpha$ -cyklodextrin ( $\alpha$ -CD) a methyl- $\beta$ -cyklodextrin (M- $\beta$ -CD) od firmy Fluka (Buchs, Německo). Od firmy Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) byly zakoupeny  $\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD),  $\gamma$ -cyklodextrin ( $\gamma$ -CD) a dimethyl- $\beta$ -cyklodextrin (DM- $\beta$ -CD).

### **Příprava roztoků standardů, pufrů a vzorku**

Zásobní roztoky analytů a vnitřního standardu (IS, prokain) o koncentraci 1 mg/mL byly připraveny rozpuštěním navážek příslušných substancí v ultračisté vodě. Koncentrace IS byla vždy 0,1 mg/mL.

Kalibrační roztoky byly získány ředěním zásobních roztoků příslušných standardů chlorfenylpiperazinů, přidáním roztoku vnitřního standardu a doplněním vodou po rysku.

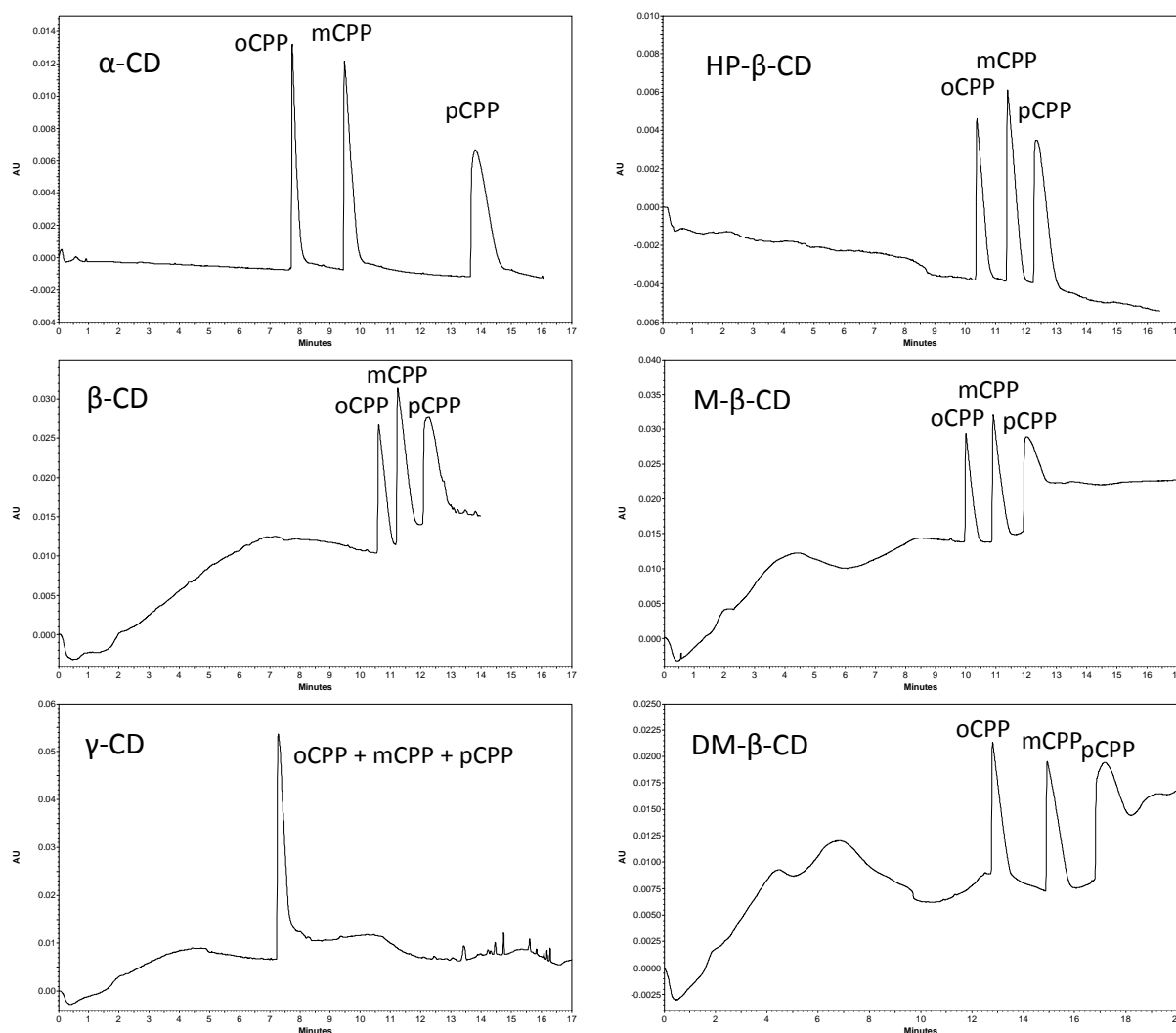
Základní elektrolyt byl připraven zředěním určitého objemu 85% kyseliny fosforečné ve vodě, dále bylo upraveno pH triethylaminem (TEA) na danou hodnotu a potřebný objem doplněn vodou po rysku. Poté bylo naváženo potřebné množství cyklodextrinu, které bylo rozpuštěno v elektrolytu.

Vzorky sedmnácti tablet (10 tablet jedné „šarže“ a 7 tablet různých „šarží“) zabavených policií státu São Paulo byly postupně zváženy a zhomogenizovány. 2,5 mg vzorku bylo rozpuštěno v 10 mL methanolu a extrahováno na ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Po dekantaci byly methanolicke roztoky dále naředěny vodou v závislosti na koncentraci obsahových látek a přidán roztok IS.

## **3.5.3 Výsledky a diskuze:**

### **3.5.3.1 Optimalizace**

Izomery CPP jsou molekuly stejné hmotnosti a náboji. Vhodným řešením pro jejich CZE separaci je použití vhodného selektoru. Byl testován vliv šesti cyklodextrinů:  $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, M- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD a DM- $\beta$ -CD (Obr. 26).

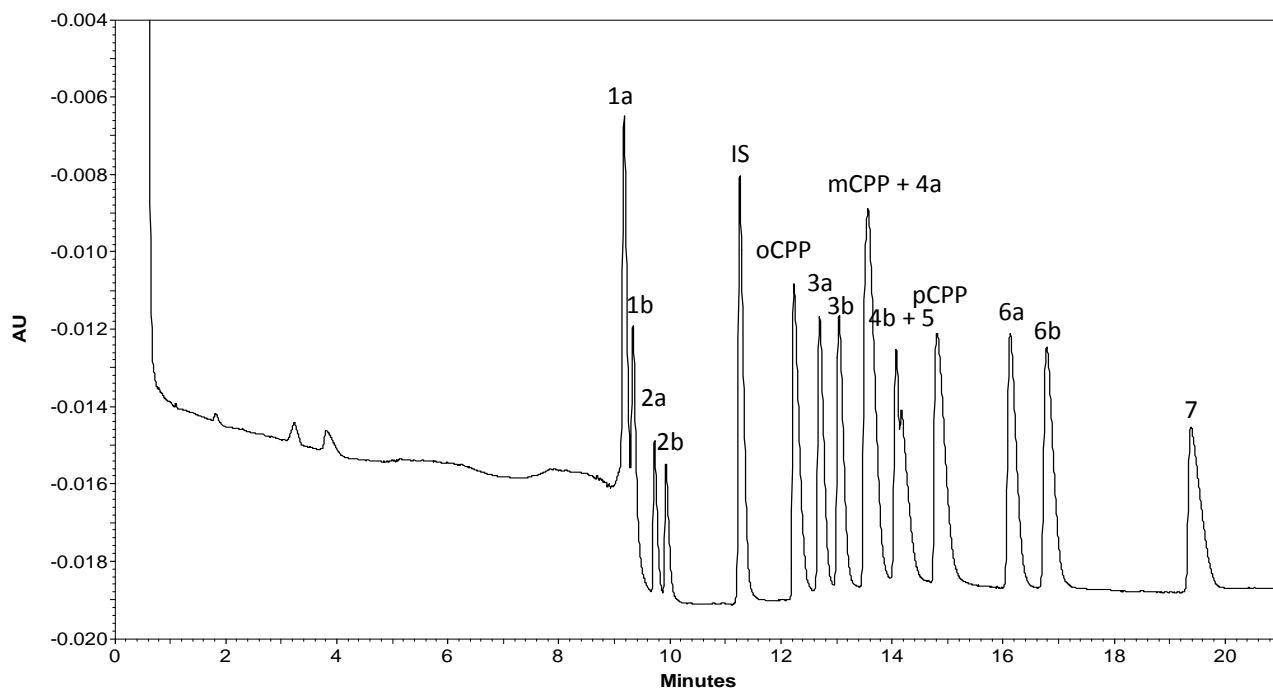


Obr. 26 Vliv cyclodextrinů na separaci CPP izomerů za podmínek: pufr 20 mM kyselina fosforečná o pH 2,5 (upraveno TEA) obsahující 10 mM CD, napětí 25 kV, teplota 25°C, vlnová délka detekce 204 nm, nástřik 50 mbar po dobu 6 s.

Během optimalizace metody bylo třeba věnovat pozornost selektivitě separace. Způsob jak zajistit selektivitu, bylo separovat izomery CPP a IS v přítomnosti látek, které se mohou také vyskytovat v zabavených tabletách např.: amfetamin, metamfetamin, 3,4-methyldioxyamfetamin (MDA), 3,4-methyldioxyamfetamin (MDMA), 3,4-methyldioxy-N-etylamfetamin (MDEA), 1-(3-trifluormetylfenyl)piperazin (TFmPP), kokain.

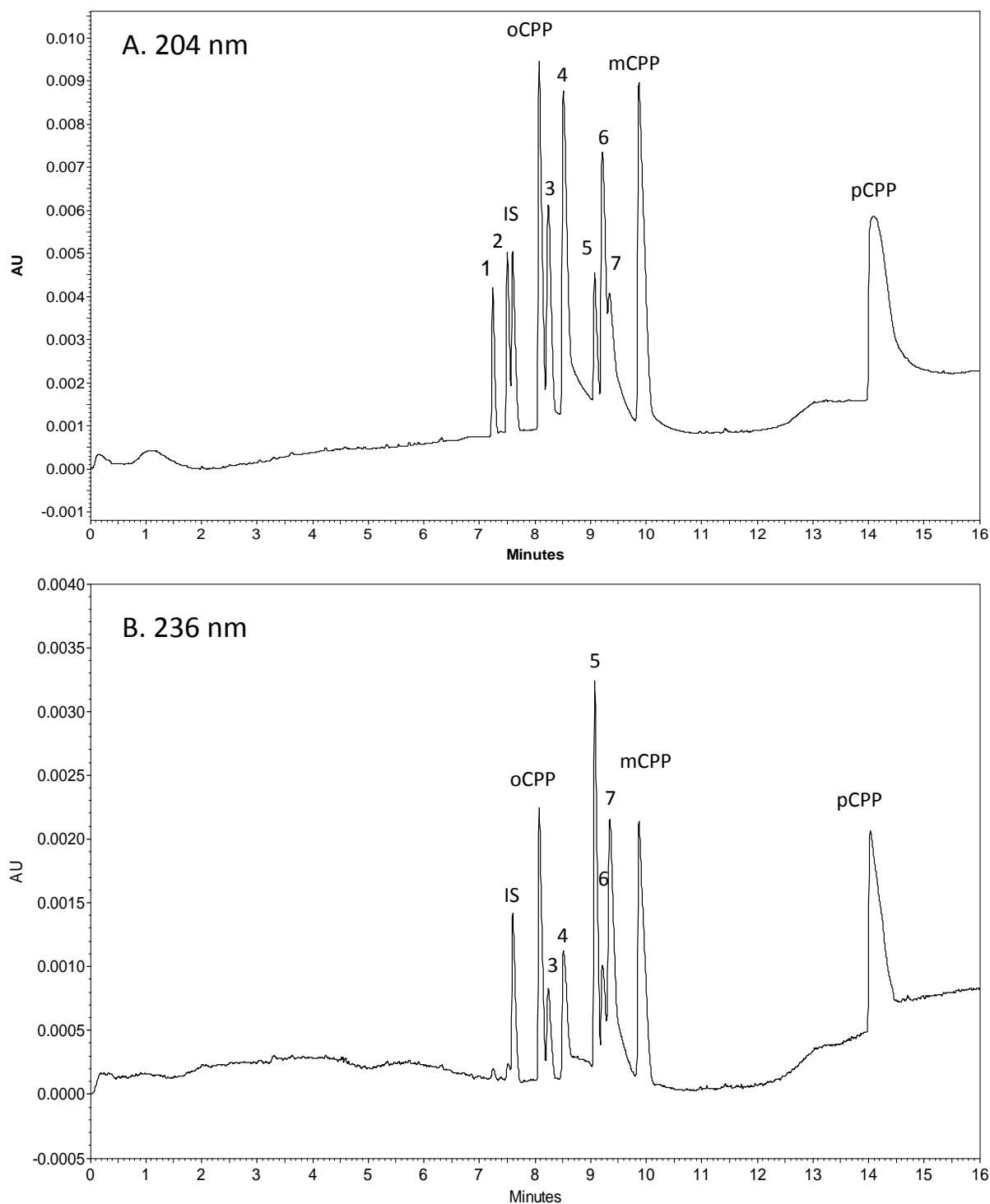
S ohledem na citlivost, symetrii píku, účinnost a rozlišení nejlepší separaci izomerů CPP a IS z testovaných CD poskytl HP-β-CD. Metoda byla optimalizována, byl zkoumán vliv koncentrace kyseliny fosforečné v rozsahu 10 – 40 mM, pH 2,0 - 4,0, koncentrace HP-β-CD 2,5 – 15 mM, napětí 15 – 30 kV, teploty 20 – 30°C a nástřiku vzorku 5 – 15 s. Když však byla metoda testována na selektivitu (Obr. 27), byla zjištěna interference mezi píky mCPP a MDMA (4a) a TFmPP (4b+5), kterou nebylo možné odstranit ani změnou koncentrace HP-β-CD ani přidávkem organického rozpouštědla do pufru (5 – 15% methanolu, acetonitrilu nebo

propan-2-olu). V těchto experimentech byl používán lidokain jako vnitřní standard a vlnová délka detekce byla 204 nm.



Obr. 27 Separace izomerů CPP, lidokainu (IS) a standardů drog pomocí HP- $\beta$ -CD. Podmínky separace: 7,5 mM HP- $\beta$ -CD ve 20 mM kyselině fosforečné o pH 2,5 (upraveno TEA), napětí 25 kV, teplota 25°C, vlnová délka detekce 204 nm, nástřik 50 mbar po dobu 6 s. Pořadí migrace: amfetamin (1), metamfetamin (2), MDA (3), MDMA (4), TFmPP (5), MDEA (6) a kokain (7).

Dalším CD, který poskytl dobrou separaci, byl  $\alpha$ -CD. Při koncentraci 10 mM  $\alpha$ -CD a za původních podmínek (20 mM fosfát, pH 2,5 (TEA), napětí 25 kV a teplota 25°C) se separace mCPP, MDMA a TFmPP značně vylepšila. Plná separace byla docílena u izomerů CPP, IS (prokain), amfetaminu, MDMA, TFmPP a kokainu. Pík MDEA migrující mezi TFmPP a kokainem stanovení izomerů CPP nepřekáží. Navzdory snaze o odstranění zbývajících komigrací MDA /oCPP a metamfetaminu/IS pomocí přidavku organického rozpouštědla do pufru (5 – 15% methanolu, acetonitrilu nebo propan-2-olu), zvýšením koncentrace  $\alpha$ -CD z 10 na 15 mM, změnou napětí (15 – 30 kV) píky zůstaly jen částečně separovány. Pro získání lepších tvarů píky pCPP byla použita vyšší vlnová délka 236 nm (Obr. 28 B). Pokles citlivosti při 236 nm byl kompenzován zvýšením doby nástřiku na 8s (při 50 mbar). Výhoda prokainu jako vnitřního standardu spočívala v existenci jeho druhého absorpčního maxima (285 nm), díky čemuž byl IS snadno identifikován v DAD spektru mezi ostatními analyty.



Obr. 28 Separace izomerů CPP, prokainu (IS) a standardů drog pomocí  $\alpha$ -CD. Podmínky separace: 10 mM  $\alpha$ -CD v 20 mM kyselině fosforečné o pH 2,5 (upraveno TEA), napětí 25 kV, teplota 25°C, vlnová délka detekce 204 nm (A.) a 236 nm (B.), nástřik 50 mbar po dobu 8 s. Pořadí migrace: amfetamin (1), metamfetamin (2), MDA (3), MDMA (4), TFMPP (5), MDEA (6) a kokain (7).

S ohledem na selektivitu separace probíhaly za těchto optimálních podmínek (Tab. 11.):

Tab. 11. Shrnutí optimálních podmínek pro separaci izomerů CPP.

<b>Kapilára:</b>	50 µm vnitřní průměr, 60 cm celková délka (50 cm efektivní délka), křemenná bez vnitřního potahu;
<b>Kondicionace:</b>	Nová kapilára 30 min (1 M NaOH, voda), první/poslední mytí dne 10 min (1 M NaOH, voda), mezi analýzami 3 min pufr; Tlak 1500 mbar;
<b>Separační pufr:</b>	20 mM fosfát, pH 2,5 (upraveno TEA) a 10 mM α-CD;
<b>Nástřik:</b>	Hydrodynamický 50 mbar, 8 s;
<b>Detekce:</b>	Spektrofotometrická 236 nm;
<b>Napětí, proud:</b>	+ 25kV / 15 kV;
<b>CE systém:</b>	Beckman Coulter PA 800;
<b>Teplota:</b>	25°C;
<b>Vnitřní standard:</b>	Prokain o koncentraci 0,1 mg/mL.

### 3.5.3.2 Validace

Metoda byla validována dle norem ICH [115] a byla hodnocena selektivita, linearita, limity detekce a kvantifikace, opakovatelnost nástřiku standardů na třech koncentračních úrovních, správnost a jednodenní přesnost (opakovatelnost).

#### Selektivita

Problém selektivity byl také již diskutován během optimalizace metody výše. Přestože píky MDA/oCPP a prokain/metamfetamin zůstaly jen částečně separovány, metoda umožňuje jejich identifikaci. Při vlnové délce 236 nm metamfetamin neabsorbuje, tedy stanovení izomerů CPP nepřekáží. S ohledem na známé kombinace drog, které jsou nacházeny v tanečních tabletách, je nízká pravděpodobnost výskytu kombinace MDA s oCPP. Z tohoto pohledu může být metoda považována za selektivní.

#### Linearita

Kalibrační křivka se skládala ze šesti bodů, měřených po třech nástřicích. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Microsoft Excel metodou lineární regrese jako závislost průměrů korigovaných ploch analytů (plocha analytu korigovaná migračním časem daného analytu v poměru k ploše vnitřního standardu korigované migračním časem vnitřního standardu) a koncentrace analytu. V daném rozsahu koncentrací byla metoda lineární s vyhovujícími korelačními koeficienty (Tab. 12.).

Tab. 12. Lineární data.

Analyt	Rozsah [µg/mL]	Rovnice přímký	Korelační koeficient
<b>oCPP</b>	10 – 200	$y = 0,0157x + 0,0141$	0,9995
<b>mCPP</b>	10 – 200	$y = 0,0195x + 0,0043$	0,9994
<b>pCPP</b>	10 – 200	$y = 0,0216x - 0,1645$	0,9994



## Limity

Limit kvantifikace (LOQ) a detekce (LOD) byly vypočítány jako poměr signálu k šumu (**14**)  $S/N=3$  a  $S/N=10$  (Tab. 13.).

Tab. 13. Limity detekce a kvantifikace.

Analyt	LOD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<b>oCPP</b>	2,0	7,0
<b>mCPP</b>	2,5	8,0
<b>pCPP</b>	3,0	10,5

## Opakovatelnost

Opakovatelnost migračních časů ( $t_m$ ) a korigovaných ploch píků (KP) byla vyhodnocena nástřiky šesti vzorků na třech koncentračních úrovních (10, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Opakovatelnost byla vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka (% RSD) průměrných hodnot. Výsledná data (Tab. 14.) ukazují uspokojující hodnoty opakovatelnosti migračních časů a korigovaných ploch, hodnoty RSD nepřekročily 5%.

Tab. 14. Opakovatelnost – hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD, %).

Analyt	10 $\mu\text{g/mL}$		100 $\mu\text{g/mL}$		200 $\mu\text{g/mL}$	
	$t_m$	KP	$t_m$	KP	$t_m$	KP
<b>oCPP</b>	3,7	2,1	3,6	0,44	3,4	0,85
<b>mCPP</b>	4,9	2,7	3,8	0,55	4,3	1,05
<b>pCPP</b>	4,6	4,0	4,5	0,92	4,2	1,31

$t_m$  – migrační čas

KP – průměr poměrů korigovaných ploch analytů a vnitřního standardu.

## Správnost

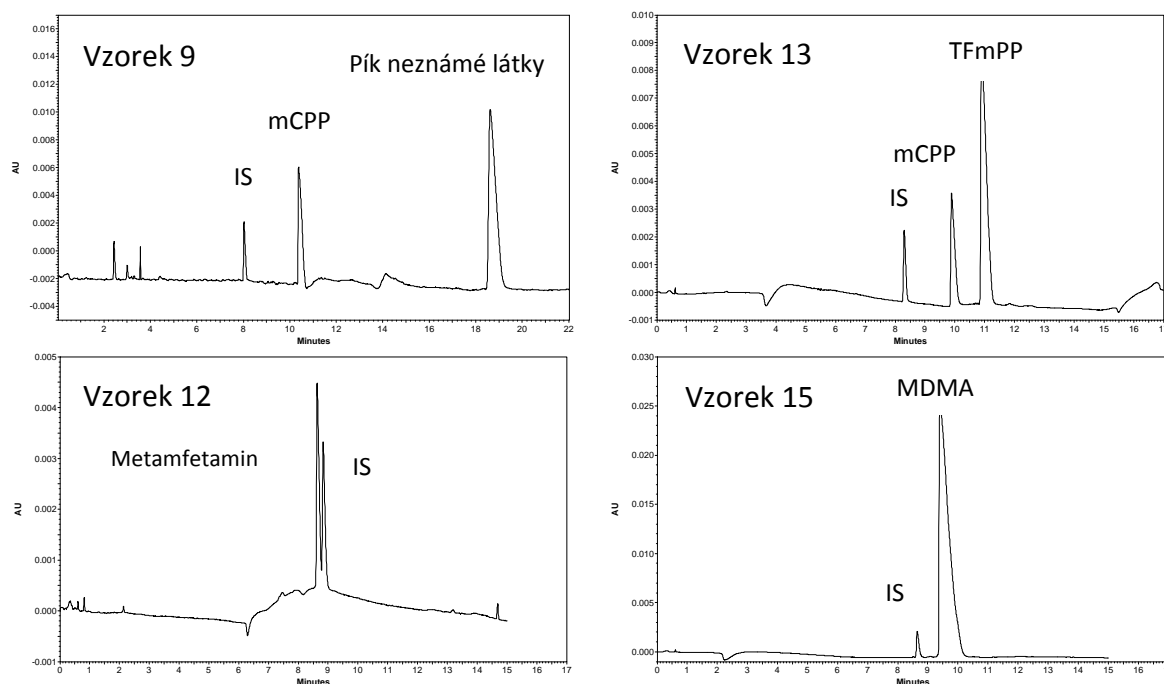
Správnost byla hodnocena prostřednictvím recovery testu (přidáním určitého objemu zásobního roztoku mCPP) na třech koncentračních úrovních (50, 75, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) k roztoku testované tablety, který obsahoval 75  $\mu\text{g/mL}$  mCPP. Izomery oCPP ani pCPP nebyly v dostupných zabavených tabletách nalezeny. Roztoky se standardními přídávky mCPP (výsledné koncentrace mCPP 125, 150 a 175  $\mu\text{g/mL}$ ) byly nastříknuty šestkrát a bylo spočítáno recovery (**15**). Výsledky ukazují hodnoty recovery kolem 100% s RSD nižší než 2,32% (Tab. 15.).

Tab. 15. Správnost.

Analyt	Přidáno [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Nalezeno [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Recovery [%]	RSD [%]
<b>mCPP</b>	50	50,79	101,59	0,83
	75	75,93	101,24	1,31
	100	100,97	100,97	2,32

### 3.5.3.3 Analýza zabavených tablet

Metoda byla aplikována na tablety zabavené policií. Ukázky elektroferogramů jsou demonstrovány na Obr. 29. Jednotlivé zakázané látky obsažené v tabletách byly identifikovány spikováním roztoků tablet roztoky standardů. Pokud byla zjištěna přítomnost mCPP, stanovení probíhalo se šesti nástřiky daného vzorku a koncentrace mCPP byla odečtena z tříbodové kalibrační křivky měřené současně. Výsledek byl vyjádřen jako miligramy mCPP v 300 mg tablety (stanoveno jako průměrná hmotnost tablety). Relativní směrodatná odchylka RSD (%) z šesti měření vzorku (jednodenní přesnost-opakovatelnost) byla u všech vzorků nižší než 5%.



Obr. 29 Elektroferogramy vzorků zabavených tablet. Podmínky separace: 10 mM  $\alpha$ -CD v 20 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 (upraveno TEA), napětí 25 kV, teplota 25°C, vlnová délka detekce 236 nm (kromě elektroferogramu vzorku 12, kde 204 nm), nástřik 50 mbar 8 s.

V žádném ze sedmnácti vzorků analyzovaných tablet nebyl identifikován ani oCPP ani pCPP. Přítomnost mCPP byla potvrzena ve 12 vzorcích tablet a zde bylo též provedeno stanovení obsahu této drogy. V jedné tableti byl společně nalezen mCPP a TFmPP. Dvě tablety obsahovaly metamfetamin, jedna čistý MDMA, jedna kokain a jedna TFmPP. Obsah mCPP v průměrné tableti (300 mg) se pohyboval mezi 8,1 až 57,8 mg v závislosti na přítomnosti jiných drog. Výsledky stanovení mCPP v brazilských tabletách korespondují s údaji Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogovou závislost [26] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), kde je uváděna průměrná dávka mCPP v jedné tableti mezi 8 a 80 mg. Přehled výsledků analýz vzorků tablet podává Tab. 16.

Tab. 16. Výsledky stanovení vzorků tablet zabavených policií státu São Paulo.

Vzorek	oCPP	mCPP Nalezeno <sup>a</sup> [mg] (RSD <sup>b</sup> ; n=6)	pCPP	Vybrané drogy						
				A	Me	MDA	MDMA	MDEA	TFmPP	C
1	-	21,7 (4,9)	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	22,0 (1,9)	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	18,0(4,0)	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	24,3 (4,5)	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	23,0 (4,8)	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	21,8 (3,9)	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	23,1 (4,5)	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	21,0 (3,8)	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	21,1 (3,1)	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	22,8(3,2)	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-
12	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-
13	-	8,1 (1,8)	-	-	-	-	-	-	P	-
14	-	57,8 (1,7)	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-
16	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P

P= detekováno, nestanoveno;

<sup>a</sup> mg mCPP nalezené v 300 mg tablety;

<sup>b</sup> RSD hodnoty korigovaných ploch mCPP vypočítané ze šesti nástříků roztoků tablet;

A = amfetamin;

Me = metamfetamin;

C = kokain.

### 3.5.4 Závěr

Byla vyvinuta jednoduchá CE metoda, kdy s využitím  $\alpha$ -cyklodextrinu jako selektoru dochází k separaci izomerů chlorfenylpiperazinu. Metoda byla validována a aplikována na vzorky tablet zabavených policií státu São Paulo. Metoda vykazuje dostatečnou selektivitu, linearitu v daném rozsahu koncentrací, dobrou opakovatelnost migračních časů a korigovaných ploch, opakovatelné a přesné hodnoty recovery a uspokojivou jednodenní přesnost (opakovatelnost). Přestože byla metoda původně vyvinuta pro stanovení izomerů CPP, je využitelná i pro identifikaci dalších zneužívaných drog v zabavených tabletách.

## 3.6 Experimentální část 2: Vývoj citlivé elektroforetické metody pro stanovení 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu v moči

Připravuje se k publikaci pod názvem: DEVELOPMENT OF SENSITIVE ELECTROPHORETIC METHOD FOR DETERMINATION OF URINARY 8- HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSINE.

### 3.6.1 Cíl

Cílem tohoto projektu bylo vypracovat dostatečně citlivou CE/UV metodu pro stanovení 8OHdG v lidské moči. Bylo třeba využít kombinaci několika způsobů zvyšování citlivosti v CE jako jsou cely s prodlouženou optickou dráhou, zakoncentrování vzorku přímo v kapiláře, úprava vzorku pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE) a interakce analytu s boritanem, který tvoří komplexy s hydroxy skupinami 8OHdG.

### 3.6.2 Materiál a metody

#### Instrumentace

Pro analytická stanovení byl použit CE systém Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), vybavený DAD detektorem a software ChemStation (verze B04.03) s možností vložení kazet s celami s prodlouženou délkou detekce (bublinová cela a z-cela).

pH pufrů a vzorků bylo upravováno na pH metru PHM 220 (Radiometer, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou PHC2401-8, která byla kalibrována pufrů o pH 4,00, 7,00 a 10,00 (WTW, Weilheim, Německo). Před analýzou byly všechny roztoky odplyněny na ultrazvukové lázni Sonorex RK 31 (Německo).

Běžné křemenné vnitřně nepotažené kapiláry o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ , celkové délce 60,0 cm (efektivní 51,5 cm) byly zakoupeny u C&M Scientific (Shipley, Velká Británie), speciální kapiláry s bublinovou celou 50  $\mu\text{m}$  ID (150  $\mu\text{m}$  rozšíření v místě detekce) celkové délky 64,5 cm (efektivní 56 cm) a z-celou o 75  $\mu\text{m}$  ID (1,2 mm prodloužení optické dráhy), 80,5 cm celková délka (72,5 cm efektivní délka) byly zakoupeny od Agilent Technologies (Waldbronn, Německo).

SPE metody pro úpravu vzorku byly vyvinuty na kolonkách Oasis: HLB (3 mL, 60 mg), MCX (3 mL, 60 mg), MAX (3 mL, 60 mg) zakoupených od Waters (Milford, MA, USA) a Supelco DSC-WCX, DSC-SCX, DSC-WAX, DSC-SAX od Sigmay Aldrich (St. Luis, MO, USA) za použití zařízení pro extrakci na tuhou fázi za sníženého tlaku Vacuum Manifold od firmy Supelco Visiprep <sup>TM</sup>. Vzorky moči byly centrifugovány na zařízení Eppendorf Mini Spin<sup>®</sup>Plus (Hamburk, Německo).

#### Elektroforetické postupy

Nové kapiláry byly promývány 5 minut methanolem při tlaku 1000 mbar, 20 minut 1M hydroxidem sodným a 20 minut vodou. Před každodenním použitím byly promývány 10 minut 1 M roztokem hydroxidu sodného a 10 minut vodou. Mezi analýzami byla kapilára propláchnuta 2 minuty 0,1 M hydroxidem sodným, 2 minuty vodou a 3 minuty separačním pufrem.

Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar 6 s při separacích bez zakoncentrování. Při zakoncentrování doba nástřiku velké zóny vzorku (75% kapiláry) byla spočítána dle vztahu **(1)** a následně pak upravena dle experimentů na detekčních celách.

### **Chemikálie**

Standardy 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8OHdG), kreatininu a 2'-deoxyguanosinu byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Ostatní chemikálie a složky pufrů jsou uvedeny v kapitole 3.1.2.

### **Příprava roztoků standardů a pufrů**

Zásobní vodné roztoky 8OHdG a kreatininu o koncentraci 1 mg/mL byly skladovány zamrzlé při teplotě -18°C.

Separací pufr a pufr používaný pro MAX SPE metodu byly připravovány denně čerstvé z 0,3 M zásobního roztoku kyseliny borité a přídavku acetonitrilu. Žádané pH\* bylo upraveno přídavkem 1 M hydroxidu sodného. Pufr pro MAX SPE neobsahoval acetonitril. Separací pufrů byly před analýzou filtrovány membránovým filtrem 0,45 µm a odplyněny na ultrazvukové lázni.

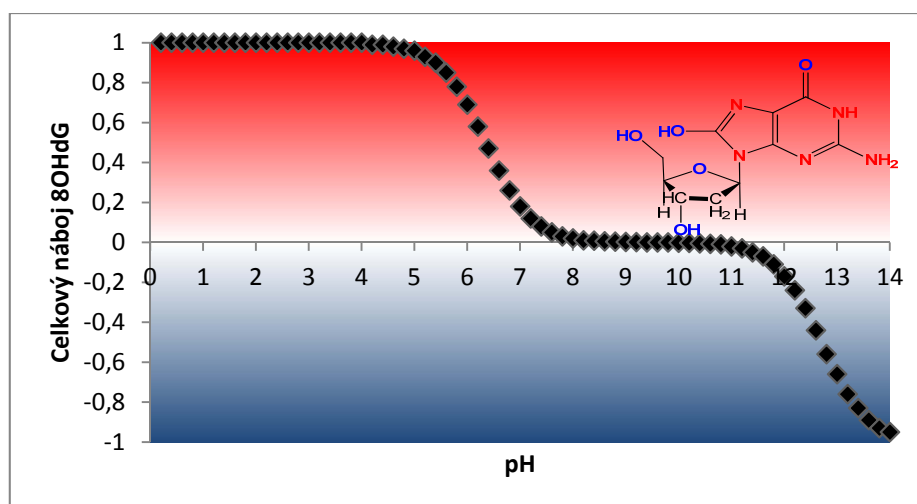
### **Úprava vzorku**

Vzorky moči byly centrifugovány (13 400 rpm po dobu 10 minut), odebraný supernatant byl dále zpracován na SPE nebo zamrazen (-18°C) pro pozdější použití.

## **3.6.3 Výsledky a diskuze**

### **3.6.3.1 Optimalizace základního elektrolytu**

Prvním krokem ve vývoji vysoce citlivé metody byla optimalizace separačního pufru. 8OHdG má ve své struktuře jak skupiny které mohou nést kladný náboj, tak skupiny, které mohou být nabitě negativně v závislosti na pH. 8OHdG je schopen migrovat jako kationt i jako aniont (Obr. 30).



Obr. 30 Závislost náboje na pH u 8OHdG. Spočítáno a vygenerováno programem sparc.

Při vývoji metody byl také brán v úvahu fakt, že by 8OHdG mohl být stanoven společně s kreatininem, markerem metabolismu dusíkatých látek v těle. V borátovém pufru 8OHdG migroval jako negativně nabitý komplex s borátem, což zvyšovalo jeho mobilitu a také citlivost detekce. Na druhou stranu v zásaditém prostředí byla molekula kreatininu neutrální a migrovala společně s elektroosmotickým tokem a ostatními elektroneutrálními molekulami. V kyselém prostředí fosfátového a acetátového pufru existovala možnost současného stanovení obou látek, avšak citlivost stanovení zde byla mnohem nižší než při použití borátového pufru. Také vzhledem ke značnému rozdílu koncentrací obou látek v moči bylo rozhodnuto pokračovat v optimalizaci CZE stanovení 8OHdG v borátovém pufru a kreatinin eventuálně stanovit v moči jinou metodou. Byl studován vliv přidavku aditiv SDS, cholátu a deoxycholátu do borátového pufru. Ačkoli u roztoků standardu bylo zaznamenáno zvýšení citlivosti, při pokusech s močí, ke které byl přidán 8OHdG, se pík 8OHdG neodděloval od matrice ani při různých koncentracích jednotlivých aditiv. Vliv koncentrace borátu v rozsahu 70 – 150 mM byl testován při pH 9. Byl také studován vliv pH bylo v oblasti 8,0 – 10,0 (upraveno 1 M hydroxidem sodným). Dále byl sledován vliv přidavku organických rozpouštědel acetonitrilu, methanolu a propan-2-olu při obsahu organické složky 10% (v/v). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s acetonitrilem, který zlepšil jak tvar píku 8OHdG, tak i jeho separaci od ostatních složek moči. Vliv množství acetonitrilu byl sledován od 0 až po 30% (v/v). Celý proces optimalizace základního elektrolytu probíhal v běžných křemenných kapilárách 75  $\mu\text{m}$  ID.

### 3.6.3.2 Zvyšovací citlivosti analýzy (celý s prodlouženou délkou optické dráhy, zakoncentrování v kapiláře)

Jelikož citlivost detekce po optimalizaci separačního pufru v běžné kapiláře nebyla dostatečná pro stanovení velmi nízkých koncentrací 8OHdG v moči (desítky nmol/L u zdravých jedinců), bylo třeba zvýšit citlivost a to přibližně o tři řády. Dalo se předpokládat, že samotné použití cel s prodlouženou délkou detekce nebude dostačující.

Bylo zkoušeno několik technik pro zakoncentrování analytu přímo v kapiláře, u kterých není nezbytná nevodivá matrice vzorku, tedy úprava vzorku moče před analýzou. Byly prováděny experimenty na moči s přidavkem standardu 8OHdG na principu přechodné izotachofórey, „stackingu zprostředkovaného pH“ (pH mediated stacking), „elektrokinetického supernabití“ (elektrokinetic supercharging). U některých z těchto postupů docházelo k zakoncentrování 8OHdG a částečnému odstranění matrice, nicméně dosažené výsledky nebyly dostačující. Nejlepších výsledků a nejnižších limitů detekce bylo dosaženo při zakoncentrování z velkého objemu vzorku s obrácením polarity (LVSS), kde je podmínkou nízká vodivost matrice vzorku. U aplikace metody na reálné vzorky moči to znamená nutnost odstranit vodivé látky (především soli) vhodnou předúpravou vzorku.

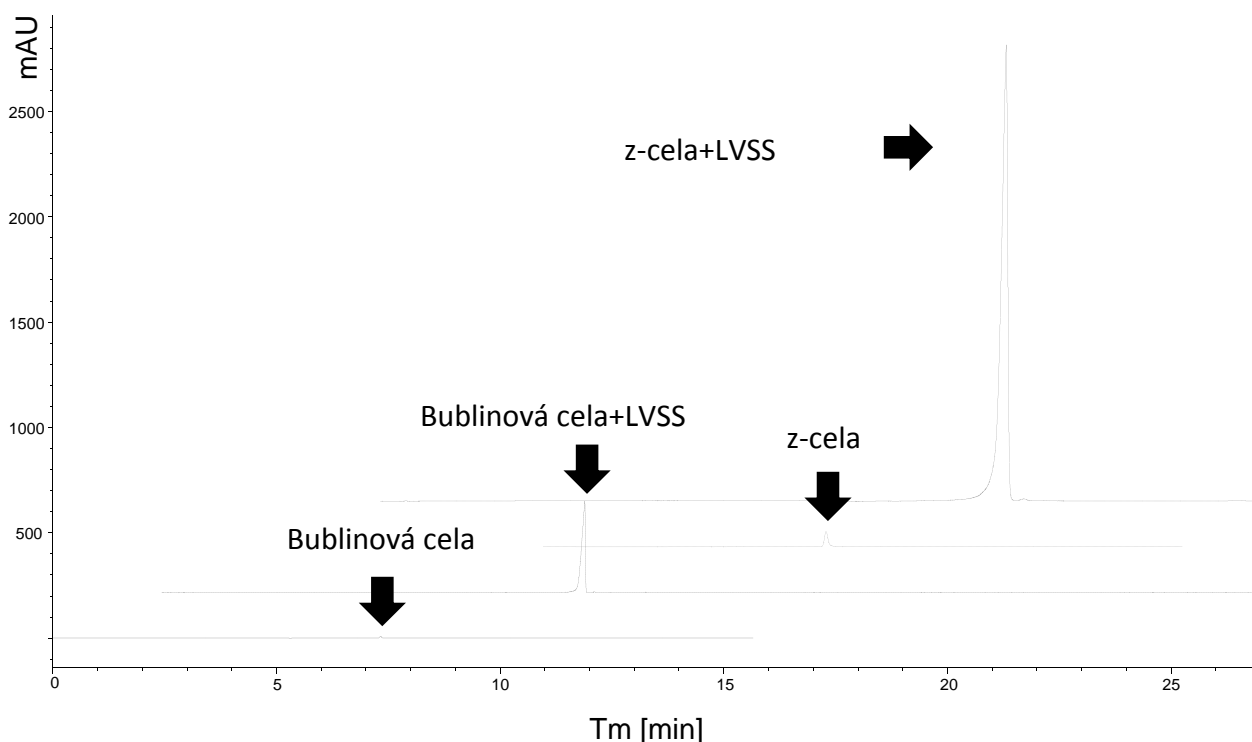
Nejdříve byla vyhodnocena citlivost stanovení 8OHdG ve vodných standardních roztocích s použitím kapilár s bublinovou celou a z-celou a následně pak jejich kombinace s LVSS. Účelem bylo ověřit, zda je kombinací těchto dvou přístupů možné dosáhnout velmi nízkých limitů detekce 8OHdG. Výsledky uvedené v Tab. 17. (bublinová cela) a v Tab. 18. (z-cela) ukazují, že za použití vodných standardů a kombinace z-cela a LVSS je možno detekovat koncentrace srovnatelné s fyziologickými hladinami 8OHdG v moči zdravých jedinců. Porovnání signálů při koncentraci 20 µg/mL 8OHdG pro detekční cely v kombinaci s LVSS je uvedeno na Obr. 31. V těchto experimentech byl jako vnitřní standard použit 2'-deoxyguanosin.

Tab. 17. Lineární data, limity a opakovatelnost pro stanovení na vodných standardech 8OHdG za použití bublinovou cely a kombinace bublinová cela s LVSS.

Parametry	Bublinová cela	Bublinová cela + LVSS
Rozsah [µg/mL]	2,5–20,0	0,05–1,0
Rovnice přímky	$y = 0,1178x + 0,1945$	$y = 0,0030x + 0,0729$
Korelační koeficient	0,9983	0,9940
LOD	0,5 µg/mL (1 770 nM)	0,025 µg/mL (88,3 nM)
LOQ	1,67 µg/mL (5 900 nM)	0,12 µg/mL (424 nM)
<b>Jednodenní opakovatelnost RSD [%;] (n=6)</b>		
Migrační čas	0,22	1,56
Korigovaná plocha	4,08	2,87

Tab. 18. Lineární data, limity a opakovatelnost pro stanovení vodných standardů 8OHdG za použití z-cely a kombinace z-cela s LVSS.

Parametry	Z-cela	Z-cela + LVSS
Rozsah [µg/mL]	0,62–20,0	0,025–1,0
Rovnice přímky	$y = 0,2338x - 0,1309$	$y = 10,5550x - 0,2725$
Korelační koeficient	0,9998	0,9974
LOD	0,13 µg/mL (460 nM)	0,01 µg/mL (35 nM)
LOQ	0,5 µg/mL (1 770 nM)	0,025 µg/mL (88,3 nM)
<b>Jednodenní opakovatelnost RSD [%;] (n=6)</b>		
Migrační čas	0,77	1,74
Korigovaná plocha	1,07	5,15



Obr. 31 Porovnání elektroforegramů při použití cel s prodlouženou optickou dráhou v kombinaci s LVSS. Podmínky separace: 150 mM borát, pH\* 9,2 (upraveno 1 M NaOH) 10% ACN (v/v),  $\pm 25$  kV při stakingu, 25°C, vlnová délka detekce 282 nm, nástřik běžný 50 mbar 6 s nebo LVSS, koncentrace 8OHdG 20  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.6.3.3 Úprava vzorků moči k analýze

Pro uplatnění techniky LVSS je potřeba dosáhnout nízké vodivosti dávkovaného vzorku. Za tímto účelem byly prováděny experimenty s extrakcí na pevnou fázi (SPE) a elektromembránovou extrakcí (EME).

Vhodným extrakčním postupem pro 8OHdG v moči se zdála být iontově výměnná SPE. Nejdříve byly testovány slabé (DSC-WCX), silné (DSC-SCX) Supelco a smíšené (MCX, 3 mL, 60 mg) Oasis katexové sorbenty za podmínek uvedených v obecných protokolech příslušných komerčních kolonek. Přijitelné výsledky přinesly kolonky MCX. I po optimalizaci postupu byla však výtěžnost nízká (Tab. 19.) a bylo třeba hledat další, specifitější metodu. Dále se zkoušely anexové sorbenty slabé (DSC-WAX), silné (DSC-SAX) Supelco a smíšené (MAX, 3 mL, 60 mg) Oasis. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na kolonkách MAX, kde byl 8OHdG specificky zadržován jako záporně nabitý komplex s borátem. Metoda byla optimalizována a bylo dosaženo dobré výtěžnosti (Tab. 19.). Zbytky elučnicích činidel však zvyšovaly vodivost vzorku a proto nebylo možné s eluátem provést stacking.

Další extrakční postup byl vyvinut na komerčních HLB (3 mL, 60 mg) Oasis kolonkách s relativně dobrou výtěžností (Tab. 19.). U této metody bylo možné provádět LVSS, nicméně i v kombinaci se z-celou nebylo možné na přečištěné spikované moči dosáhnout takové citlivosti, jaké bylo dosaženo za stejných podmínek bez úpravy vzorku na vodných standardech.



Tab. 19. Přehled SPE metod vyvinutých na úpravu vzorků moči, jejich výtěžnost při koncentraci 100 µg/mL, shrnutí výhod a nevýhod postupu.

SPE metoda	MCX 3cc	MAX 3cc	HLB 3cc
<b>Aktivace kolonky</b>	3 mL MeOH, 3mL voda	3 mL MeOH, 3mL pufr*	3 mL ACN, 3mL vody
<b>Vzorek</b>	1 mL (pH 3, upraveno 2 mM HCl)	1 mL (1:1, vzorek : pufr*)	1 mL
<b>Promývání</b>	1,5 mL 0,1% HCOOH	1,5 mL pufr*	2 mL vody
<b>Eluce</b>	1,5 mL 2,6% hydroxid amonný v MeOH	1,5 mL 2% HCOOH v MeOH	1,5 mL 75% ACN
<b>Zakoncentrování vysušením na dusíku a rozředěním ve 0,2 mL vody:</b>	7,5x	7,5x	7,5x
<b>Poznámka:</b>		*0,15 M borát pH 9,2 (upraveno 1 M NaOH)	
<b>Výtěžnost metody<sup>a</sup>: ST/SP</b>	65% / 40%	98% / 86%	80% / 60%
<b>Výhody</b>		dobrá výtěžnost	LVSS možný
<b>Nevýhody</b>	nízká výtěžnost	LVSS není možný	

ST- vodný standard 8OHdG.

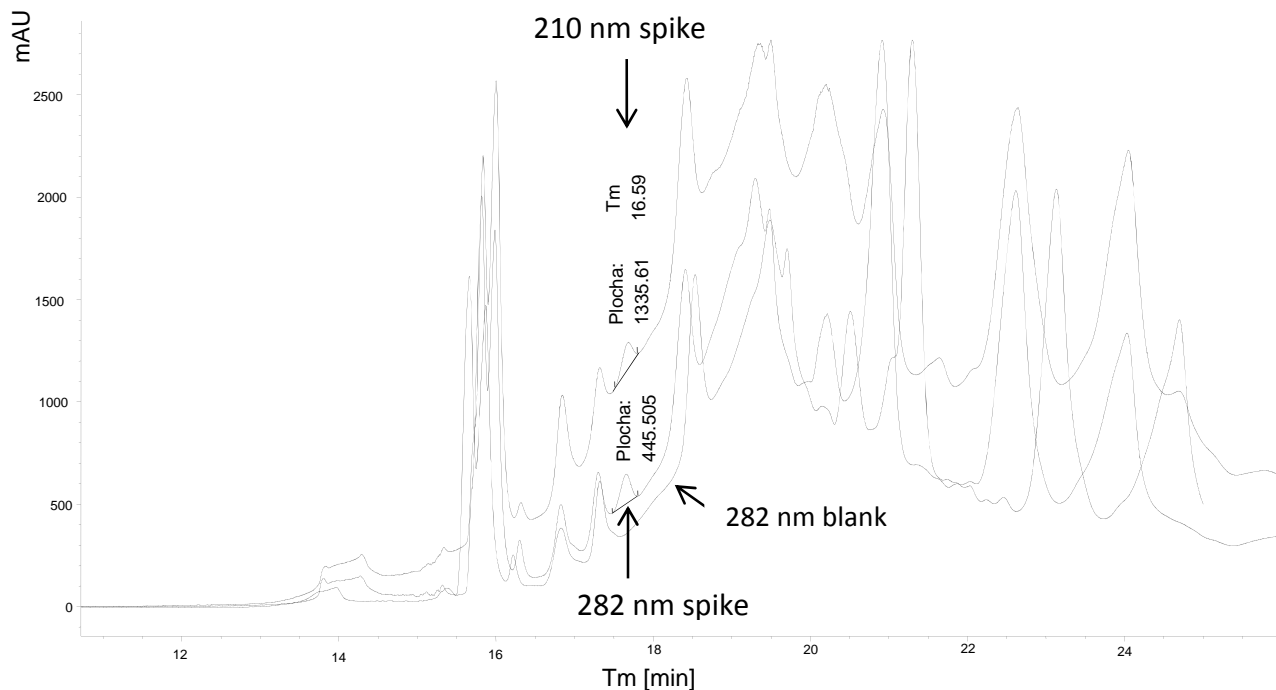
SP- moč spikovaná 8OHdG.

<sup>a</sup>měřeno na jedné koncentrační hladině. Vypočítáno jako průměr výsledků na 6 kolonkách.

Experimenty s EME jako prekoncentrační technikou díky komplexnosti 8OHdG nepřinesly významné výsledky v rámci zvyšování citlivosti detekce.

### 3.6.3.4 Analýza vzorků moči

Ze všech zkoušených postupů pro stanovení 8OHdG v moči metodou kapilární elektroforézy za použití spektrofotometrické detekce bylo nejnižší hodnoty LOD dosaženo použitím kombinace SPE (HLB) úpravy vzorku a aplikace LVSS v z-cele. Tato koncentrace 0,5 µg/mL (1,77 µM) byla stanovena ve spikované moči tří zdravých jedinců. Plocha píku 8OHdG (Obr. 32) za daných podmínek (Tab. 20.) je ještě dost velká, aby bylo možné stanovit i nižší koncentrace.



Obr. 32 Porovnání elektroferogramů blanku moči, moči spikované 0,5 µg/mL 8OHdG při vlnových délkách detekce 210 nm a 282 nm. Moč upravená SPE-HLB s následným LVSS v z-cele. Podmínky separace: 0,15 M borát, pH\* 9,2 (1 M NaOH) 20% ACN (v/v), ± 25 kV, 25°C, LVSS.

Tab. 20. Shrnutí podmínek při stanovení 8OHdG v moči.

<b>Kapilára:</b>	Kapilára se z-celou 75 µm ID, 80,5 cm celková délka (72,5 cm efektivní), křemenná bez vnitřního potahu;
<b>Kondicionace:</b>	Nová kapilára 5 min MeOH, 20 min (1 M NaOH, voda), první/poslední mytí dne 10 min (1 M NaOH, voda), mezi analýzami 2 min 0,1 M NaOH, 2 min voda, 3 min pufr; Tlak 1000 mbar;
<b>Separáčnı pufr:</b>	150 mM borát, pH* 9,2 (upraveno 1 M NaOH) 10% ACN (v/v);
<b>Nástřık:</b>	Hydrodynamický: 50 mba, 6 s nebo LVSS;
<b>Detekce:</b>	Spektrofotometrická 282 nm;
<b>Napětı:</b>	± 25 kV, LVSS;
<b>CE systém:</b>	Agilent 7100;
<b>Teplota:</b>	25°C;

### 3.6.3.5 Porovnání s ostatními metodami

V porovnání s již publikovanými CE/UV metodami (Tab. 21.), Kvasnicová [59] dosáhla běžným postupem v borátovém pufru limitu detekce (17 µM) v desetkrát naředěné spikované moči při nižší vlnové délce (200 nm). Detekce při nižší vlnové délce je sice citlivější, nicméně pro většinu analytů málo specifická. Z postupu publikované metody se dá usoudit, že moč musela být naředěna, aby bylo možné přidaný 8OHdG mezi ostatními píky spolehlivě detekovat. S výsledky uvedenými v publikaci [60], kde bylo dosaženo jednoduchým způsobem velmi nízkých detekčních limitů (42 nM 8OHdG), naši metodu srovnávat nelze.

V naší laboratoři jsme metodu [60] zkoušeli několikrát neúspěšně reprodukovat (hodnoty LOD námi zjištěné při použití této metody byly asi o tři řády vyšší).

Tab. 21. Porovnání podmínek pro CE/UV stanovení 8OHdG v moči.

	Kvasnicová [59]	Tůma [60]	Naše metoda
<b>LOD (vodné standardy):</b>	850 nM	34 nM	35 nM
<b>LOD (moč):</b>	17 $\mu$ M	42 nM	-
<b>Vlnová délka detekce:</b>	200 nm	204 nm	282 nm
<b>Pufrr:</b>	10 mM borát pH 9,0	80 mM CHES, 0,1 mM CTAB (9 mM LiOH), pH 8,6	0,15 M borát pH 9,2
<b>Kapilára:</b>	75 $\mu$ m ID	75 $\mu$ m ID	75 $\mu$ m ID, z-cela
<b>Úprava vzorku:</b>	-	-	HLB 3cc
<b>Zakoncentrování:</b>	-	-	LVSS

### 3.6.4 Závěr

CE/UV stanovení 8OHdG s použitím detekční cely s prodlouženou optickou dráhou v kombinaci s on-line zakoncentrováním vzorku přímo v kapiláře bylo u vodných standardů analytu dosaženo hodnot LOD, které jsou blízké zvýšeným hladinám 8OHdG u zdravých jedinců. U reálných vzorků moči však činila problém především relativně vysoká vodivost matrice moči. Proto bylo vyvinuto několik extračních postupů, z nichž byl vybrán jeden, který měl přijatelnou výtěžnost a byl kompatibilní s technikou zakoncentrování. Ani poté však nebylo dosaženo takové citlivosti jako u vodných standardů 8OHdG. I přes veškeré úsilí a kombinaci moderních přístupů zvyšování citlivosti CE/UV není vypracovaná metoda dostatečně citlivá pro stanovení nanomolárních koncentrací 8OHdG v biologickém materiálu. Pro taková CE stanovení je vhodnější použít jiný způsob detekce, například detekci amperometrickou nebo kombinaci CE s MS.

## 3.7 Experimentální část 3: Analýza citrusových flavonoidů, troxerutinu a kyseliny askorbové v potravinových doplňcích a farmaceutických přípravcích metodou kapilární zónové elektroforézy

Publikováno ve Food Analytical Methods pod názvem: ASSAY OF CITRUS FLAVONOIDS, TROXERUTIN AND ASCORBIC ACID IN NUTRACEUTICALS AND PHARMACEUTICALS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS.

### 3.7.1 Cíl

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat kapilárně elektroforetickou metodu pro separaci a stanovení diosminu, hesperidinu, kyseliny askorbové, rutinu a troxerutinu v léčivých přípravcích (Cilkanol, Detralex, Ascorutin) a potravinových doplňcích (HemoStop ProBio, Hemodin Prebio Forte).

### 3.7.2 Materiál a metody

#### **Instrumentace**

Byl použit CE systém Beckman Coulter MDQ (Fullerton, CA, USA) vybavený detektorem s diodovým polem a softwarem 32Karat (verze 5.0), pH pufrů bylo upravováno s využitím pH metru PHM 220 (Radiometer, Dánsko) s PHC2401-8 kombinovanou skleněnou elektrodou, která byla kalibrována pufrů o pH 4,00 a 10,00 (WTW, Weilheim, Německo). Pro rozpouštění, odplynění a homogenizaci vzorků sloužila ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31 (Německo). Byly použity křemenné vnitřně nepotažené kapiláry o 50  $\mu\text{m}$  ID, celkové délce 31,2 cm (efektivní délce 21 cm) zakoupené u C&M Scientific (Shiple, Velká Británie).

#### **Elektroforetické postupy**

Před prvním použitím byla nová kapilára kondicionována methanolem po dobu 5 minut při tlaku 1500 mbar, 1 M roztokem hydroxidu sodného 20 minut, 0,1 M roztokem hydroxidu sodného 20 minut a ultra čistou vodou 20 minut. Před první analýzou a po poslední analýze byla kapilára v daný den měření promyta 1 M hydroxidem sodným, 0,1 M hydroxidem sodným a vodou (vždy 10 minut při tlaku 1500 mbar). Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára propláchnuta při tlaku 1000 mbar 0,1 M hydroxidem sodným (2 minuty), vodou (2 minuty) a separačním pufrům (3 minuty).

Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po 6 s.

## Chemikálie

Standardy diosminu (DI), kyseliny askorbové (AA) a skořicové (SK), rutinu (RU) a troxerutinu (TR) byly zakoupeny od firmy Sigma - Aldrich (St. Luis, MO, USA). Hesperidin (HE) byl získán od firmy od Fluka (Německo). Ostatní chemikálie a složky pufrů jsou uvedeny v kapitole 3.1.2.

### Příprava roztoků standardů, pufrů a vzorku

Zásobní roztok standardů pro optimalizaci metody obsahující HE, DI, RU, TR, AA a vnitřní standard (IS, kyselinu skořicovou) byl připraven navážením každého analytu a rozpuštěním v DMSO na ultrazvukové lázni. Dále byl přidán methanol, roztok byl ochlazen na laboratorní teplotu a doplněn vodou po rysku. Výsledná koncentrace analytů v roztoku byla 0,25 mg/mL a poměr rozpouštědel 40% DMSO, 45% methanol, 15% voda. Po dobu optimalizace byl čerstvý roztok připravován každý čtvrtý den.

Zásobní roztoky analytů byly připraveny každý zvlášť rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (Tab. 22.) a zředěním na potřebnou koncentraci.

Tab. 22. Složení a koncentrace zásobních roztoků analytů.

Analyt	Rozpouštědlo	Koncentrace
HE	DMSO	2,5 mg/mL
DI	DMSO	2,5 mg/mL
RU	MeOH	2,5 mg/mL
TR	MeOH	2,5 mg/mL
AA	Voda	10,0 mg/mL
IS- SK	40% DMSO, 45% MeOH, 15% voda	1,0 mg/mL

Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků analytů. Nejdříve byl připraven koncentrovaný směsný roztok: 0,5 mg/mL (HE, DI, RU, TR) a 1 mg/mL AA, který byl ředěn roztokem rozpouštědel (40% DMSO, 45% MeOH, 15% voda) a zásobním roztokem IS na potřebné koncentrace jednotlivých bodů kalibrační přímky.

Základní elektrolyt byl připraven navážením odpovídajícího množství tetraboritanu sodného, jeho rozpuštěním na ultrazvukové lázni a ochlazením na laboratorní teplotu. Následně bylo přidáno odpovídající množství methanolu a upraveno pH\* na příslušnou hodnotu pomocí 0,5 M roztoku kyseliny borité. Dále pak byl výsledný roztok doplněn v odměrné baňce vodou po rysku.

Preparáty Askorutin tablety, Cilkanol tobolky (výrobce Zentiva, Česká Republika), Detralex tablety (výrobce Les Laboratoires Servier, Francie), Hemodin Prebio Forte tablety (výrobce Valosun a.s., Česká Republika) HemoStop ProBio tobolky (výrobce Simply you s.r.o., Česká Republika) byly zakoupeny v místní lékárně v Hradci Králové. Tablety či obsah tobolek byl zvážen, homogenizován a extrahován do DMSO na ultrazvukové lázni 15 minut. Dle obsahu analytů v přípravcích byly roztoky dále ředěny roztokem IS a rozpouštědly v poměru 40% DMSO, 45% MeOH, 15% voda, aby se dosáhlo koncentrací analytů v rozsahu kalibrační

křivky. Všechny vzorky před analýzou byly filtrovány membránovým filtrem 0,45  $\mu\text{m}$  a odplyněny na ultrazvukové lázni.

### 3.7.3 Výsledky a diskuze

#### 3.7.3.1 Optimalizace

##### 3.7.3.1.1 Pufr, pH, koncentrace borátu

S ohledem na charakter analytů (polyfenolické látky) a jejich schopnosti tvořit komplexy byl borátový pufr zkoušen jako jediný základní elektrolyt.

Vliv pH byl testován v rozsahu 8,0 až 9,8 (upraveno kyselinou boritou nebo hydroxidem sodným) při koncentraci tetraboritanu 40 mM. Při pH\* 8,0 až 8,5 prakticky nedocházelo k separaci analytů. Se zvyšujícím se pH se migrační časy analytů prodlužovaly a píky byly lépe odděleny. Při pH\* 9,8 byla již doba analýzy poměrně dlouhá a generovaný proud překročil 100  $\mu\text{A}$ . Optimální pH\* 9,5 bylo stanoveno jako kompromis mezi rozlišením, tvarem píků a celkovou délkou analýzy.

Vliv koncentrace borátu byl zkoumán v rozsahu 20 až 50 mM při pH\* 9,5. Změnou koncentrace byl nejvíce ovlivněn čas analýzy, který se se stoupající koncentrací prodlužoval, a rozlišení, které s vyšší koncentrací stoupalo. Jako optimální základní elektrolyt byl vybrán 40 mM borát, zajišťující nejlepší tvar píků a přijatelnou dobu analýzy.

##### 3.7.3.1.2 Aditiva

Byl hodnocen vliv organických rozpouštědel methanolu, ethanolu a acetonitrilu. Nižší obsahy ethanolu a acetonitrilu neměly na rozlišení píků podstatný vliv, vyšší obsahy ethanolu a acetonitrilu (nad 10%) nebylo možné použít kvůli problémům s rozpustností borátu. Při 10% přídavku methanolu píky HE a DI nebyly dokonale odděleny, při obsahu 25% methanolu již bylo rozlišení dostatečné. Při obsahu methanolu vyšším než 30% trvala analýza příliš dlouho, pík HE byl asymetrický a proud labilní.

Experimenty s neutrálními CD nebo SDS nepřinesly významné zlepšení separace.

##### 3.7.3.1.3 Napětí, teplota, nástřik a vlnová délka detekce

Vliv velikosti vloženého napětí byl studován v rozmezí 15 - 30 kV. Dle očekávání proběhla analýza nejrychleji při 30 kV (6 minut). Jako optimální byla zvolena hodnota 25 kV, kdy generovaný proud dosahoval 90  $\mu\text{A}$  a analýza trvala 8 minut.

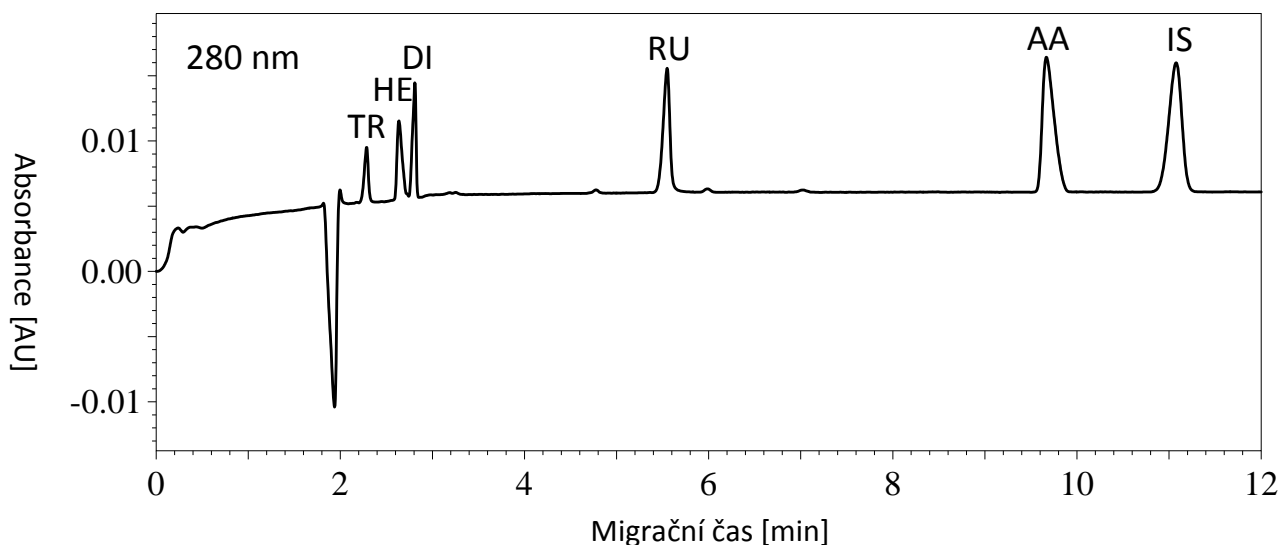
Vliv teploty na separaci byl zkoumán při 15, 20, 25 a 30°C. Při teplotě nad 30°C docházelo k deformaci píku HE a pod 25°C probíhala analýza příliš pomalu; teplota 25°C byla proto vybrána jako optimální.

Většina analytů vykazovala absorpční maximum při vlnových délkách kolem 200 nm. V této oblasti se také nachází absorpční maximum DMSO, který byl používán jako jedno

z rozpouštědel při zpracování vzorků. Při vlnové délce 200 nm intenzivní pík DMSO komigroval s píkem troxerutinu. Pro stanovení analytů byla proto vybrána vlnová délka 280 nm, kde absorbují všechny studované analyty a DMSO zde neabsorbuje.

Tab. 23. Shrnutí podmínek pro separaci citrusových flavonoidů, troxerutinu a kyseliny askorbové.

<b>Kapilára:</b>	50 $\mu\text{m}$ vnitřní průměr, 31,2 cm celková délka (21 cm efektivní), křemenná bez vnitřního potahu;
<b>Kondicionace:</b>	Nová kapilára 5 min MeOH, 20 min (1 M NaOH, voda), první/poslední mytí dne 10 min (1 M NaOH, 0,1 M NaOH, voda) tlak 1500 mbar, mezi analýzami 2 min 0,1 M NaOH, 2 min voda a 3 min pufr tlakem 1000 mbar;
<b>Separční pufr:</b>	40 mM tetraboritan sodný o pH* 9,5 (upraveno kyselinou boritou) s obsahem 10 % MeOH (v/v);
<b>Nástřík:</b>	Hydrodynamický: 50 mbar, 6 s;
<b>Detekce:</b>	Spektrofotometrická 280 nm;
<b>Napětí, proud:</b>	+ 25kV, 90 $\mu\text{A}$ ;
<b>CE systém:</b>	Beckman Coulter MDQ;
<b>Teplota:</b>	25°C;
<b>Vnitřní standard:</b>	Kyselina skořicová o koncentraci 0,1 mg/mL.



Obr. 33 Separace analytů za optimálních podmínek: pufr 40 mM tetraboritan sodný o pH\* 9,5 (upraveno kyselinou boritou) obsahující 10 % MeOH (v/v), napětí 25 kV; teplota 25°C; vlnová délka 280 nm; nástřík 50 mbar 6 s

### 3.7.3.2 Validace

Metoda byla validována dle ICH norem [115] a byla hodnocena linearita, limity kvantifikace a detekce, správnost a přesnost (opakovatelnost a intermediární přesnost migračních časů a korigovaných ploch píků).

## Linearita

Linearita metody byla ověřena změřením šestibodové kalibrační křivky (každý bod po třech nástřicích) v daném rozsahu (Tab. 24.). Kalibrační přímka byla vyhodnocena metodou lineární regrese v programu MS Excel jako závislost průměrů korigovaných ploch analytů vnitřním standardem (plocha analytu korigovaná migračním časem daného analytu v poměru k ploše vnitřního standardu korigované migračním časem vnitřního standardu) na koncentraci analytu.

Z výsledků uvedených v (Tab. 23.) vyplývá, že v daném rozsahu je metoda lineární o čemž svědčí i odpovídající korelační koeficienty.

Tab. 24. Lineární data a limity.

Analyt	Rozsah [mg/mL]	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOQ [mg/mL]	LOD [mg/mL]
TR	0,05-0,5	$y=4,2506x-0,0316$	0,9997	0,05	0,02
HE	0,05-0,5	$y=6,8836x-0,0378$	0,9996	0,05	0,02
DI	0,05-0,5	$y=5,9244x+0,0099$	0,9998	0,04	0,01
RU	0,05-0,5	$y=6,1827x+0,0024$	0,9995	0,06	0,02
AA	0,1-1,0	$y=9,6831x-0,4375$	0,9994	0,13	0,04

## Limity kvantifikace (LOQ) a detekce (LOD)

Limity byly vypočítány jako poměr signálu k šumu (**14**), kdy pro LOD platilo  $S/N=3$  a pro LOQ  $S/N=10$ . Dle Tab. 24. citlivost metody byla dostačující pro analýzu léčivých přípravků a potravinových doplňků.

## Přesnost

Přesnost migračních časů ( $t_m$ ) a korigovaných ploch píků (KP) byla prověřena šesti měřeními na jedné koncentrační úrovni (0,15 mg/mL HE, DI, RU, TR a 0,3 mg/mL AA) v rámci jednoho dne (opakovatelnost;  $n=6$ ) a v rámci třech po sobě jdoucích dnů (intermediární přesnost;  $n=18$ ). Opakovatelnost a intermediární přesnost byla vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka (% RSD) průměrných hodnot migračních časů či korigovaných ploch. Výsledky uvedené v Tab. 25. vykazují přijatelnou opakovatelnost a intermediární přesnost migračních časů a korigovaných ploch, neboť hodnoty RSD nepřekročily 5%.

Tab. 25. Opakovatelnost a intermediární přesnost.

Analyt	Opakovatelnost $t_m$ / KP (RSD %; $n=6$ )	Intermediární přesnost $t_m$ / KP (RSD %; $n=18$ )
TR	1,27 / 1,65	2,03 / 1,28
HE	1,08 / 0,72	2,36 / 0,75
DI	0,99 / 0,94	1,89 / 2,63
RU	1,54 / 1,49	3,56 / 1,07
AA	1,02 / 2,17	1,95 / 2,43

$t_m$  – migrační čas



KP – průměr poměrů korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu.

### 3.7.3.3 Analýza vzorků a správnost

Správnost metody byla ověřena metodou analýzy reálného vzorku s přidavkem standardu na jedné koncentrační úrovni a vyjádřena jako % recovery a jejich RSD (n=6). Výsledky všech hodnot recovery se nacházejí v intervalu  $100 \pm 5\%$  (kromě HE v Hemostopu ProBio) s  $RSD \leq 5\%$  (Tab. 26.).

Vzorky jednotlivých přípravků byly analyzovány šestkrát. Obsah analytů v tabletě/tobolce byl vyjádřen jako procento obsahu nalezeného v porovnání s obsahem deklarovaným výrobcem. Obsah analytů v přípravných korespondoval s hodnotami uvedenými výrobcem, žádný obsah analytu nebyl zjištěn nižší než 95% deklarované hodnoty. Jednotlivé elektroferogramy jsou znázorněny na Obr. 34.

Tab. 26. Správnost a výsledky analýzy farmaceutických přípravků a potravinových doplňků.

	Deklarovaný obsah [mg] <sup>a</sup>	Zjištěný obsah <sup>b</sup> [%] RSD %; n=6)	Přidáno <sup>c</sup> [µg/mL]	Nalezeno <sup>d</sup> [µg/mL]	Recovery [%] <sup>e</sup> (RSD %; n=6)
<b>Ascorutin tablety</b>					
RU	20	96,34 (0,57)	150,9	148,7	98,5 (0,60)
AA	100	98,95 (2,36)	780,5	771,6	98,9 (1,75)
<b>Cilkanol tobolky</b>					
TR	300	97,63 (2,74)	203,0	195,2	96,2 (1,58)
<b>Detralex tablety</b>					
DI	450	99,59 (2,80)	361,0	344,8	95,5 (4,29)
HE	50	95,79 (0,81)	356,2	353,0	99,1 (0,11)
<b>Hemodin Prebio Forte tablety</b>					
DI	225	98,56 (2,92)	330,6	318,8	96,5 (3,25)
HE	75	97,09 (4,44)	406,7	408,3	99,6 (1,48)
RU	40	96,45 (1,13)	251,9	251,3	99,8 (4,69)
AA	20	99,71 (2,32)	129,3	126,9	98,1 (4,06)
<b>Hemostop ProBio tobolky</b>					
DI	405	98,77 (3,12)	298,5	285,5	95,6 (1,15)
HE	45	98,10 (3,86)	322,7	312,8	97,0 (6,09)
RU	20	97,77 (1,01)	148,3	144,2	97,3 (0,45)
AA	107	101,60 (1,78)	765,1	739,0	96,6 (1,17)

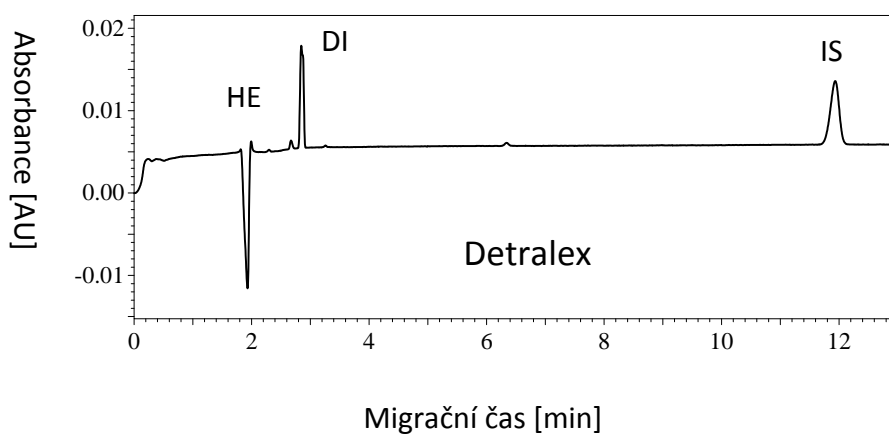
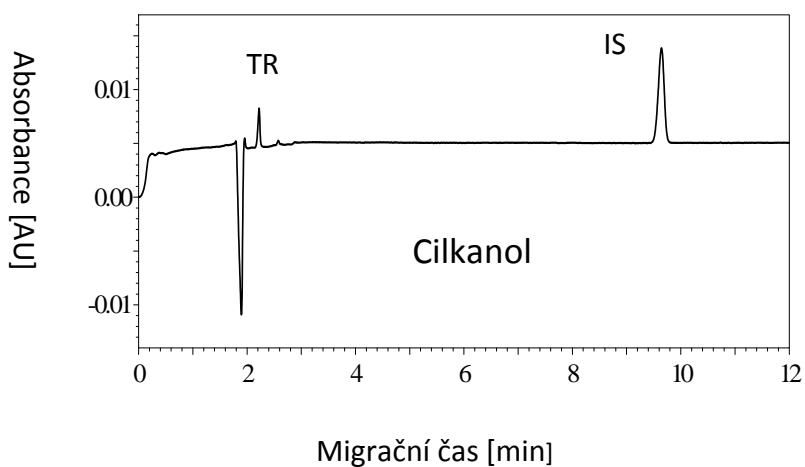
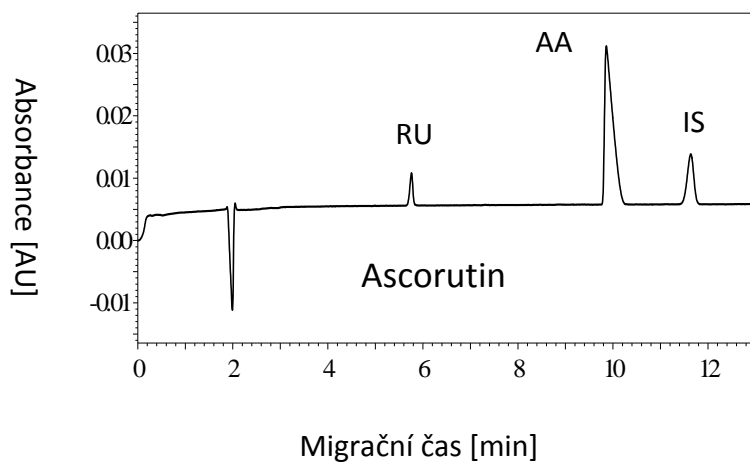
<sup>a</sup> Deklarovaný obsah účinné látky v jedné tabletě/tobolce;

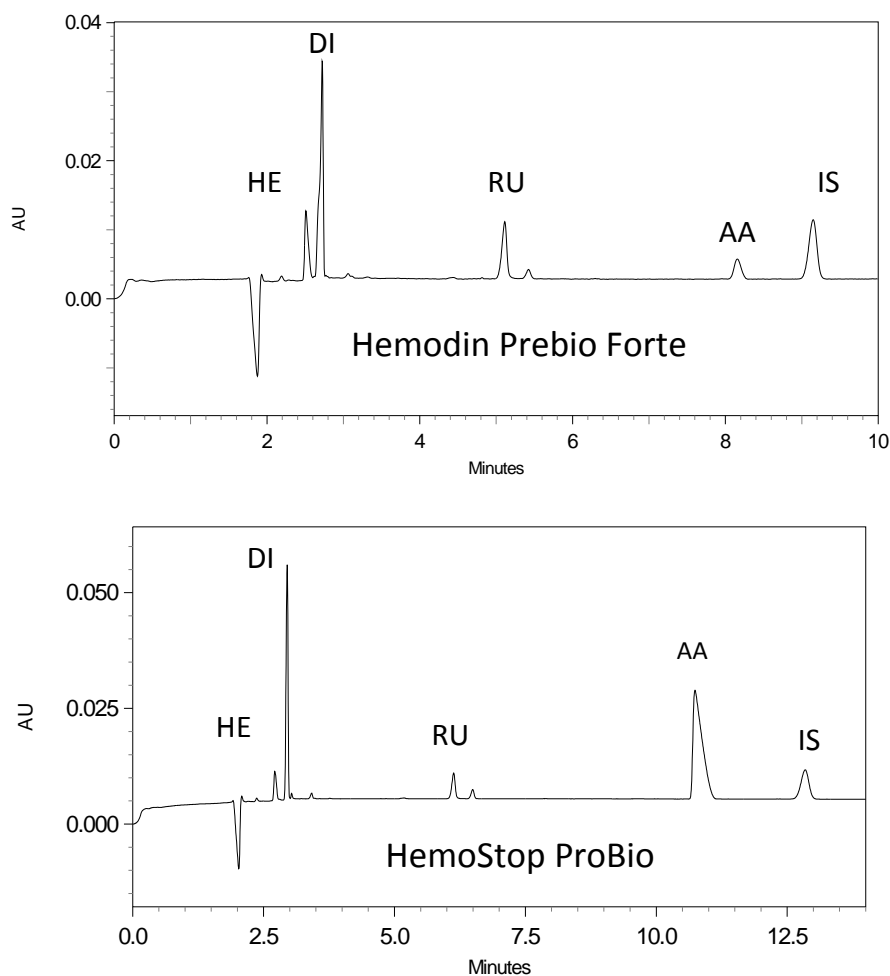
<sup>b</sup> Zjištěná hodnota vzhledem k deklarovanému obsahu (%);

<sup>c</sup> přidáno standardu [µg/mL];

<sup>d</sup> nalezeno přidaného standardu [µg/mL];

<sup>e</sup> Procenta nalezeno /přidáno.





Obr. 34 Elektroferogramy léčivých přípravků a potravinových doplňků. Podmínky separace: pufr 40 mM tetraboritan sodný o pH\* 9,5 (upraveno kyselinou boritou) a 10 % MeOH (v/v); napětí 25 kV; teplota 25°C; vlnová délka 280 nm; nástřik 50 mbar 6 s.

### 3.7.4 Závěr

V této práci byla vyvinuta elektroforetická metoda pro separaci, stanovení a kvantifikaci antioxidantů diosminu, hesperidinu, troxerutinu, rutinu a kyseliny askorbové v léčivých přípravcích (Askorutin, Cilkanol, Detralex) a potravinových doplňcích (Hemodin PreBio Forte, HemoStop ProBio) používaných při terapii žilních problémů, jako jsou varixy nebo hemeroidy. Metoda vykazovala dobrou linearitu, opakovatelnost migračních časů a korigovaných ploch, správnost a intermediární přesnost. Výsledky analýzy vzorků potvrdily shodu mezi naměřenými hodnotami a hodnotami deklarovanými výrobcem.

## 3.8 Experimentální část 4: Studium separace flavonoidů a fenolických kyselin s využitím tvorby komplexů s kovovými ionty a on-line zakoncentrováním analytů

Dosud nepublikováno

### 3.8.1 Cíl

Cílem této práce bylo aplikovat metodu zakoncentrování z velkého objemu vzorku na separaci modelové směsi polyfenolů (apigenin, hyperosid, kvercetin, luteolin, rutin) a fenolických kyselin (chlorogenová, *para*-kumarová a skořicová) za použití pufru obsahujícího wolfaramanové ionty jako komplexotvorné reagens a následně porovnat tuto metodu se současně vyvinutou stackingovou metodou založenou na využití borátového pufru, kde jako komplexotvorné reagens vystupuje boritan.

### 3.8.2 Materiál a metody

#### Instrumentace

Všechny separace probíhaly na CE systému Beckman Coulter MDQ (Fullerton, CA, USA) vybaveném detektorem s diodovým polem a software 32Karat (verze 5.0), pH pufrů bylo upravováno s využitím pH metru PHM 220 (Radiometer, Dánsko) s PHC2401-8 kombinovanou skleněnou elektrodou, která byla kalibrována pufrů o pH 4,00 a 10,00 (WTW, Weilheim, Německo). Před analýzou byly všechny roztoky odplyněny na ultrazvukové lázni Sonorex RK 31 (Německo). Byly použity křemenné vnitřně nepotažené kapiláry o 75  $\mu\text{m}$  ID, celkové délce 60,2 cm (efektivní délka 50 cm) zakoupené u C&M Scientific (Shiple, Velká Británie).

#### Elektroforetické postupy

Před prvním použitím byla nová kapilára kondicionována methanolem po dobu 5 minut při tlaku 2000 mbar, 1 M roztokem hydroxidu sodného (30 minut) a vodou (30 minut). Denně před prvním a po posledním použití byla kapilára promyta 1 M roztokem hydroxidu sodného a vodou (2 x 10 minut). Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára propláchnuta 0,1 M roztokem hydroxidu sodného (2 minuty), vodou (2 minuty) a separačním pufrům (3 minuty).

Dávkování vzorku bylo hydrodynamické, běžně při tlaku 50 mbar po dobu 6 s; dávkování velkého objemu vzorku bylo provedeno při tlaku 150 mbar po dobu 99 s.

## Chemikálie

Apigenin (API), kvercetin (Q), kyselina chlorogenová (CHLG), *para*-kumarová (p-KU), skořicová (SK), sorbová kyselina (IS) a rutin (RU) byly zakoupeny od firmy Aldrich (St. Luis, MO, USA); luteolin (LU) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko); hyperosid (HY) od firmy Roth (Karlsruhe, Německo). Ostatní chemikálie a složky pufrů jsou uvedeny v kapitole 3.1.2.

### Příprava roztoků standardů, pufrů a vzorku

Zásobní roztoky standardů o koncentraci 0,3 mg/mL každého analytu (API, HY, CHLG, LU, p-KU, Q, RU, SK) byly připraveny v methanolu. Roztok vnitřního standardu (IS, kyselina sorbová) o koncentraci 0,3 mg/mL byl připraven ve vodě.

Pro optimalizaci metod bez zakoncentrování byl ze zásobních roztoků připraven směsný roztok o koncentraci 7,5 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,75 µg/mL (p-KU, SK) tak, aby výsledný roztok obsahoval 25% methanolu. Při zakoncentrování byly koncentrace analytů 0,75 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,075 µg/ml (p-KU, SK) a směsný roztok také obsahoval 25% methanolu.

Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků vodným 25% methanolem v rozmezí koncentrací 0,5 – 3,0 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, p-KU, Q, RU, SK) a 0,075 – 3,0 µg/mL (p-KU, SK). Koncentrace IS v kalibračních roztocích byla vždy 1,0 µg/mL.

Byly připraveny dva základní elektrolyty. Příprava borátového pufru spočívala v navázení potřebného množství kyseliny borité, jejím rozpuštění ve vodě na ultrazvukové lázni, ochlazení na laboratorní teplotu, přidání příslušného množství methanolu a úpravě požadovaného pH\* přidávkem 1 M roztoku hydroxidu sodného. Příprava pufru s obsahem wolframanu představovala navázení vypočítaného množství HEPES, jeho rozpuštění ve 25 % vodném roztoku methanolu a v přidání zásobního vodného roztoku wolframanu sodného o příslušné koncentraci. pH\* bylo upraveno roztokem 0,2 M Tris na požadovanou hodnotu.

Všechny roztoky a pufrы byly před analýzou odplyněny na ultrazvukové lázni. Separační pufrы byly filtrovány přes nylonové membránové filtry (0,45 µm).

## 3.8.3 Výsledky a diskuze

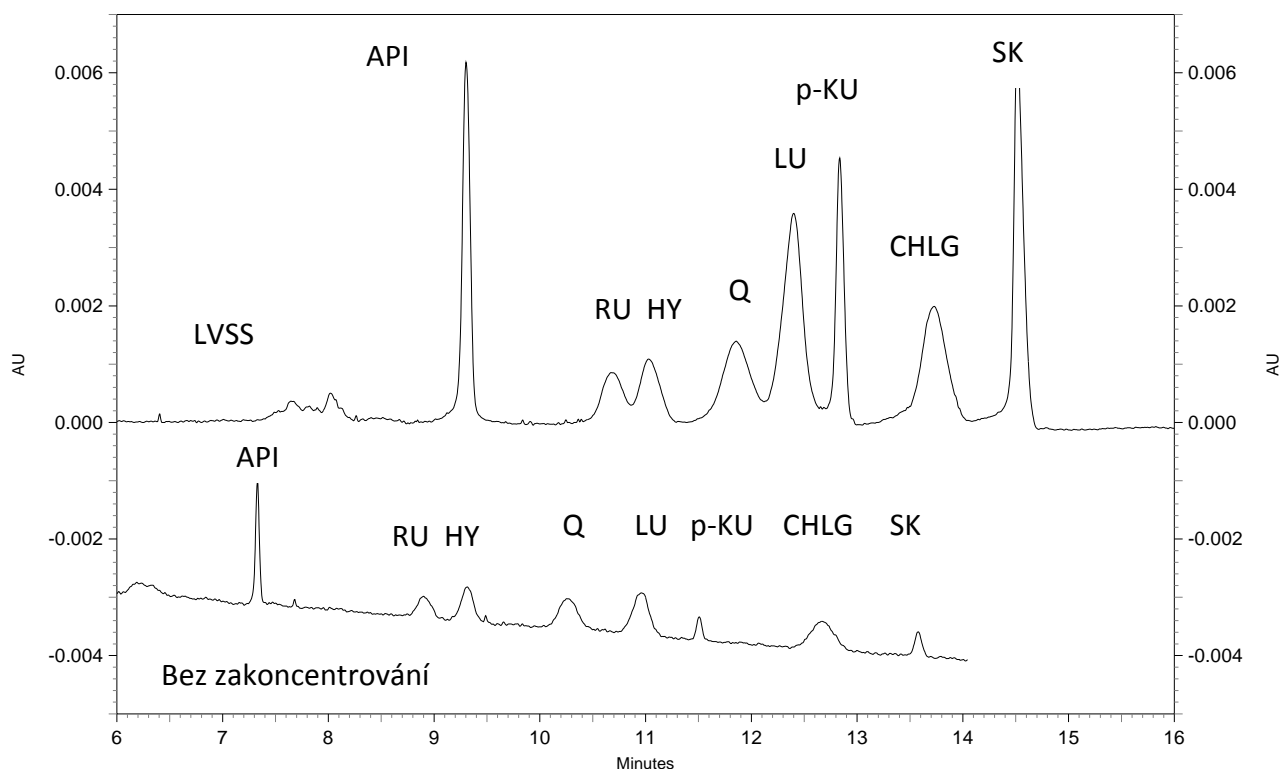
### 3.8.3.1 Optimalizace metody s wolframanem

Základ metody založené na použití wolframanu jako komplexotvorného činidla byl převzat z dřívější práce publikované na našem pracovišti [16]. Pro zavedení zakoncentrování z velkého objemu vzorku s obrácením polaritы bylo třeba nejdříve optimalizovat tlak a dobu nástřiku (100 - 200 mbar po dobu 99 s), následně pak separační napětí a to jak v kladném tak i v záporném módu ( $\pm 15 - 30$  kV). Určení času přepnutí bylo prováděno sledováním proudového záznamu. Po zavedení stackingu byl sledován vliv koncentrace wolframanu na separaci v rozmezí 0,0 – 15,0 mM, pH\* elektrolytu v rozmezí 7,0 - 8,0 a přidavek methanolu

0 – 30% (v/v) v pufru. Optimální podmínky, které byly nalezeny pro techniku stackingu byly podobné jako v naší dřívější práci [16] (Tab. 27.). Elektroferogram separace směsi flavonoidů a fenolických kyselin za optimálních podmínek je uveden na Obr. 35.

Tab. 27. Optimální podmínky metody se zakonzentrováním při použití wolframovaného pufru.

<b>Kapilára:</b>	75 $\mu\text{m}$ vnitřní průměr, 60,2 cm celková délka (50 cm efektivní délka), křemenná bez vnitřního potahu;
<b>Kondicionace:</b>	Nová kapilára: 5 min MeOH, 30 min 1 M NaOH a vodou. Denně před a po použití 10 min 1 M NaOH a vodou. Mezi analýzami 2 min 0,1 M NaOH, 2 min vodou a 3 min pufrům; Tlak 2000 mbar;
<b>Separační pufr:</b>	50mM <i>N</i> -(2-hydroxyetyl)-piperazin-2-(2-ethansulfonová kyselina) (HEPES), pH* 7,4 (Tris), 2,4 mM wolfram sodný, 25% MeOH (v/v);
<b>Nástřík:</b>	Hydrodynamický běžný 50 mbar 6 s, LVSS 150 mbar 99 s;
<b>Detekce:</b>	Spektrofotometrická 275 nm;
<b>Napětí, proud:</b>	$\pm 25$ kV LVSS/ 60 $\mu\text{A}$ ;
<b>CE systém:</b>	Beckman Coulter MDQ;
<b>Teplota:</b>	25°C;
<b>Vnitřní standard:</b>	Kyselina sorbová o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



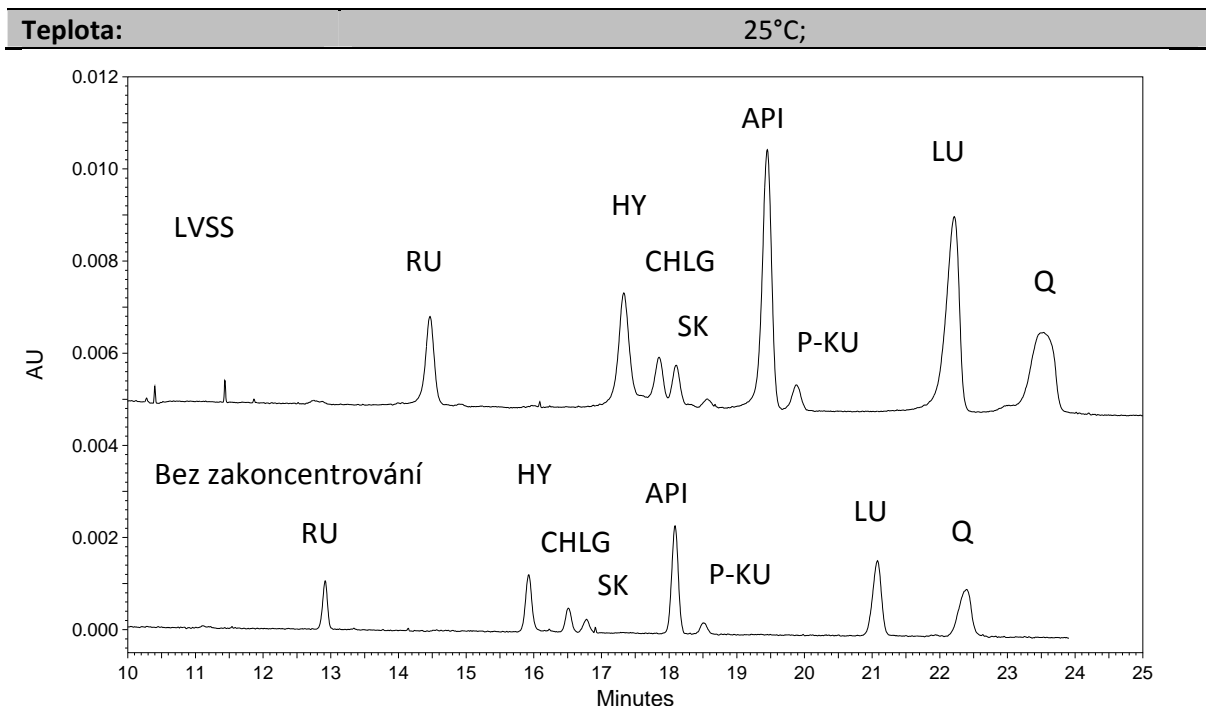
Obr. 35 Separace modelové směsi analytů bez zakoncentrování a se zakoncentrováním v pufru s přidavkem wolframanu. Podmínky: 50 mM HEPES, pH\* 7,4 (Tris), 2,4 mM wolframan sodný, 25% MeOH (v/v), 25 kV, 25°C, vlnová délka 275 nm. Koncentrace analytů bez zakoncentrování: 7,5 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,75 µg/mL (p-KU, SK) se zakoncentrováním: 0,75 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,075 µg/ml (p-KU, SK).

### 3.8.3.2 Optimalizace metody s borátovým pufrům

Metoda založená na použití borátu taktéž vycházela z již dříve publikované práce našeho pracoviště [116]. Při technice zakoncentrování z velkého objemu vzorku s přepnutím polarita byl optimalizován přidavek organického rozpouštědla methanolu (0 - 30%) a dávkování vzorku (100 - 200 mbar po dobu 99 s). Optimální podmínky metody založené na použití borátového pufru jsou shrnuty v Tab. 28., elektroferogram separace za daných podmínek je uveden na Obr. 36.

Tab. 28. Podmínky metody se zakoncentrováním při použití borátového pufru.

<b>Kapilára:</b>	75 µm vnitřní průměr, 60,2 cm celková délka (50 cm efektivní délka), křemenná bez vnitřního potahu;
<b>Kondicionace:</b>	Nová kapilára: 5 min MeOH, 30 min 1 M NaOH a vodou. Denně před a po použití 10 min 1 M NaOH a vodou. Mezi analýzami 2 min 0,1 M NaOH, 2 min vodou a 3 min pufrům; Tlak 2000 mbar;
<b>Separáčnı pufr:</b>	50mM kyselina boritá, pH*9 (upraveno 1 M NaOH), 10% MeOH (v/v);
<b>Nástřık:</b>	Hydrodynamickı běžnı 50 mbar 6 s, LVSS 150 mba, 99 s;
<b>Detekce:</b>	Spektrofotometrická 275 nm;
<b>Napětı, proud, polarita:</b>	± 25 kV LVSS/ 60 µA;
<b>CE systēm:</b>	Beckman Coulter MDQ;



Obr. 36 Separace modelové směsi analytů bez zakoncentrování a se zakoncentrováním v borátovém pufru. Podmínky: 50 mM kyselina boritá, pH\*9 (1 M NaOH), 10% MeOH (v/v), 25 kV, 25°C, vlnová délka 275 nm. Koncentrace analytů bez zakoncentrování: 7,5 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,75 µg/mL (p-KU, SK) se zakoncentrováním: 0,75 µg/mL (API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,075 µg/ml (p-KU, SK)

### 3.8.3.3 Validace

Metoda s wolframem v kombinaci s LVSS byla částečně validována. Byla testována linearita v daném rozsahu, opakovatelnost, intermediární přesnost, limity kvantifikace a detekce. Kalibrační křivky jednotlivých analytů se skládaly ze šesti bodů, z čehož jeden bod byl vypočítán jako průměr výsledků ze tří měření. Parametry kalibračních křivek jsou shrnuty v Tab. 29. Limit kvantifikace a detekce byl vypočítán jako poměr signálu k šumu (14) a následně experimentálně ověřen nástřikem vypočítané koncentrace. V rozsahu zkoumaných koncentrací metoda vykazuje jen průměrnou linearitu s korelačními koeficienty >0,99. Vysoké citlivosti bylo dosaženo především pro kyselinu *para*-kumarovou a skořicovou.

Tab. 29. Kalibrační parametry a limity detekce a kvantifikace.

	Rozsah [µg/ml]	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
API	0,5 – 3,0	$y = 0,1841x - 0,059$	0,9994	0,05	0,12
RU	0,5 – 3,0	$y = 0,0117x + 0,001$	0,9977	0,15	0,5
HY	0,5 – 3,0	$y = 0,0589x + 0,0038$	0,9948	0,09	0,3
Q	0,5 – 3,0	$y = 0,0175x + 0,0012$	0,9957	0,15	0,5
LU	0,5 – 3,0	$y = 0,0774x + 0,05$	0,9956	0,05	0,17
p-KU	0,075 - 3,0	$y = 0,0828x - 0,0125$	0,9934	0,01	0,031
CHLG	0,5 – 3,0	$y = 0,0372x + 0,0039$	0,9938	0,05	0,15
SK	0,075 - 3,0	$y = 0,18x - 0,0035$	0,9966	0,008	0,025



Opakovatelnost ploch píků a intermediární přesnost byly hodnoceny na jedné koncentrační úrovni 0,75 µg/mL (pro API, HY, CHLG, LU, Q, RU) a 0,075 µg/ml (pro p-KU, SK). Opakovatelnost byla hodnocena z šesti nástřiků roztoků standardů, intermediární přesnost z hodnot šesti nástřiků provedených ve třech po sobě následujících dnech. Zakoncentrování obecně nemělo dobrý vliv na opakovatelnost, většina hodnot opakovatelnosti plochy píků se nachází za hranicí 5% RSD (Tab. 30.).

Tab. 30. Opakovatelnost a intermediární přesnost.

	API	RU	HY	Q	LU	p-KU	CHLG	SK
<b>Opakovatelnost plochy píků: RSD [%]; (n=6)</b>	13,11	23,39	10,44	14,34	10,02	2,75	8,41	2,21
<b>Intermediární přesnost ploch píků: RSD [%]; (n=18)</b>	22,82	20,43	23,91	23,5	22,36	9,65	13,12	9,52

### 3.8.3.4 Aplikace na reálné vzorky

Metoda byla aplikována na analýzu propolisu (kapky i surový produkt) a čajů (heřmánek, lípa, zelený a černý čaj). Přestože některé analyty bylo možné identifikovat spikováním, vliv matrice na zakoncentrování byl značný a záznamy nebyly dostatečně přehledné. Jako východisko se nabízí přečištění vzorku vhodnou extrakční metodou.

### 3.8.3.5 Porovnání zakoncentrování v pufru s borátem a wolframem

Výsledky obou metod za optimálních separačních podmínek aplikovaných na modelovou směs standardů o koncentraci analytů se zakoncentrováním (0,75 µg/mL API, HY, CHLG, LU, Q, RU a 0,075 µg/ml p-KU, SK) a bez zakoncentrování (7,5 µg/mL API, HY, CHLG, LU, Q, RU a 0,75 µg/mL p-KU, SK) byly porovnány. Výsledné hodnoty faktorů zakoncentrování v Tab. 31. udávají poměr průměru ploch píků ze šesti nástřiků se zakoncentrováním a bez zakoncentrování v jednom separačním pufru pro každý analyt **(16)**.

$$\text{Faktor zakoncentrování analytu} = \frac{\text{průměr ploch píků analytu s LVSS (n=6)}}{\text{průměr ploch píků analytu bez LVSS (n=6)}} \quad (16)$$

Výsledky získané při použití borátového pufru ukazují u všech analytů podobné faktory zakoncentrování pohybující se kolem třiceti. Metoda s LVSS za daných podmínek separace v borátovém pufru je přibližně 300 krát citlivější než běžná metoda ve stejném pufru bez zakoncentrování. Při použití HEPES pufru s přídavkem wolframu se faktory zakoncentrování u jednotlivých analytů značně liší (Tab. 31.). K nejvyššímu zakoncentrování dochází u kyseliny skořicové a para-kumarové, kde se citlivost detekce zakoncentrováním zvýší až 2000 krát, pro kyselinu chlorogenovou, luteolin a apigenin vychází zvýšení citlivosti

přibližně 500 násobné. K nejnižšímu zakoncentrování dochází u hyperosidu, rutinu a kvercetinu, kde se citlivost zvýší přibližně 250 krát.

Tab. 31. Faktory zakoncentrování analytů pro borátový pufr a HEPES pufr s wolframanem.

Analyt	Borátový pufr	HEPES pufr s wolframanem
API	35	57
RU	32	26
HY	30	22
Q	29	31
LU	39	52
p-KU	29	177
CHLG	22	45
SK	28	222

### 3.8.4 Závěr

Byly optimalizovány dvě metody se zakoncentrováním založené na použití borátového pufru (s borátem jako komplexačním činidlem) a pufru obsahujícím wolframan jako komplexační činidlo pro separaci modelové směsi flavonoidů a fenolických kyselin. Obě metody byly porovnány s metodou bez zakoncentrování, aby se zjistil vliv komplexačního činidla na stupeň zakoncentrování. V metodě používající borátový pufr došlo k přibližně stejnému zvýšení citlivosti při užití stackingu pro všechny analyty. V metodě využívající wolframan jako komplexačního činidla se po aplikaci stackingu analyty zakoncentrovaly rozdílně.

## 4 Závěr

V rámci mé dizertační práce „Vývoj kapilárně elektroforetických metod pro analýzu biologicky aktivních látek s využitím tvorby komplexních sloučenin“ bylo vypracováno a publikováno review zabývající se využitím anorganických iontů jako komplexotvorných činidel pro zvyšování selektivity elektroforetických separací a dále byly vyvinuty čtyři metody s využitím spektrofotometrické detekce pro separaci látek z oblasti forezní (stanovení izomerů CPP v konfiskovaných tabletách), klinické (stanovení 8OHdG v moči), farmaceutické analýzy (stanovení citrusových flavonoidů, troxerutinu a kyseliny askorbové v léčivých přípravcích a potravinových doplňcích) a studie separace směsi flavonoidů a fenolických kyselin v prostředí borátového a wolframanového komplexačního činidla s on-line zakoncentrováním z velkého objemu vzorku s obrácením polarity. Navržené metody byly plně či částečně validovány a z větší části aplikovány na analýzu reálných vzorků (konfiskované tablety, léčivé přípravky/potravinové doplňky, moč). V rámci dizertační práce byl také řešen problém zvyšování citlivosti spektrofotometrické detekce pomocí cel s prodlouženou optickou dráhou v kombinaci se zakoncentrováním vzorku přímo v kapiláře a vhodnou úpravou biologického vzorku k analýze (stanovení 8OHdG v moči).

## 5 Seznam použité literatury

- [1] VESTERBERG, Olof. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*. 1993, roč. 14, č. 1, s. 1243-1249. ISSN 0173-0835.
- [2] LANDERS, James P. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2008, xxi, 1567 p., [6] p. of plates. ISBN 08-493-3329-6.
- [3] *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. Second completely revised edition. Henk H. Lauer a Gerard P. Rozing (ed.). Germany: Agilent Technologies, 2009. Č. publikace 5990-3777EN.
- [4] ŠTULÍK, Karel et al. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [5] MACKA, Miroslav a Paul R. HADDAD. Determination of metal ions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1997, roč. 18, 12-13, s. 2482-2501. ISSN 0173-0835.
- [6] PACAKOVA, Vera, Pavel COUFAL a Karel STULIK. Capillary electrophoresis of inorganic cations. *Journal of Chromatography A*. 1999, roč. 834, 1-2, s. 257-275. ISSN 00219673.
- [7] SIROKA, Jitka, Pavel JAC a Miroslav POLASEK. Use of inorganic, complex-forming ions for selectivity enhancement in capillary electrophoretic separation of organic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011, roč. 30, č. 1, s. 142-152. ISSN 01659936.
- [8] CHIARI, Marcella. Enhancement of selectivity in capillary electrophoretic separations of metals and ligands through complex formation. *Journal of Chromatography A*. 1998, roč. 805, 1-2, s. 1-15. ISSN 00219673.
- [9] POSPISILOVA, Marie, Miroslav POLASEK, Jiri SAFRA a Ivan PETRISKA. Determination of mannitol and sorbitol in infusion solutions by capillary zone electrophoresis using on-column complexation with borate and indirect spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, roč. 1143, 1-2, s. 258-263. ISSN 00219673.
- [10] HOFFSTETTER-KUHN, Sabrina., Aran. PAULUS, Ernst. GASSMANN a H. Michael. WIDMER. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1991, roč. 63, č. 15, s. 1541-1547. ISSN 0003-2700.
- [11] JAC, Pavel, Miroslav POLASEK, Marie POSPISILOVA a H. Michael. WIDMER. Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, roč. 40, č. 4, s. 805-814. ISSN 07317085.

- [12] VALLS, Josep, Silvia MILLAN, M. Pilar MARTI, Eva BORRAS a Lluís AROLA. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 2009, roč. 1216, č. 43, s. 7143-7172. ISSN 00219673.
- [13] HAUNSCHMIDT, Manuela, Wolfgang BUCHBERGER a Christian W. KLAMPFL. Investigations on the migration behaviour of purines and pyrimidines in capillary electromigration techniques with UV detection and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2008, roč. 1213, č. 1, s. 88-92. ISSN 00219673.
- [14] KODAMA, Shuji, Atsushi YAMAMOTO, Reiko IIO, Keiji SAKAMOTO, Akinobu MATSUNAGA a Kazuichi HAYAKAWA. Chiral ligand exchange capillary electrophoresis using borate anion as a central ion. *The Analyst*. 2004, roč. 129, č. 12, s. 1238-. ISSN 0003-2654.
- [15] KODAMA, Shuji, Sen-ichi AIZAWA, Atsushi TAGA, Tomohisa YAMASHITA a Atsushi YAMAMOTO. Chiral resolution of monosaccharides as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by ligand-exchange CE using borate anion as a central ion of the chiral selector. *ELECTROPHORESIS*. 2006, roč. 27, č. 23, s. 4730-4734. ISSN 01730835.
- [16] JAC, Pavel, Miroslav POLASEK, Ana I. V. BATISTA a Lenka KADEROVA. Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate. *ELECTROPHORESIS*. 2008, roč. 29, č. 4, s. 843-851. ISSN 01730835.
- [17] POLASEK, Miroslav, Ivan PETRISKA, Marie POSPISILOVA a Ludek JAHODAR. Use of molybdate as novel complex-forming selector in the analysis of polyhydric phenols by capillary zone electrophoresis. *Talanta*. 2006-03-15, roč. 69, č. 1, s. 192-198. ISSN 00399140.
- [18] SCHNEIDERMAN, Eva a Apryll M. STALCUP. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, roč. 745, č. 1, s. 83-102. ISSN 03784347.
- [19] FANALI, Salvatore. Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion complexation. *Journal of Chromatography A*. 1997, roč. 792, 1-2, s. 227-267. ISSN 00219673.
- [20] URBANEK, Marek, Ludmila KRIVANKOVA a Petr BOCEK. Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures. *ELECTROPHORESIS*. roč. 24, č. 3, s. 466-485. ISSN 01730835.
- [21] HORAKOVA, Jana, Vaclav MAIER, Jaroslav SEVCIK. On-line preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *Chemické Listy*. 2006, roč. 100, 163-168. ISSN 0009-2770.
- [22] DE BOER, Douwe, Ingrid J BOSMAN, Elod HIDVEGI, Carmo MANZONI, Andres A BENKO, Lourenco J.A.L DOS REYS a Robert A.A MAES. Piperazine-like compounds: a new group of

designer drugs-of-abuse on the European market. *Forensic Science International*. 2001, roč. 121, 1-2, s. 47-56. ISSN 03790738.

[23] VERDONK, M. L., J. W. VOOGD, J. A. KANTERS, J. KROON, R. DEN BESTEN, L. BRANDSMA, D. LEYSEN a J. KELDER. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*. 1997, roč. 53, č. 6. ISSN 0108-7681.

[24] ROTHMAN, Richard B a Michael H BAUMANN. Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates. *Pharmacology*. 2002, roč. 95, č. 1, s. 73-88. ISSN 01637258.

[25] BOSSONG, M., J. VAN DIJK a R. NIESINK. Methylone and mCPP, two new drugs of abuse?. *Addiction Biology*. 2005, roč. 10, č. 4, s. 321-323. ISSN 1355-6215.

[26] *The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Annex 1* Technical information on mCPP; (emcdda.europa.eu).

[27] NIKOLOVA, Irina, Nicolai, DANCHEV. Piperazine based substances of abuse: A new party pills on Bulgarian drug market. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2008, roč. 22, 652-655. ISSN 1310-2818.

[28] KOVALEVA, Julia, Elke Devuyt IR, Peter De PAEPE a Alain VERSTRAETE. Acute Chlorophenylpiperazine Overdose: A Case Report and Review of the Literature. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2008, roč. 30, č. 3, s. 394-398. ISSN 0163-4356.

[29] BOSSONG, M., T. BRUNT, J. VAN DIJK, S. RIGTER, J. HOEK, H. GOLDSCHMIDT a R. NIESINK. MCPP: an undesired addition to the ecstasy market. *Journal of Psychopharmacology*. 2010-08-26, roč. 24, č. 9, s. 1395-1401. ISSN 0269-8811.

[30] BAUMANN, Michael H, Robert D CLARK, Allison G BUDZYNSKI, John S PARTILLA, Bruce E BLOUGH a Richard B ROTHMAN. N-Substituted Piperazines Abused by Humans Mimic the Molecular Mechanism of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*. 2004-10-20, roč. 30, č. 3, s. 550-560. ISSN 0893-133x.

[31] SCHURENKAMP, Jennifer, Justus BEIKE, Heidi PFEIFFER a Helga KOHLER. Separation of positional CPP isomers by chiral HPLC-DAD of seized tablets. *International Journal of Legal Medicine*. 2011, roč. 125, č. 1, s. 95-99. ISSN 0937-9827.

[32] PUTZ, Martin. Application of CE-ESI-MS in forensic toxicology: Identification of piperazinederived designer drugs in Ecstasy tablets and of food colorants in illicit drugs. In: *Application of CE-ESI-MS in forensic toxicology: Identification of piperazinederived designer drugs in Ecstasy tablets and of food colorants in illicit drugs*. In: Pragst F, Aderjan R (ed) XV. GTFCh-Symposium 2007 Aktuelle Beiträge zur Forensischen und Klinischen Toxikologie, Bad Vibel, roč. 2008, s. 487-501.

[33] CACCIA, S., M. BALLABIO, R. FANELLI, G. GUIISO a M.G. ZANINI. Determination of plasma and brain concentrations of trazodone and its metabolite, l-m-chlorophenylpiperazine, by

gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1981, roč. 210, č. 2, s. 311-318. ISSN 00219673.

[34] SMITH, T. Trazodone and m-chlorophenylpiperazine Concentration in brain and receptor activity in regions in the brain associated with anxiety. *Neuropharmacology*. 1985, roč. 24, č. 11, s. 1067-1071. ISSN 00283908.

[35] MILLER, Ronald L. a C. Lindsay DEVANE. Analysis of trazodone and m-chlorophenylpiperazine in plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1986, roč. 374, s. 388-393. ISSN 03784347.

[36] ANDRIOLLO, O., C. LARTIGUE-MATTEI, J.L. CHABARD, M.J. GALMIER, H. BARGNOUX, J. PETIT, J.A. BERGER a J.F. POGNAT. Assay of m-chlorophenylpiperazine in plasma and brain of rat by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1990, roč. 533, s. 215-223. ISSN 03784347.

[37] SUCKOW, Raymond F., Thomas B. COOPER a Rene S. KAHN. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of plasma m-chlorophenylpiperazine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1990, roč. 528, s. 228-234. ISSN 03784347.

[38] MERCOLINI, Laura, Carolina COLLIVA, Mario AMORE, Salvatore FANALI a Maria Augusta RAGGI. HPLC analysis of the antidepressant trazodone and its main metabolite m-CPP in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, roč. 47, 4-5, s. 882-887. ISSN 07317085.

[39] OTANI, Koichi, Kazuo MIHARA, Norio YASUI, Masayuki ISHIDA, Tsuyoshi KONDO, Noboru TOKINAGA, Tadashi OHKUBO, Takako OSANAI, Kazunobu SUGAWARA a Sunao KANEKO. Plasma concentrations of trazodone and m-chlorophenylpiperazine at steady state can be predicted from those after an initial dose of trazodone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 1997, roč. 21, č. 1, s. 239-244. ISSN 02785846.

[40] HOLLAND, Mary L. a Edward T. HEEBNER. High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for the determination of etoperidone and two active metabolites, 5-(1-hydroxyethyl)etoperidone and 1-(3-chlorophenyl)piperazine, in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1991, roč. 567, č. 2, s. 433-440. ISSN 03784347.

[41] FRANC, J.E., G.F. DUNCAN, R.H. FARMEN a K.A. PITTMAN. High-performance liquid chromatographic method for the determination of nefazodone and its metabolites in human plasma using laboratory robotics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1991, roč. 570, č. 1, s. 129-138. ISSN 03784347.

- [42] PATEL, Bhavin N., Naveen SHARMA, Mallika SANYAL a Pranav S. SHRIVASTAV. High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008, roč. 871, č. 1, s. 44-54. ISSN 15700232.
- [43] VATASSERY, Govind T., Lori A. HOLDEN, Dana K. HAZEL a Maurice W. DYSKEN. Determination of trazodone and its metabolite, 1-m-Chlorophenyl-piperazine, in human plasma and red blood cell samples by HPLC. *Clinical Biochemistry*. 1997, roč. 30, č. 2, s. 149-153. ISSN 00099120.
- [44] DODD, Seetal, Anne BUIST, Graham D BURROWS, Kay P MAGUIRE a Trevor R NORMAN. Determination of nefazodone and its pharmacologically active metabolites in human blood plasma and breast milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999, roč. 730, č. 2, s. 249-255. ISSN 03784347.
- [45] WOHLFARTH, Ariane, Wolfgang WEINMANN a Sebastian DRESEN. LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, roč. 396, č. 7, s. 2403-2414. ISSN 1618-2642.
- [46] PICHINI, Simona, Mitona PUJADAS, Emilia MARCHEI, Manuela PELLEGRINI, Jimena FIZ, Roberta PACIFICI, Piergiorgio ZUCCARO, Magi FARRE a Rafael DE LA TORRE. Liquid chromatography atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry determination of hallucinogenic designer drugs in urine of consumers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, roč. 47, č. 2, s. 335-342. ISSN 07317085.
- [47] PETERS, Frank T., Simone SCHAEFER, Roland F. STAACK, Thomas KRAEMER a Hans H. MAURER. Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2003, roč. 38, č. 6, s. 659-676. ISSN 1076-5174.
- [48] DICKSON, Amber J., Shawn P VORCE, Justin M HOLLER, Timothy P Lyons. Detection of 1-Benzylpiperazine, 1-(3-Trifluoromethylphenyl)-piperazine, and 1-(3-chlorophenyl)-piperazine in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Positive Urine Samples, *Journal of Analytical Toxicology*. 2010, roč. 34, s. 464-469. ISSN 0146-4760.
- [49] BARROSO, M., S. COSTA, M. DIAS, D.N. VIEIRA, J.A. QUEIROZ a M. LOPEZ-RIVADULLA. Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, č. 40, s. 6274-6280. ISSN 00219673.
- [50] KAUPPILA, Tiina J., Anu FLINK, Markus HAAPALA, Ulla-Maija LAAKKONEN, Laura AALBERG, Raimo A. KETOLA a Risto KOSTIAINEN. Desorption atmospheric pressure



photoionization mass spectrometry in routine analysis of confiscated drugs. *Forensic Science International*. 2011, roč. 210, 1-3, s. 206-212. ISSN 03790738.

[51] VALAVANIDIS, ATHANASIOS, THOMAS VLACHOGIANNI a CONSTANTINOS FIOTAKIS. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2009, roč. 27, č. 2, s. 120-139. ISSN 1059-0501.

[52] KASAI, Hiroshi a Susumu NISHIMURA. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research*. 1984, roč. 12, č. 4, s. 2137-2145. ISSN 0305-1048.

[53] BJELLAND, S. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003-10-29, roč. 531, 1-2, s. 37-80. ISSN 00275107.

[54] AMES, Bruce N. Endogenous Oxidative DNA Damage, Aging, and Cancer. *Free Radical Research*. 1989, roč. 7, 3-6, s. 121-128. ISSN 1071-5762.

[55] CHENG, K. C., CAHILL, D. S., KASAI, H., NISHIMURA, S., LOEB, L. A., 8-Hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage, Causes G - T and A - C Substitutions. *Journal of Biological Chemistry* 1992, 267, 166-172.

[56] HALLIWELL, Barry a Matthew WHITEMAN. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 2004, roč. 142, č. 2, s. 231-255. ISSN 00071188.

[57] GERMADNIK, D., A. PILGER a H.W. RUDIGER. Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, roč. 689, č. 2, s. 399-403. ISSN 03784347.

[58] YAO, Q. Determination of urinary oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the association with cigarette smoking. *Talanta*. 2004-06-17, roč. 63, č. 3, s. 617-623. ISSN 00399140.

[59] KVASNICOVA, Vladimira, Eva SAMCOVA, Alice JURSOVA a Ivan JELINEK. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in untreated urine by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2003, roč. 985, 1-2, s. 513-517. ISSN 00219673.

[60] TUMA, P, E SAMCOVA a V KVASNICOVA. Improved detection limit for a direct determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in untreated urine samples by capillary electrophoresis with optical detection. *Journal of Chromatography B*. 2004-12-25, roč. 813, 1-2, s. 255-261. ISSN 15700232.

- [61] PEOPLES, Michael C. a H. THOMAS KARNES. Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds. *Journal of Chromatography B*. 2005-11-15, roč. 827, č. 1, s. 5-15. ISSN 15700232.
- [62] LIN, Hai-Shu, Andrew, JENNER, Choon Nam, ONG, Shan Hong HUANG, Matthew WHITEMAN a Barry HALLIWELL. A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochemical Journal*. roč. 380, č. 2, s. 541-. ISSN 02646021.
- [63] LI, Tian-Hua, Wen-Li JIA, Huai-Sheng WANG a Ren-Min LIU. Electrochemical performance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its detection at poly(3-methylthiophene) modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, roč. 22, č. 7, s. 1245-1250. ISSN 09565663.
- [64] ZITKA, Ondrej, Sona KRIZKOVA, Ludmila KREJCOVA, David HYNEK, Jaromir GUMULEC, Michal MASARIK, Jiri SOCHOR, Vojtech ADAM, Jaromir HUBALEK, Libuse TRNKOVA a Rene KIZEK. Microfluidic tool based on the antibody-modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients. *ELECTROPHORESIS*. 2011, roč. 32, č. 22, s. 3207-3220. ISSN 01730835.
- [65] WEISS, D. J., LUNTE, C. E. Detection of urinary biomarker for oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* 2000, roč. 21, s. 2080-2085. ISSN 0173-0835.
- [66] MEI, Surong, Guwang XU a Caiying WU. ANALYSIS OF URINARY 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND SOLID-PHASE EXTRACTION. *Analytical Letters*. 2001-08-31, roč. 34, č. 12, s. 2063-2076. ISSN 0003-2719.
- [67] MEI, S. R., CAI, L. S., YAO, Q. H., XING, J., XU, G. W., WU, C. Y. Capillary electrophoresis with end-column amperometric detection of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine of cancer patients. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese* 2003, roč. 24, s. 1987-1989. ISSN 0251-0790.
- [68] XU, G.W., Q.H. YAO, Q.F. WENG, B.L. SU, X. ZHANG a J.H. XIONG. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004, roč. 36, č. 1, s. 101-104. ISSN 07317085.
- [69] MEI, Surong, Qinghong YAO, Caiying WU a Guowang XU. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches capillary electrophoresis and GC/MS: An assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Journal of Chromatography B*. 2005-11-15, roč. 827, č. 1, s. 83-87. ISSN 15700232.

[70] ZHANG, Shao Wen, Cun Jie ZOU, Nan LUO, Qian Feng WENG, Ling Shuang CAI, Cai Ying WU a Jun XING. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with molecularly imprinted monolith in-tube solid phase microextraction. *Chinese Chemical Letters*. 2010, roč. 21, č. 1, s. 85-88. ISSN 10018417.

[71] LI, Meng-Jie, Jun-Bo ZHANG, Wen-Li LI, Qing-Cui CHU a Jian-Nong YE. Capillary electrophoretic determination of DNA damage markers: Content of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-nitroguanine in urine. *Journal of Chromatography B*. 2011, roč. 879, č. 32, s. 3818-3822. ISSN 15700232.

[72] SERDAR, Muhittin, Erdim SERTOGLU, Metin UYANIK, Serkan TAPAN, Kadir AKIN, Cumhuri BILGI a Ismail KURT. Comparison of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy. *Free Radical Research*. 2012, roč. 46, č. 10, s. 1291-1295. ISSN 1071-5762.

[73] HOSOZUMI, Chiemi, Akira TORIBA, Thanyarat CHUESAARD, Takayuki KAMEDA, Ning TANG a Kazuichi HAYAKAWA. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2012, 893-894, s. 173-176. ISSN 15700232.

[74] WANG, Chien-Jen, Ning-Hsiang YANG, Chia-Chi CHANG, Saou-Hsing LIOU a Hui-Ling LEE. Rapid and simple one-step membrane extraction for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human plasma by a combination of on-line solid phase extraction and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2011, roč. 879, č. 30, s. 3538-3543. ISSN 15700232.

[75] HSU, Wei-Yi, Wei-De LIN, Yuhsin TSAI, Chiung-Tsung LIN, Hwei-Chung WANG, Long-Bin JENG, Ching-Chih LEE, Yu-Chiang LIN, Chien-Chen LAI a Fuu-Jen TSAI. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human breast cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2011, roč. 412, 19-20, s. 1861-1866. ISSN 00098981.

[76] WU, Jin-Zhu a Paul C. HO. Comparing the Relative Oxidative DNA Damage Caused by Various Arsenic Species by Quantifying Urinary Levels of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine with Isotope-Dilution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Pharmaceutical Research*. 2009, roč. 26, č. 6, s. 1525-1533. ISSN 0724-8741.

[77] HSU, Wei-Yi, William Tzu-Liang CHEN, Wei-De LIN, Fuu-Jen TSAI, Yuhsin TSAI, Ching-Tsung LIN, Wan-Yu LO, Long-Bin JENG a Chien-Chen LAI. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2009, roč. 402, 1-2, s. 31-37. ISSN 00098981.

- [78] MATAYATSUK, Chutima, Prapin WILAIRAT. Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress in thalassemic patients using HPLC with an electrochemical detector. *Journal of Analytical Chemistry*. 2008, roč. 63, s. 52-56. ISSN 1061-9348.
- [79] CROW, Brian, Michael BISHOP, Kasey KOVALCIK, Dean NORTON, Joe GEORGE a J. Alexander BRALLEY. A simple and cost effective method for the quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2008, roč. 22, č. 4, s. 394-401. ISSN 02693879.
- [80] GUTIERREZ, Alejandro, Soraya OSEGUEDA, Silvia GUTIERREZ-GRANADOS, Alejandro ALATORRE, M. Guadalupe GARCIA a Luisa A. GODENEZ. Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes. *Electroanalysis*. 2008, roč. 20, č. 21, s. 2294-2300. ISSN 10400397.
- [81] SABATINI, Laura, Anna BARBIERI, Marco TOSI, Aldo RODA a Francesco Saverio VIOLANTE. A method for routine quantitation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on solid-phase extraction and micro-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005-01-30, roč. 19, č. 2, s. 147-152. ISSN 0951-4198.
- [82] HU, Chiung-Wen, Ming-Tsang WU, Mu-Rong CHAO, Chih-Hong PAN, Chien-Jen WANG, James A. SWENBERG a Kuen-Yuh WU. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004-02-29, roč. 18, č. 4, s. 505-510. ISSN 0951-4198.
- [83] PIETTA, P.G., P. SIMONETTI, C. GARDANA, S. CRISTONI, L. BRAMATI a P.L. MAURI. LC-APCI-MS/MS analysis of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, roč. 32, 4-5, s. 657-661. ISSN 07317085.
- [84] PILGER, A, S IVANCSITS, D GERMADNIK a H.W RUDIGER. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2002, roč. 778, 1-2, s. 393-401. ISSN 15700232.
- [85] MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, roč. 79, s. 727-747. ISSN 0002-9165.
- [86] PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000, roč. 63, č. 7, s. 1035-1042. ISSN 0163-3864.
- [87] HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology*. 2002, roč. 96, 2-3, s. 67-202. ISSN 01637258.

- [88] RICE-EVANS, Catherine, Nicholas MILLER a George PAGANGA. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 1997, roč. 2, č. 4, s. 152-159. ISSN 13601385.
- [89] COWAN M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, roč. 12, 564-+. ISSN 0893-8512.
- [90] BENAVENTE-GARCIA, Obdulio, Julian CASTILLO, Francisco R. MARIN, Ana ORTUNO a Jose A. DEL RIO. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, roč. 45, č. 12, s. 4505-4515. ISSN 0021-8561.
- [91] MIDDLETON E., KANDASWANI C., THEOHARIDES T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000, roč. 52, s. 673-751. ISSN 0031-6997.
- [92] BENAVENTE-GARCIA, O. a J. CASTILLO. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, roč. 56, č. 15, s. 6185-6205. ISSN 0021-8561.
- [93] TRIPOLI, Elisa, Maurizio La GUARDIA, Santo GIAMMANCO, Danila Di MAJO a Marco GIAMMANCO. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*. 2007, roč. 104, č. 2, s. 466-479. ISSN 03088146.
- [94] GARG, A., S. GARG, L. J. D. ZANEVELD a A. K. SINGLA. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 2001, roč. 15, č. 8, s. 655-669. ISSN 0951-418x.
- [95] HODGSON, Jonathan M a Kevin D CROFT. Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, roč. 86, č. 15, s. 2492-2498. ISSN 00225142.
- [96] GARDNER, Peter T., Tamsin A.C. WHITE, Donald B. MCPHAIL a Garry G. DUTHIE. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*. 2000, roč. 68, č. 4, s. 471-474. ISSN 03088146.
- [97] GONZALEZ, Evangelina A. a Monica A. NAZARENO. Antiradical action of flavonoid ascorbate mixtures. *LWT - Food Science and Technology*. 2011, roč. 44, č. 2, s. 558-564. ISSN 00236438.
- [98] HE, Dongxiu, Yang SHAN, Yuehui WU, Guozhu LIU, Bo CHEN a Shouzhuo YAO. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD ESI/MS. *Food Chemistry*. 2011, roč. 127, č. 2, s. 880-885. ISSN 03088146.
- [99] LONDONO-LONDONO, Julian, Venia Rodrigues de LIMA, Oscar LARA, Andres GIL, Tenia Beatriz Crecsynski PASA, Gabriel Jaime ARANGO a Jose R. Ramirez PINEDA. Clean recovery of

antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*. 2010, roč. 119, č. 1, s. 81-87. ISSN 03088146.

[100] CUI, Xiangyong, Mengliang ZHANG, Xin GUAN, Lei YIN, Yantong SUN, J. Paul FAWCETT a Jingkai GU. LC/MS/MS Determination of Troxerutin in Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*. 2011, roč. 73, 1-2, s. 165-169. ISSN 0009-5893.

[101] BARANOWSKA, Irena a Sylwia MAGIERA. Analysis of isoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC. 2011, roč. 399, č. 9, s. 3211-3219. ISSN 1618-2642.

[102] EL-SHAFAE, Azza M a Maher M EL-DOMIATY. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, roč. 26, č. 4, s. 539-545. ISSN 07317085.

[103] ANG, Gong-Jun, Ping LIU, Xi-Long QU, Min-Juan XU, Qi-Shu QU, Cheng-Yin WANG, Xiao-Ya HU a Zhi-Yue WANG. The simultaneous separation and determination of six flavonoids and troxerutin in rat urine and chicken plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet/visible detection. *Journal of Chromatography B*. 2007, roč. 856, 1-2, s. 222-228. ISSN 15700232.

[104] PENG, Youyuan, Fanghua LIU a Jiannong YE. Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2006, roč. 830, č. 2, s. 224-230. ISSN 15700232.

[105] WU, Ting, Yueqing GUAN a Jiannong YE. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*. 2007, roč. 100, č. 4, s. 1573-1579. ISSN 03088146.

[106] CHEN, Gang, Luyan ZHANG, Jiequan ZHAO a Jiannong YE. Determination of hesperidin and synephrine in *Pericarpium Citri Reticulatae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002-6-1, roč. 373, č. 3, s. 169-173. ISSN 1618-2642.

[107] PERES, Renato G., Gustavo A. MICKE, Marina F. M. TAVARES a Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA. Multivariant optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. *Journal of Separation Science*. 2009, roč. 32, č. 21, s. 3822-3828. ISSN 16159306.

[108] ZHAO, S. G., X. G. CHEN a Z. D. HU. Determination of hesperidin and naringin by micellar electrokinetic chromatography using a new recording mode. *Chromatographia*. 2003, roč. 57, 9-10, s. 593-598. ISSN 0009-5893.

- [109] GEORGAKOPOULOS, Constantine D., Fotini N. LAMARI, Ioanna N. KARATHANASOPOULOU, Vassiliki S. GARTAGANIS, Nikolaos M. PHARMAKAKIS a Nikos K. KARAMANOS. Tear analysis of ascorbic acid, uric acid and malondialdehyde with capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*. 2009, n/a-n/a. ISSN 02693879.
- [110] EL-HADY, Deia Abd, Roberto GOTTE a Nagwa Abo EL-MAALI. Selective determination of catechin, epicatechin and ascorbic acid in human urine using chiral capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2008, roč. 31, č. 12, s. 2252-2259. ISSN 16159306.
- [111] RICE-EVANS, Catherine A., Nicholas J. MILLER a George PAGANGA. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, roč. 20, č. 7, s. 933-956. ISSN 08915849.
- [112] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
- [113] *The United States Pharmacopoeia and The National Formulary 2009*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2008. ISBN 978-188-9788-692.
- [114] Guidance for industry. Bioanalytical method validation. FDA, CDER and CVM. ([www.fda.gov/downloads/Drugs/RegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/RegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf)).
- [115] International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Q2(R1). *Federal Register*. 1997 (62) 96, 27463-7.
- [116] HONEGR, Jan, Jiri SAFRA, Miroslav POLASEK a Marie POSPISILOVA. Large-Volume Sample Stacking with Polarity Switching in CE for Determination of Natural Polyphenols in Plant Extracts. *Chromatographia*. 2010, roč. 72, 9-10, s. 885-891. ISSN 0009-5893.

## 6 Přehled prací zahrnutých do dizertační práce

### 6.1 Odborné články

#### Příloha I

Jitka Široká, Pavel Jáč, Miroslav Polášek

Use of inorganic, complex-forming ions for selectivity enhancement in capillary electrophoretic separation of organic compounds

TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, 2011, Vol.:30, p.: 142-152.

**Impakt faktor: 6.273**

#### Příloha II

Jitka Široká, Andrea Martincová, Marie Pospíšilová, Miroslav Polášek

Assay of Citrus Flavonoids, Troxerutin, and Ascorbic Acid in Food Supplements and Pharmaceuticals by Capillary Zone Electrophoresis

FOOD ANALYTICAL METHODS, 2013. DOI 10.1007/s12161-013-9573-0

**Impakt faktor: 1.94**

### 6.2 Přednášky a postery prezentované na konferencích

#### 6.2.1 Přednáška

Jitka Široká., José Luiz da Costa, Marina F. M. Tavares, Miroslav Polášek:

"Separation and determination of chlorophenylpiperazine (ortho, meta, para) isomers in confiscated tablets by capillary electrophoresis"; 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy; Hradec Králové, Česká Republika, 31.1.- 1.2.2012.



## 6.2.2 Postery

Jitka Šíroká, Pavel Jáč, Miroslav Polášek: „Využití tvorby komplexů s kovovými ionty ke zvýšení selektivity v kapilární zónové elektroforéze“; Syntéza a analýza léčiv (SAL 2009), Hradec Králové, Česká Republika, 14.- 16.9. 2009. Poster č. P-87.

Jitka Šíroká, Klára Petrů, Pavel Jáč, Miroslav Polášek: "Separation and determination of flavonoids and phenolcarboxylic acids utilizing complex formation with tungstate and on-line pre-concentration of analytes in capillary zone electrophoresis"; Instrumental Methods of Analysis, Modern trends and applications (IMA 2009), Atény, Řecko, 4.-8.10.2009. Poster č. PB35.

Jitka Šíroká, Klára Petrů, Pavel Jáč, Miroslav Polášek: "Capillary electrophoretic assay of flavonoids and phenolic acids in propolis using complex formation with tungstate and on-line preconcentration"; International Symposium on Chromatography (ISC 2010) Valencia, Španělsko, 12.-16.9.2010. Poster č. P04-013.

Jitka Šíroká, Klára Petrů, Jan Honegr, Miroslav Polášek, Marie Pospíšilová: "Separation selectivity enhancement through complex formation in capillary zone electrophoresis"; Microscale Bioseparations (MSB 2010), Praha, Česká Republika, 21.–25.3.2010. Poster č. P215.

Jitka Šíroká, Daniel N. Polesel, José Luiz da Costa, Marina F. M. Tavares: "Separation and determination of chlorophenylpiperazine (CPP) isomers by capillary zone electrophoresis in seized pills"; XVII. Congresso Brasileiro de Toxicologia, Ribeirao Preto, Brasil (CBTX 2011), 22.-25.6.2011. Poster č. AN34; Revista Brasileira de Toxicologia vol. 24 (2011) stránka 188.

Jitka Šíroká, Klára Petrů, Pavel Jáč, Miroslav Polášek: "Comparative study of separation of polyphenols and phenolcarboxylic acids in buffers containing different complex-forming agents (borate/tungstate) by capillary electrophoresis with and without on-line sample stacking"; Recent Developments in Pharmaceutical Analyses (RDPA 2011), Pavia, Itálie, 21.-24.9.2011. Poster č. P090.

Jitka Šíroká, Lucie Bydžovská, Klára Petrů, Miroslav Polášek: "Optimisation of capillary electrophoretic method for the determination of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in urine with UV detection"; Recent Developments in Pharmaceutical Analyses (RDPA 2011), Pavia, Itálie, 21.-24.9.2011. Poster č. P043.

Klára Petrů, Jiří Plíšek, Lenka Krčmová, Jitka Šíroká, Miroslav Polášek: "New approach of sample preparation for sensitive determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine coupled with capillary electrophoresis"; 9<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2011), Brno, Česká Republika, 31.10.-2.11.2011. Poster č. 27.

Jitka Šíroká, Daniel N. Polesel, José Luiz da Costa, Marina F. M. Tavares: "Development of capillary electrophoretic method using various cyclodextrins as selectors for determination

of chlorophenylpiperazine isomers in confiscated pills"; 17th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (LACE 2011), Hollywood, Florida, USA; 2.- 6.12.2011. Poster č. PP-A-22.

Jitka Široká, Klára Petrů, Miroslav Polášek: „Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis using high sensitivity UV detection (bubble cell or z-cell) in combination with large volume sample stacking"; 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 2012), Ankara, Turecko, 26.- 29.6.2012. Poster č. P-189.

Jitka Široká, Andrea Martincová, Marie Pospíšilová, Miroslav Polášek: „Determination of citrus flavonoids, troxerutin and ascorbic acid in pharmaceuticals and food supplements by capillary electrophoresis"; 19th International Symposium, Exhibit & Workshops on Electro and Liquid Phase separation Techniques (ITP 2012), Baltimore, Maryland, USA, 30.9.– 3.10.2012. Poster č. P-306.

## Příloha I

# Use of inorganic, complex-forming ions for selectivity enhancement in capillary electrophoretic separation of organic compounds

Jitka Šířoká, Pavel Jáč, Miroslav Polášek

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation method based on the migration of charged species under the influence of electric field. The main merits of CE are high separation efficiency, short analysis time and small consumption of solvents and samples. However, the main drawbacks of CE are generally lower sensitivity compared to classical column-chromatographic methods.

Selectivity and/or sensitivity of CE separation can be improved by forming complexes between analytes and a complex-forming reagent present as an additive in the background electrolyte (BGE). We focus this review primarily on the application of inorganic complex-forming reagents added to the BGE to separate organic ligands. We briefly mention common CE separations of inorganic analytes (mainly metal ions) using BGEs with organic ligands (e.g., hydroxycarboxylic or aminopolycarboxylic acids) as selectors.

The review involves brief theoretical consideration of the significance of the effect of complex formation on separation selectivity and/or sensitivity in CE, but the major topic is critical evaluation of different inorganic complex-forming reagents used recently in the CE analysis of organic compounds, including:

- (i) borate, tungstate and molybdate in separating organic compounds possessing vicinal -OH groups;
- (ii) ligand-exchange CE and capillary electrochromatography in chiral analysis; and,
- (iii) the role of metal ions as central ions employed for selectivity enhancement of CE separation of various classes of organic compounds, including biopolymers.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Borate; Capillary electrochromatography; Capillary electrophoresis; Chiral separation; Complex formation; Inorganic ion; Ligand exchange; Metal ion; Molybdate; Tungstate

**Abbreviations:** APPI, Atmospheric pressure photoionization; BGE, Background electrolyte; EC, Electrochemical; CD, Cyclodextrine; CE, Capillary electrophoresis; CEC, Capillary electrochromatography; CSP, Chiral stationary phase; EMO, Enantiomer-migration order; EOF, Electroosmotic flow; ESI, Electrospray ionization; ICP, Inductively coupled plasma; LE-CE, Ligand-exchange capillary electrophoresis; LE-CEC, Ligand exchange capillary electrochromatography; MEKC, Micellar electrokinetic capillary chromatography; MS, Mass spectrometry; RP, Reversed phase; SST, System-suitability testing; UV, Ultraviolet

Jitka Šířoká, Pavel Jáč,  
Miroslav Polášek\*  
Department of Analytical  
Chemistry,  
Faculty of Pharmacy,  
Charles University,  
Heyrovského 1203,  
Hradec Králové,  
CZ-500 05, Czech Republic

\*Corresponding author.  
Fax: +420 495 067 164;  
E-mail: Miroslav.Polasek@faf.  
cuni.cz, polasok@faf.cuni.cz

## 1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) occupies a significant place within the family of analytical separation methods. CE obviously possesses great capacity for separating charged molecules according to their charge-to-size ratio during their migration in conductive background electrolytes (BGE) under the influence of electric field. The merits of this method are mainly high separation efficiency, short

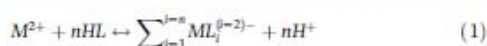
time of analysis and low consumption of samples and solvents.

Despite evident merits of CE, several reviews have discussed ways of possibly improving its separation selectivity [1–3]. This is an important issue where the difference between the values of effective electrophoretic mobility of migrating species is too small so the separation selectivity is insufficient to allow acceptable separation of the analytes merely by adjusting pH. In such a case, the most



effective approach to enhancing separation selectivity is purposeful manipulation of selective interactions between the compounds to be separated and components of BGE (e.g., surfactants, organic solvents, complex-forming agents and other special reagents) added intentionally to the BGE as selectors [2–4].

Generally in CE, application of complex formation between a metal ion and an organic ligand (where the metal ion plays the role of analyte and the ligand acts as selector, or vice versa) can both enhance selectivity and facilitate detection [5]. Complex formation between metal ions (acceptors of electrons) and organic or inorganic ligands (electron donors) is based on their weak charge-transfer interactions in aqueous or mixed aqueous-organic media. For possible practical use in CE separations, the complex species produced on-column should be characterized by intermediate stability and complex-formation equilibria should be reached fast enough (practically instantaneously after mixing the “reactants” inside the separation capillary) [1]. Depending on the electron configuration of the central ion, charge and molecular structure of the ligand and the metal-to-ligand concentration ratio in the BGE, a relatively complicated array of emergent complexes may be produced, differing in charge, size and stability. For example, a model complex-formation equilibrium resulting from the interaction between a bivalent metal ion  $M^{2+}$  and an organic ligand HL, which is here a monoprotic weak acid donating one free electron pair upon splitting off its proton, can be described schematically by Equation (1):



Hence, the interaction between the metal ion and the ligand represents a dynamic process of formation and dissociation of a mixture of differently charged  $ML_i$  complexes, so the resulting effective mobility ( $\mu_{eff}$ ) of an analyte (in this case, metal ion) could be expressed as follows in Equation (2):

$$\mu_{eff} = \alpha \mu_{eff}(M^{2+}) + \beta \mu_{eff}(ML^+) + \gamma \mu_{eff}(ML_2) + \dots + \omega \mu_{eff}(ML_m^{(n-2)-}) + \mu_{eff} \quad (2)$$

where  $L$  is ligand (anion of weak organic acid) reacting with central ion  $M^{2+}$  and yielding complexes of different metal/ligand ratios;  $\alpha, \beta, \gamma, \dots, \omega$  denote molar fractions of free metal ion and consecutive complexes, respectively, and  $\mu_{eff}$  is mobility corresponding to the electroosmotic flow (EOF) [1].

We must note that, since complex formation is affected by the concentration of free ligand, in the case of organic ligands taking part in acid-base equilibria, the pH of the BGE also plays an important role in the complex formation. Apart from the effect of pH on the complex formation, pH also influences the EOF considerably [6]. It is obvious that, if the sample contains, e.g., two different

ligands  $X$  and  $Y$ , one can expect even more complicated equilibria involving formation of a series of  $MX_i$  and  $MY_i$  complexes or even mixed-ligand species  $MX_iY_j$  upon adding a metal-ion selector to the BGE. However, if the BGE is treated with excess of metal ion relative to a bidentate or polydentate ligand, binuclear or oligonuclear complexes of different charges and mass may even be formed. Therefore, considering the possible diversity in complex formation equilibria, depending on the reaction conditions and on the character of reactants, it is clear that complex formation is a tool that could be used for manipulating separation selectivity effectively in CE.

In principle, two basic ways of applying complex formation can be realized in CE by separation of:

- (i) inorganic ions (e.g., metal cations) in BGEs containing suitable organic ligands; and,
- (ii) organic compounds in BGEs containing appropriate inorganic central ions.

Separation of inorganic ions by CE is a topic discussed in a number of articles and reviews [1,2,4–6], so we do not deal with it in detail here. Briefly, some metal cations form complexes of different charges and stability with polydentate organic ligands (mainly hydroxycarboxylic, dicarboxylic and aminopolycarboxylic acids) added to the BGE (separation medium). Due to this reaction, the metal ions can be separated from each other despite their similar original free metal ion mobilities. Complex formation often increases molar absorptivities of the complex species compared to free metal ions and makes them more easily detectable by spectrophotometric detection commonly employed in CE [1,5]. Another option in CE separation of metal ions is formation of stable anionic metal-ligand complexes [5].

However, separation of organic ligands involving premeditated addition of inorganic ions (e.g., bivalent metal ions) to the BGE is much less common in CE. In 1998, Chiari [6] ascribed the limited application of this approach mainly to the worse efficiency and reproducibility of such CE separations, caused by the adverse effect of possible interactions of the metal ions added (especially  $Cu^{2+}$ ) with the silanol groups of silica of the capillary surface. Since publication of the review [6], a number of new papers dealing with the use of inorganic ions as CE selectors have appeared, so we discuss recent examples of such applications in this review.

We cover three main topics:

- (1) manipulating selectivity in CE separation of organic compounds possessing vicinal hydroxyl groups via complex-formation with borate, molybdate or tungstate;
- (2) the concepts of ligand-exchange capillary electrophoresis (LE-CE) and ligand-exchange capillary electrochromatography (LE-CBC) in chiral separations; and,

- (3) application of metal ions ( $M^{3+}$ ) as central ions added to the BGE to enhance selectivity of the CE separation of various classes of organic compounds, including biopolymers.

## 2. The role of borate, molybdate and tungstate in separating organic compounds possessing vicinal hydroxyl groups

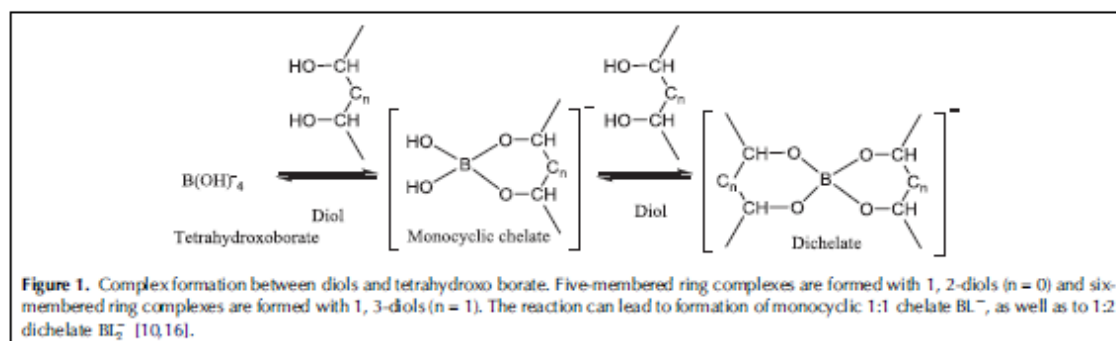
### 2.1. Borate-based BGEs

Borate buffer is frequently used as a complex-forming environment for separating compounds possessing suitably sterically arranged functional groups (hydroxy, carboxy moiety) in molecular structure [e.g., carbohydrates (sugars) [7–10], phenolic compounds (phenol-carboxylic acids, flavonoids) [11–13], corticosteroids [14], nucleosides [15] and humic substances [16]]. The borate ion can be also used as central ion for chiral separations in LE-CE (for more detailed information, see Section 3).

Fig. 1 shows complex formation between polyol ligand (1,2- or 1,3-diol) and borate anion. The formation of two

kinds of chelates, namely  $BL^-$  and  $BL_2^-$  (where L stands for the diol molecule) is possible [9,10]. Table 1 summarizes examples of the use of borate-based BGEs.

**2.1.1. Carbohydrates.** Carbohydrates are practically not ionized in purely aqueous media, so it is difficult to analyze them by CE directly. However, neutral carbohydrate molecules can be transformed to negatively charged complexes in alkaline borate buffers (pH 8–12). Reducing sugars can exist as different species in aqueous solutions (e.g.,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pyranose,  $\alpha$ - and  $\beta$ -furanose, the open chain or carbonyl form, and its hydrated form), so various types of complexes can be formed with the tetrahydroxyborate anion. Vicinal -OH groups as well as hydroxyls located on alternate carbons are involved in chelation; obviously, for the cyclic form of carbohydrates, the ligand in the cis-1,2 configuration is more likely to interact with the borate anion than the trans-1,2 form. The chelation between borate and carbohydrates is often accompanied by a hyperchromic effect in the UV spectral region around 200 nm, thus facilitating more sensitive UV detection of such complex species. This effect is explained by the increased proportion of the



**Table 1.** Selected recent applications of borate buffer as complex-forming reagent in capillary electrophoresis

Analyte	Matrix	Composition of background electrolyte	Ref.
Xylose, arabinose, glucose, rhamnose, fucose, galactose, mannose, glucuronic acid and galacturonic acid Mannitol, sorbitol, xylitol	Extract <i>Codonopsis pilosula</i> Infusion solution	200 mM borate, pH 11 200 mM borate, 10 mM 3-nitrobenzoate, pH 9.3 400 mM borate, pH 7.1	[7] [8] [10]
Acidic monosaccharides and their corresponding 1,4-lactones; two isosacharino-1,4-lactone isomers Cinnamic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, gentisic acid, syringic acid, vanillic acid Aldosterone, 18-hydroxycorticosterone, 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone, cortisone, cortisol, 11-deoxycortisol	Extract <i>Herba epilobi</i> –	50 mM sodium tetraborate, 2% $\alpha$ -cyclodextrin, pH 9.0 400 mM borate buffer, pH 9.0	[13] [14]
Nucleosides (cytidine, uridine, adenosine, guanosine) and nucleobases (cytosine, uracil, thymine, adenine, hypoxanthine, guanine, xanthine)	Beer sample	20 mM boric acid, pH 12.5, 1 M diethylamine; 20 mM boric acid, 110 mM SDS, pH 10.5	[15]

SDS, Sodium dodecyl sulfate.



carbonyl or open-chain form in the solution of carbohydrate–borate complex [9].

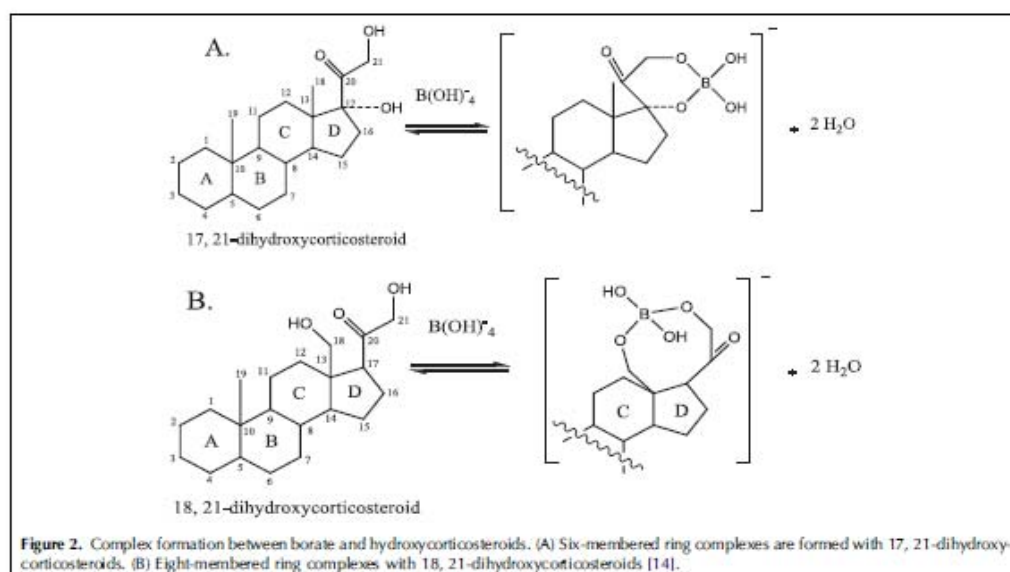
**2.1.2. Humic substances.** Humic substances are high molecular-weight polyelectrolytes containing phenolic and carboxylic moieties. These acidic functional groups are ionized at the pH of the borate buffer. Due to the complexation between polyols of humic substances and the borate, CE analysis with this electrolyte can provide structural information about the occurrence of polyol moieties in humic substances [16].

**2.1.3. Flavonoids and phenolcarboxylic acids.** Flavonoids and phenolcarboxylic acids possessing phenolic hydroxyl groups are compounds naturally occurring in plants, which often exhibit antioxidation and radical-scavenging activity. The methods of CE separation of such compounds (including the use of complex formation) were reviewed recently [11,12]. Appropriate BGEs for CE analysis of such polyphenolic compounds are based on borate buffers of pH 8–10 facilitating at least partial ionization of phenolic –OH groups and offering the possibility of forming negatively-charged complexes of polyphenols comprising vicinal hydroxy groups with borate. In addition, the glycosidic forms of flavonoids contain sugar moieties can also participate in chelation with borate if the concentration of borate is sufficiently high. However, the presence of the carboxylic group in the analyte molecule could suppress the formation of chelates with borate as a result of electric repulsion

between the negatively-charged –COO<sup>–</sup> group and borate [16]. In some cases, satisfactory separation of flavonoids is not achieved just with a simple borate buffer and other separation mechanisms (e.g., partitioning with pseudostationary phase) also have to be applied to resolve all the analytes [11,12]. Unfortunately, alkaline borate buffers may be unsuitable for some applications because of limited resistance of certain polyphenols (e.g., some tea catechins) towards oxidation by the air oxygen in media of high pH [17,18].

**2.1.4. Corticosteroids.** The borate-buffer system was also used for the separation of endogenous 17- and 18-hydroxylated corticosteroids (derivatives of 21-hydroxylated 4-pregnen) [14]. The authors observed that chelation with borate affected migration of 21-hydroxycorticosteroids containing 17-OH or 18-OH. Though 21-/17- or 21-/18- hydroxyls are not vicinal, they are involved in complex formation, creating six-membered or eight-membered chelate rings, respectively (see Fig. 2). The presence of hydroxyl or carbonyl group in position 11 enhanced the formation of borate complex.

**2.1.5. Nucleosides and nucleobases.** Another interesting application of borate buffer as a complex-forming separation medium for the determination of nucleosides and nucleobases in beer samples was published recently [15]. The migration order of such analytes was influenced in both CE and micellar electrokinetic capillary



**Figure 2.** Complex formation between borate and hydroxycorticosteroids. (A) Six-membered ring complexes are formed with 17, 21-dihydroxycorticosteroids. (B) Eight-membered ring complexes with 18, 21-dihydroxycorticosteroids [14].

chromatography (MEKC) modes of separation, due to complex formation between  $B(OH)_4^-$  and the ribose unit of nucleosides. As expected, the presence of borate did not affect migration of nucleobases that do not form complexes with borate. The analytes were detected by UV spectrophotometry in both cases, and coupling to ESI-MS or APPI-MS was also attempted with less success [15].

### 2.2. Molybdate- and tungstate-based BGEs

Other options for manipulating the separation selectivity of CE analysis of polyphenols is substitution of borate by  $MoO_4^{2-}$  or  $WO_4^{2-}$  as the complex-forming reagent added to the BGE. Molybdate or tungstate (generally  $XO_4^{2-}$ ) react with simple 1,2-diphenols (e.g., catechol,  $H_2L$ ) to form  $[XO_2L_2]^{2-}$  complexes or with aliphatic diols (see Fig. 3) that are more stable than analogous chelates with borate [19]. Employment of the addition of  $\sim$ mM concentrations of  $WO_4^{2-}$  or  $MoO_4^{2-}$  as complex-forming reagents for the CE separation of polyphenols was introduced by our group [20,21]. For detailed description of separation conditions see Table 2.

The main advantage of these complex-forming agents is that (in contrast to borate) they react with polyols in electrolytes of slightly acidic or neutral pH [i.e., the risk

of decomposing analytes that can be easily oxidized by air oxygen in routinely-used alkaline borate buffers (e.g., flavonoids or other antioxidants) can be minimized]. Even though complex formation between polyphenols and  $XO_4^{2-}$  is based on the same principle as with borate, CE separation selectivity is somewhat different, as demonstrated in the case of tungstate [21]. The sensitivity and separation efficiency were worse for tungstate-based BGE but considerably better resolution was achieved compared to borate-based BGE, so these new selectors represent new options to affect separation selectivity in CE of polyphenols and possibly polyols.

Search of the literature did not reveal any reports dealing with serious, detailed studies of the complex-formation mechanism and structure elucidation of molybdate or tungstate complexes with flavonoids as ligands. There were several papers on molybdate or tungstate complexes with polydentate ligands involving polyhydroxycarboxylic acids with respect to composition and structure of the complex species (but not in connection with CE separations) depending on pH and concentration ratios of the reactants [22–26]. Relatively complicated mixtures of mostly anionic complexes of various ratios of ligand to central ion could be utilized

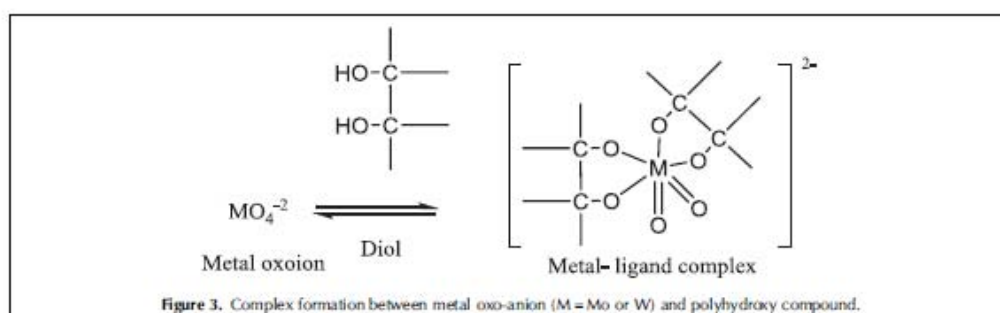


Table 2. Examples of recent applications of molybdate-based and tungstate-based background electrolytes				
Selector	Analyte	Matrix	Composition of background electrolyte	Ref.
Mo(VI)	Cinnamic acid, ferulic acid, caffeic acid, 3-hydroxycinnamic acid	–	25 mM MES, 0.15 mM $Na_2MoO_4$ , pH 5.4	[20]
Mo(VI)	Apigenin, rutin, hyperoside, quercetin, luteolin, p-coumaric acid, chlorogenic acid	Plant extracts <i>Matricaria recutita</i> , <i>Hypericum perforatum</i>	25 mM HEPPSO, 2 mM $Na_2MoO_4$ , pH 7.4, 25% methanol (v/v)	[20]
W(VI)	Apigenin, rutin, hyperoside, quercetin, luteolin, p-coumaric, chlorogenic, cinnamic acid	Plant extract <i>Hypericum perforatum</i>	50 mM HEPES, 2.2 mM $Na_2WO_4$ , pH 7.4, 25% methanol (v/v)	[21]

MES, 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid; HEPPSO, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-hydroxypropanesulfonic acid); HEPES, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid).



for separation purposes. However, fluoroquinolones react with molybdate or tungstate to form predominantly 1:1 species [27].

### 3. Ligand-exchange capillary electrophoresis

Separation of chiral compounds is of great importance in quality control in pharmaceuticals and development of new drugs, since individual enantiomers of chiral drugs may exhibit different effects when administered to patients. Efficient separation techniques enabling resolution of these kinds of analyte are needed to assure quality and safety of chiral drugs and to map metabolic pathways of individual enantiomers. CE is suitable for chiral separations, due to its particularly high separation efficiency with wide choice of chiral selectors that can be added directly into the BGE. In addition to well-known conventional chiral selectors (e.g., cyclodextrins, crown ethers, carbohydrates, macrocyclic antibiotics, proteins, chiral ion-pairing reagents and chiral surfactants), LE-CE represents an interesting option for resolving enantiomers during the separation process [28].

The general principle of LE-CE lies in competitive reaction of a chiral analyte with a metal-chiral selector complex (a complex of metal ion with auxiliary ligand of certain conformation, e.g., L-amino acid). The individual enantiomers of the analyte form diastereometric complexes with the metal ion by replacing one molecule of the chiral selector originally attached to the central ion. The resulting mixed ternary complexes vary in stability, so the effective electrophoretic mobilities of the respective analyte enantiomers differ [28] (Fig. 4).

The central ion most frequently utilized in LE-CE is Cu(II) [29–35,37,40]. In recent years, the possibility of other central ions [e.g., Zn(II), Co(II), and Ni(II)] to be used in chiral LE-CE instead of Cu(II) was systematically examined [36–39,41–43].

In particular, the results with Zn(II) demonstrated its applicability in LE-CE. The mechanism of the formation of metal-chiral selector complexes with Zn(II) is analogous to that in Fig. 4 for Cu(II) [36].

It has been shown that borate [B(III)] can be utilized as the central ion in LE-CE instead of bivalent metals [44–46]. The basic mechanism of complex formation is formally similar to that of conventional non-chiral separations (Fig. 1) involving chelation of borate with 1,2- or 1,3-diols at alkaline pH. After introduction of chiral analyte into the capillary, one of the auxiliary selector ligands is exchanged with one enantiomer of the analyte. Higher concentrations of borate are needed compared to concentration of Cu(II) in LE-CE chiral separations. The originating ternary complexes contain at least three centers of asymmetry due to the presence of asymmetric boron atom in the borospirane chelate [44].

The auxiliary ligands used to form the metal-ligand selectors are mostly L-amino acids but there is a tendency to find other suitable ligands (e.g., polyhydroxycarboxylic acids [37] if the central ion is  $M^{2+}$  and 1,2-diols if B(III) is employed as the central ion [44–46]). The enantiomer-migration order (EMO) of analytes can be easily manipulated by changing the conformation of the auxiliary chiral ligand (e.g., D-amino acid is applied instead of L-amino acid) [35]. Alternatively, amino-derivatized cyclodextrins (CDs) were also applied as ligands in LE-CE [47–49]. Considering the structure of the CD molecule with a hydrophobic cavity, the interaction of analytes with the CD cavity can support complex formation with the Cu(II)-CD complex and thus facilitate chiral recognition. The optimal concentration ratio of Cu(II) to CD was 1:1.2 [47,48] or 1:1 [49], respectively, which was lower than the optimal ratio of amino acid to Cu(II) (2 or above).

In order to achieve chiral separation by LE-CE, the analytes should fulfill some structural prerequisites

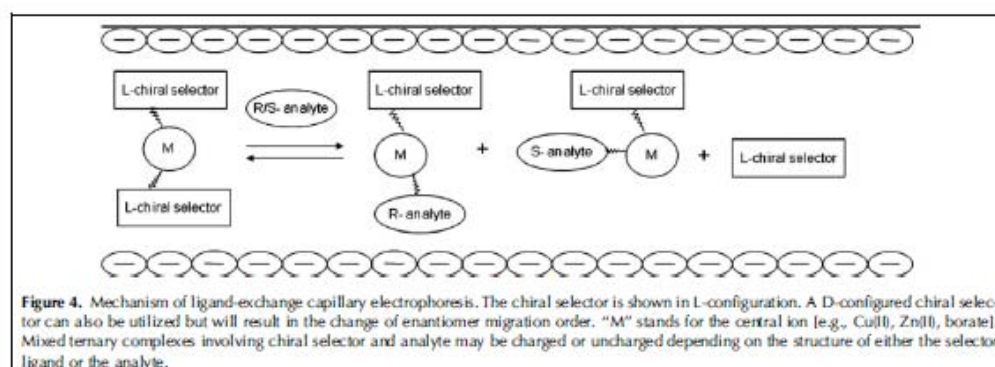


Table 3. Examples of LE-CE and LE-CFC separations				
	Central ion – chiral-selector complex/ stationary phase	Composition of background electrolyte / mobile phase	Analytes / matrix	Ref.
Cu(II)	N-(2-hydroxyoctyl)-L-4-hydroxyproline (OH-L-4-Hyp)	10 mM OH-L-4-Hyp, 5 mM CuSO <sub>4</sub> , 10 mM NH <sub>4</sub> Ac, pH 12.3	Sympatomimetics	[29]
Cu(II)	L-proline/L-isoleucine	25 mM NH <sub>4</sub> Ac, 1 M acetic acid in methanol,	Unmodified amino acids (AA)	[30]
Cu(II)	N-(2-hydroxyoctyl)-L-4-hydroxyproline (OH-L-4-Hyp)	15 mM L-Pro/L-Ile, 5 mM CuCl <sub>2</sub> , pH 3.9 10 mM OH-L-4-Hyp, 5 mM CuSO <sub>4</sub> , 5 mM phosphate solution, pH 4.3	α-hydroxy acids	[31]
Cu(II)	L-lysine	20 mM OH-L-4-Hyp, 10 mM CuSO <sub>4</sub> , 100 mM triethylamine, pH 12.0	β-blockers	[32]
Cu(II)	L-lysine	10 mM NH <sub>4</sub> Ac, 6.67 mM CuSO <sub>4</sub> , 13.33 mM L-lysine, pH 7.0	Underivatized aromatic AA	[32]
Cu(II)	L-ornithine	10 mM NH <sub>4</sub> Ac, 3.33 mM CuSO <sub>4</sub> , 6.67 mM L-lysine, 50 mM SDS, pH 6.0	Underivatized AA, dansyl AA, dipeptides, aminoalcohols	[33]
Cu(II)	L-4-hydroxyproline (L-4-Hyp); L-histidine (L-His); N-(2-hydroxyoctyl)-L-4-hydroxyproline (OH-L-4-Hyp); N-(2-hydroxypropyl)-L-4-hydroxyproline (HP-L-4-Hyp)	20 mM NH <sub>4</sub> Ac, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , 2 mM L-ornithine, pH 8.0 20 mM NH <sub>4</sub> Ac, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , 2 mM L-ornithine, 30 mM SDS, pH 8.0	Halogenated AA	[34]
Cu(II)	L-tartaric acid/L-threonine	80 mM L-4-Hyp, 40 mM CuSO <sub>4</sub> , 5 mM phosphate, pH 4.5 20 mM selector (HP-L-4-Hyp, OH-L-4-Hyp, L-His), 10 mM CuSO <sub>4</sub> , 5 mM phosphate, pH 4.5	Sympatomimetics β-blockers	[35]
Zn(II)	L-lysine	80 mM L-tartaric acid, 40 mM Cu(II), pH 12; 80 mM L-threonine, 60 mM Cu(II), pH 12; 50 mM L-threonine, 37.5 mM Cu(II), pH 12	Aromatic AA	[36]
Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)	D- gluconic, D- saccharic, L- threonic acid	5 mM NH <sub>4</sub> Ac, 100 mM boric acid, 3 mM ZnSO <sub>4</sub> , 6 mM L-lysine, pH 7.6	Aromatic AA, Glycyl dipeptides	[37]
Zn(II)	L- arginine	Different buffers based on metal and selector (for details see the original manuscript)	Unlabeled aromatic AA and dansylated AA / rice vinegar	[38]
Zn(II)	L-arginine	5 mM NH <sub>4</sub> Ac, 100 mM boric acid, 3 mM ZnSO <sub>4</sub> , 6 mM L-arginine, pH 8.2 and 8.0, respectively	Aromatic AA / rice-brewed suspensions (Laczoa)	[39]
Cu(II)	L-proline	5 mM NH <sub>4</sub> Ac, 100 mM boric acid, 3 mM ZnSO <sub>4</sub> , 6 mM L-arginine, pH 8.2	L/D thyroxine in tablets	[40]
Zn(II)	L-ornithine	15 mM borate buffer, pH 9.6, 0.05 mM CuSO <sub>4</sub> , 0.4 mM L-proline, 10% (v/v) ACN	Aromatic AA / determination of enzyme kinetic constant	[41]
Zn(II)	L-arginine	100 mM boric acid, 5.0 mM NH <sub>4</sub> Ac, 3.0 mM ZnSO <sub>4</sub> , 6.0 mM L-ornithine, pH 8.2	Dansylated AA / serum samples	[42]
Zn(II)	L-alaninamide, L-prolinamide, L-phenylalaninamide	5 mM NH <sub>4</sub> Ac, 100 mM boric acid, 3 mM ZnSO <sub>4</sub> , 6 mM L-arginine, pH 8.4	Dansylated AA	[43]
Borate	(S)-3-amino-1,2-propanediol (SAP)	5 mM NH <sub>4</sub> Ac, 100 mM boric acid, 4 mM ZnSO <sub>4</sub> , 8 mM selector ligand, pH 8.2	D,L-pantothenic acid	[44]
Borate	(5S)-pinanediol (SPD)	200 mM borate buffer, 200 mM SAP, pH 9.2, 15% methanol (v/v)	Neutral 1,2-diols	[45]
Borate	(S)-3-amino-1,2-propanediol (SAP), (R)-3-amino-1,2-propanediol (RAP)	200 mM borate buffer, 200 mM SPD, 200 mM SDS, pH 10.0	Reducing monosaccharides labeled with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone	[46]
Cu(II)	β-CD substituted by an imidazole-bound histamine (CDmh)	200 mM borate buffer, 200 mM SAP / RAP, pH 9.0 / pH 10.0	tryptophan	[47]
		20 mM NH <sub>4</sub> Ac, 0.25 mM CDmh, 0.3 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 6.8		



Table 3 (continued)					
	Central ion – chiral-selector complex/ stationary phase	Composition of background electrolyte / mobile phase	Analytes / matrix	Ref.	
	Cu(II)	3-amino- $\beta$ -CD (CD3NH2)	20 mM NH <sub>4</sub> Ac, various concentrations of CD3NH2 and CuSO <sub>4</sub> , pH 6.8	AA	[48]
	Cu(II)	6 <sup>A</sup> -(2-Aminoethylamino)-6 <sup>A</sup> -deoxy- $\beta$ -CD (CDen)	20 mM CDen, 20 mM CuSO <sub>4</sub> , 5 mg/ml PEG 20000, 1% (v/v) tert-butyl alc., pH 5.8	Aromatic AA	[49]
	Cu(II)	Continuous bed containing L-4-hydroxyproline	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 mM Cu(II), pH 4.6	Amino acids	[52]
	Cu(II)	Continuous bed containing L-4-hydroxyproline	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 mM Cu(II), pH 4.5	Hydroxy acids	[53]
	Cu(II)	Monolithic silica with L-phenylalanineamide	ACN / 0.5 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Ac (7:3), pH 5.5	Dansylated AA	[54]
	Cu(II)	Monolithic silica with L-prolinamide	ACN / 0.5 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Ac (7:3), pH 6.5	Dansylated AA, hydroxy acids	[55]
	Cu(II)	Monolithic silica with L-prolinamide; L-phenylalanineamide; L-alanineamide	ACN / 0.25-0.5 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , 50-100 mM NH <sub>4</sub> Ac (7:3), pH 5.5-7.6	Dansylated AA	[56]
	Cu(II)	Monolithic silica with L-hydroxyproline	ACN / 0.50 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Ac (7:3), pH 6.5	Dansylated AA, hydroxy acids, dipeptides	[57]
	Cu(II)	Packed silica with L-4-hydroxyproline or RP-C18 with N-decyl-L-4-hydroxyproline	25 mM NH <sub>4</sub> Ac, 0.5 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , pH 4.5-6	AA, alpha-hydroxy acids, dipeptides	[58]
	Cu(II)	Trans-(1S,2S)-1,2-bis-(dodecylamido)cyclohexane gel in methanol	10 mM NH <sub>4</sub> Ac, 5 mM Cu(Ac) <sub>2</sub> , 7.5 mM D-valine, pH <sup>*</sup> 3.5	Dansylated AA	[59]

AA, Amino acid; PEG, Poly(ethylene glycol).

allowing them to replace the auxiliary selector ligand from the metal complex. Amino alcohols (sympatomi-metics, beta-blockers) [29,31,35], alpha-hydroxy carboxylic acids [31], amino acids [30,32–34,36–39, 41–43] and diols [44–46] represent structural classes of chiral analytes that could be successfully separated by IE-CE.

In optimizing the IE-CE method, the concentration ratio of central ion to auxiliary chiral ligand, their overall concentration and the pH of the BGE are the most important parameters that must be carefully controlled. Moreover, the addition of sodium dodecyl sulfate exceeding its critical micelle concentration in the BGE results in modification of the separation mechanism of IE-CE to LE-MEKC; this may change the BMO and significantly improve the separation in terms of resolution and separation efficiency [32]. The possible limitation of LE-CE or LE-MEKC is relatively high background UV absorption of metal-selector complexes, which decreases sensitivity of detection [50]. This disadvantage can be overcome by employing the CE technique involving the partial filling mode or by switching to, e.g., laser-induced fluorescence or conductivity detection [50].

Table 3 gives examples of some recent applications of IE-CE and LE-CEC. In many cases, satisfactory resolution

was achieved for most of the analytes under study, except [35], where only one model compound from 16 structures tested was base-line separated. Though the majority of papers published focused on screening the enantioselectivity of the chiral selectors tested, some papers validated LE-CE-based methods applied to real sample analysis [38–42].

The ligand-exchange mechanism can be successfully applied in CEC in order to realize chiral separations. Briefly, CEC represents a hybrid technique that combines the separation mechanism of CE and high performance liquid chromatography (HPLC). The capillaries for CEC are packed with stationary phases that provide high-selectivity separation. The mobile phase is "pumped" through the separation capillary by EOF to ensure high-efficiency separation, thanks to the plug-like profile of the mobile-phase flow [51].

In the case of chiral separations, a chiral selector is anchored in the stationary phase by its chemical or dynamic modification. It is mainly monolithic columns that are utilized in IE-CEC [52–57] because their fabrication is easier than that of packed columns [58]. Generally, two main directions in LE-CEC monolithic columns technology prevail:

(1) preparation of polymeric monoliths (continuous beds) by *in situ* polymerization [52,53]; and,

(2) fabrication of silica-based monoliths prepared by a sol-gel process [54–57].

In both, the mechanism of chiral recognition is analogous to LE-CE. Here, the chiral selector chemically bonded on the surface of the stationary phase forms metal chelates with Cu(II) that is loaded into the column in the final step of preparing the chiral stationary phase (CSP), and Cu(II) is also added into the mobile phase. During the separation process, one ligand molecule from the Cu(II) complex immobilized on the stationary phase is replaced by the chiral analyte molecule (e.g., amino acid), thus forming ternary mixed complexes of different stability [54].

We need to note that, in CBC, the velocity and the direction of the EOF depend on the type of stationary phase used and its surface modifications, so, for silica-based monolithic LE-CSP modified with L-phenylalanineamide, its positive charge is responsible for the reversal of EOF (from cathode to anode). Remaining (unmodified) silanol groups of the silica stationary phase acquire negative charge upon ionization with increasing pH, so the net EOF is decreased on this type of LE-CSP [54]. However, when silica-based monolith was modified with L-hydroxyproline as chiral selector, no EOF was generated because the chelate formed by the interaction of Cu<sup>2+</sup> and two chiral-selector moieties is neutral, so no EOF is developed, even if the pH is changed. Such behavior indicates that practically all silanol groups were modified with the chiral selector [57]. Contrary to silica-based LE-CSP during the preparation of continuous beds, some charge carrier (e.g., vinylsulfonic acid) is used to generate EOF that is independent of the pH of the mobile phase [52].

Recently, Gübitz's and Schmid's group [58] compared the separation properties of silica-based, chemically-bonded LE-CSP with those of the RP-18 packed material modified by dynamic coating. Dynamic coating seemed to be more advantageous in chiral separation of  $\alpha$ -hydroxy acids, whereas conventional CSP chemically modified by covalent bonding offered better resolving power for amino acids and dipeptides. Technically, preparation of dynamically-coated CSP is much easier (pumping of solution of the chiral selector through the capillary) than fabrication of covalently-bonded chiral selectors. We need to note that easy removal and change of chiral selector is a considerable advantage in method development. Reversed EMO (the L-enantiomer migrated faster than the D-enantiomer) was observed in the case of dynamic coating, in contrast to stationary phase with chemically-attached selectors [58].

The special separation mechanism in the LE-CEC technique was recently described by Mizrahi and co-workers [59]. Enantioseparation of dansylated amino acids took place in a capillary filled with a low molecular-weight organogel based on trans-(1S,2S)-1,2-

bis-(dodecylamino)cyclohexane as a novel type of monolithic stationary phase. The separation buffer of pH 3.5 comprised 5 mM copper acetate, 7.5 mM D-valine as chiral ligand and 10 mM ammonium acetate. These separation conditions differ from those employed in conventional LE-CE or LE-CEC methods utilizing higher chiral ligand/Cu(II) concentration and pH in the higher range (pH 5–8). Since the optimal Cu(II)/D-valine ratio was less than 1:2, the remaining ligands in the square coordination plane of the complex were probably acetate ions from the buffer. Hence, the separation mechanism is most probably based on the exchange of acetate ions by the analyte molecules [59].

Due to expedient "marriage" of CE and HPLC with their inherent individual merits, a novel "hybrid" LE-CEC technique with especially high chiral separation efficiency could therefore be capable of base-line separation of relatively large number of amino acids and hydroxy acids. Undoubtedly, LE-CEC represents a very promising tool in chiral analysis that is complementary to the other well-established separation techniques.

#### 4. Metal ions as complex-forming central ions added to the BGE to facilitate CE separation of various classes of organic compounds, including biopolymers

Various classes of organic compounds can be separated by CE with complex formation of analytes with charged metal ions to enhance separation selectivity and/or sensitivity. Table 4 shows recent examples of determination of carboxylic acids [60,61], ethambutol [62], glycopyosphate [63] and peptides [64–66] by CE with "on-capillary" complex formation.

The biuret reaction, utilized to separate a number of peptides [64–66], profits from the ability of Cu(II) to form complexes with peptides via coordination with nitrogen atoms from deprotonated peptides. Such complex formation improves the selectivity of separation and the sensitivity of both UV and electrochemical (EC) detection [64–66].

The methods for peptide separation were optimized for "on-capillary" mode, where the sample is injected into the capillary filled with BGE buffer containing Cu(II) [64–66]. This approach brings advantages over pre-capillary and pre/on-capillary complexation strategies, because no sample dilution occurs during the derivatization and the separation efficiency is significantly enhanced. The kinetics of complexation between Cu(II) and the peptide depends on the primary and secondary structures of the peptide, so not every peptide can react completely with Cu(II). The feasibility of in on-capillary complexation technique should therefore be evaluated individually for each peptide of interest [64].



**Table 4.** Examples of applications of metal ions as complex-forming agents in separating various classes of organic ligands

Metal	Analyte	Matrix	Background electrolyte	Ref.
Ca(II)/Mg(II)	Carboxylic acids	Samples of vinegar	10 mM tetraborate buffer, pH 9.3, 0.5 mM TTAOH, CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> (10 ppm of each)	[60]
Ca(II)	Carboxylic acids	Snow samples	5 mM TRIS, 2 mM TMA, 0.2 mM TTAB, 0.6 mM Ca(II), pH 8.5	[61]
Cu(II)	Ethambutol	Pharmaceutical formulations	60 mM acetic acid / sodium acetate buffer, 5 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 4.6	[62]
Cu(II)	Glyphosate (herbicide)	Samples of tea beverages	40 mM acetate buffer, 5 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 5.0	[63]
Cu(II)	Angiotensin II, oxytocin, Leu-enkephalin (and metabolites), des-Tyr Leu-enkephalin	Standard mixture	25 mM boric acid, 3 mM tartaric acid, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 10.1	[64]
Cu(II)	Leu-enkephalin and its metabolites	Standard mixture	100 mM boric acid, 3 mM tartaric acid, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 9.8	[65]
	Monitoring of Leu-enkephalin metabolism	plasma	100 mM boric acid, 3 mM tartaric acid, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 9.8	
	Leu-enkephalin; angiotensin I-III, angiotensin 1-7; Des-Tyr Leu-enkephalin	Standard mixture	25 mM boric acid, 3 mM tartaric acid, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , pH 9.8	
Cu(II)	Angiotensin and its metabolites	Standard mixture, plasma	100 mM boric acid, 3 mM tartaric acid, 1 mM CuSO <sub>4</sub> , 1 mM SDS, pH 9.8	[66]

SDS, Sodium dodecyl sulfate; TMA, Trimellitic acid; TRIS, Tris(hydroxymethyl)aminomethane; TTAB, Tetradecyltrimethylammonium bromide; TTAOH, Tetradecyltrimethylammonium hydroxide.

The selection of EC detection coupled with Cu(II) chelation has several important advantages:

- (1) Cu(II)-peptide chelates are detectable by amperometric detection, even though the native peptides are not electroactive [65];
- (2) Cu(II)-peptide complexes give a greater EC response compared to native proteins [65,66]; and,
- (3) selectivity of the method can be improved by a dual-electrode detection technique involving oxidation of Cu(II)-peptide complex to Cu(III) at the first electrode and the reduction of Cu(III) to Cu(II) at the second electrode [66].

Many other biologically-active analytes are oxidized irreversibly at the first electrode, so they do not produce any signal at the second electrode [66].

## 5. Conclusion

CE represents in separation technology suitable for analyzing both charged and uncharged species. From the beginning of the 1990s, when the first CE analyzers became commercially available, the development of this technique resulted in widespread utilization, as demonstrated by its acceptance in two Pharmacopoeias (European [67] and USA [68]).

One of the main merits of CE is relatively simple control of separation selectivity (and the separation mechanism) by adding suitable additives to the BGE. Premeditated introduction of inorganic central ions to the BGE leading to complex formation with the analytes represents the way to achieve significant improvement

in separation selectivity and/or sensitivity of the CE method.

We gave a brief survey of inorganic central ions as complex-forming components of BGEs for the separation of organic analytes (ligands). In addition to the well-known, widely-applied borate-based BGEs, metal oxoanions (e.g., molybdate or tungstate) were recently applied in the separation of organic compounds possessing vicinal -OH groups.

Bivalent metal ions [e.g., Cu(II)] are routinely added to the BGE for separation of various organic analytes extending from small molecules to peptides. We also mapped out utilization of inorganic ions as central ions in chiral separation by LE-CE and IE-CEC. Although LE-CE became well established for chiral separations, new trends involve introducing novel chiral-selector ligands and central ions other than Cu(II). Despite LE-CEC being quite a new technique, compared to LE-CE, the results presented in recent years are very promising. We can expect new developments in IE-CEC and its applications in the analyses of real samples in near future.

The most serious limitation of BGEs based on non-volatile buffers containing inorganic complex-forming central ions (in terms of feasibility of detection) is the rather complicated coupling of CE to MS detection. Obviously, in CE, methods using such electrolytes, spectrophotometric UV-Vis and EC represent the most common detection techniques.

The exploitation of inorganic ions as complex-forming reagents is now well established to achieve satisfactory separation and sensitivity in CE. A relatively unexplored, but presumably very promising, area seems to be application of LE-CEC in chiral separations.

**Acknowledgement**

The authors gratefully acknowledge financial support from the Czech Ministry of Education (Research Project MSM 0021620822 and Grant SVV-2010-261-001).

**References**

- [1] V. Pacáková, P. Coufal, J. Chromatogr., A 834 (1999) 257.
- [2] P.R. Haddad, P. Doble, M. Macka, J. Chromatogr., A 856 (1999) 145.
- [3] A.H. Harakuwe, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 375.
- [4] A.R. Timerbaev, J. Chromatogr., A 792 (1997) 495.
- [5] M. Macka, P.R. Haddad, Electrophoresis 18 (1997) 2482.
- [6] M. Chiari, J. Chromatogr., A 805 (1998) 1.
- [7] X. Yang, Y. Zhao, Y. Ruan, Y. Yang, Biol. Pharm. Bull. 31 (2008) 1860.
- [8] M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Šafa, I. Petříška, J. Chromatogr., A 1143 (2007) 258.
- [9] S. Hofstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gasmann, H.M. Widmer, Anal. Chem. 63 (1991) 1541.
- [10] Ph. Schmitt-Kopplin, K. Fischer, D. Freitag, A. Kettrup, J. Chromatogr., A 807 (1998) 89.
- [11] P. Jác, M. Polášek, M. Pospíšilová, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 805.
- [12] J. Valls, S. Millán, M. Pilar Martí, E. Borrás, L. Arola, J. Chromatogr., A 1216 (2009) 7143.
- [13] J. Šafa, M. Pospíšilová, A. Kavalířová, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1022.
- [14] J. Palmer, S. Atkinson, W.Y. Yoshida, A.M. Stakup, J.P. Ianders, Electrophoresis 19 (1998) 3045.
- [15] M. Haunschild, W. Buchberger, C.W. Klampfl, J. Chromatogr., A 1213 (2008) 88.
- [16] Ph. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, Anal. Chem. 70 (1998) 3798.
- [17] Q.Y. Zhu, A. Zhang, D. Tsang, Y. Huang, Z.-Y. Chen, J. Agric. Food. Chem. 45 (1997) 4624.
- [18] I.G. Zenkevich, A.Y. Eshchenko, S.V. Makarova, A.G. Vitenberg, Y.G. Dobryakov, V.A. Utsal, Molecules 12 (2007) 654.
- [19] G.L. Sillen, A.E. Martell, Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Special publication No. 17, The Chemical Society, London, UK, 1964 p. 472.
- [20] M. Polášek, I. Petříška, M. Pospíšilová, L. Jahodář, Talanta 69 (2006) 192.
- [21] P. Jác, M. Polášek, A.L.V. Batista, I. Kaderová, Electrophoresis 29 (2008) 843.
- [22] M.L. Ramos, M.M. Caldeira, V.M.S. Gil, Carbohydr. Res. 329 (2000) 387.
- [23] M.L. Ramos, M.M. Caldeira, V.M.S. Gil, Carbohydr. Res. 286 (1996) 1.
- [24] J.J. Cruywagen, L. Kruger, E.A. Rohwer, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 7 (1991) 1727.
- [25] J.J. Cruywagen, L. Kruger, E.A. Rohwer, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1 (1993) 105.
- [26] J.J. Cruywagen, E.A. Rohwer, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 21 (1995) 3433.
- [27] A.S. Amin, M.E. Moustafa, H.A. Dessouki, A. Abd-Allah, Quim. Anal. 20 (2001) 93.
- [28] G. Gübitz, M.G. Schmid, J. Chromatogr., A 1204 (2008) 140.
- [29] M.G. Schmid, M. Laffranchini, D. Dreveny, G. Gübitz, Electrophoresis 20 (1999) 2458.
- [30] A. Karbaum, T. Jira, J. Chromatogr., A 874 (2000) 285.
- [31] M.G. Schmid, O. Lencik, U. Sitte, G. Gübitz, J. Chromatogr., A 875 (2000) 307.
- [32] X. Lu, Y. Chen, L. Guo, Y. Yang, J. Chromatogr., A 945 (2002) 249.
- [33] Z.X. Zheng, Y. Wei, J.M. Lin, Electrophoresis 25 (2004) 1007.
- [34] J. Koidl, H. Hödl, M.G. Schmid, S. Pantcheva, T. Pajpanova, G. Gübitz, Electrophoresis 26 (2005) 3878.
- [35] H. Hödl, A. Krainer, K. Holzmillner, J. Koidl, M.G. Schmid, G. Gübitz, Electrophoresis 28 (2007) 2675.
- [36] L. Qi, Y. Han, M. Zuo, Y. Chen, Electrophoresis 28 (2007) 2629.
- [37] H. Hödl, M.G. Schmid, G. Gübitz, J. Chromatogr., A 1204 (2008) 210.
- [38] L. Qi, Y. Chen, M. Xie, Z. Guo, X. Wang, Electrophoresis 29 (2008) 4277.
- [39] L. Qi, M. Liu, Z. Guo, M. Xie, C. Qiu, Y. Chen, Electrophoresis 28 (2007) 4150.
- [40] J. Kang, D. Kutscher, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, A. Sana-Medel, Electrophoresis 30 (2009) 1774.
- [41] L. Qi, J. Qiao, G. Yang, Y. Chen, Electrophoresis 30 (2009) 2266.
- [42] L. Qi, G. Yang, Electrophoresis 30 (2009) 2882.
- [43] L. Qi, G. Yang, J. Sep. Sci. 32 (2009) 3209.
- [44] S. Kodama, A. Yamamoto, R. Ito, K. Sakamoto, A. Matsunaga, K. Hayakawa, Analyst (Cambridge, UK) 129 (2004) 1238.
- [45] S. Kodama, A. Yamamoto, R. Ito, S. Aizawa, K. Nakagomi, K. Hayakawa, Electrophoresis 26 (2005) 3884.
- [46] S. Kodama, S. Aizawa, A. Taga, T. Yamashita, A. Yamamoto, Electrophoresis 27 (2006) 4730.
- [47] V. Cucinotta, A. Guffrida, G. Grasso, G. Maccarrone, G. Vecchio, Analyst (Cambridge, UK) 128 (2003) 134.
- [48] V. Cucinotta, A. Guffrida, D.L. Mendola, G. Maccarrone, A. Puglisi, E. Rizzarelli, G. Vecchio, J. Chromatogr., B 800 (2004) 127.
- [49] B. Wu, Q. Wang, Q. Liu, J. Xie, L. Yun, Electrophoresis 26 (2005) 1013.
- [50] S. Fanali, An Introduction to Chiral Analysis by Capillary Electrophoresis, Bio-Rad Bulletin ([http://www.bio-rad.com/Life-Science/pdf/Bulletin\\_1973.pdf](http://www.bio-rad.com/Life-Science/pdf/Bulletin_1973.pdf); accessed 12 July 2010).
- [51] Y. Hsu, W.Th. Kok, Electrophoresis 29 (2008) 80.
- [52] M.G. Schmid, N. Grobuschek, C. Tuscher, G. Gübitz, A. Vegvari, E. Maruska, A. Maruska, S. Hjerten, Electrophoresis 21 (2000) 3141.
- [53] M.G. Schmid, N. Grobuschek, O. Lencik, G. Gübitz, Á. Végvári, S. Hjerten, Electrophoresis 22 (2001) 2616.
- [54] Z. Chen, T. Hobo, Anal. Chem. 73 (2001) 3348.
- [55] Z. Chen, T. Hobo, Electrophoresis 22 (2001) 3339.
- [56] Z. Chen, M. Niitsuma, K. Uchiyama, T. Hobo, J. Chromatogr., A 990 (2003) 75.
- [57] Z. Chen, T. Nishiyama, K. Uchiyama, T. Hobo, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 17.
- [58] E. Pittler, N. Grawatsch, D. Paul, G. Gübitz, M.G. Schmid, Electrophoresis 30 (2009) 2897.
- [59] S. Mirzahi, D. Rizkov, A.I. Shames, O. Lev, Electrophoresis 29 (2008) 3941.
- [60] R. Castro, M.V.G. Moreno, R. Natera, F. García-Rowe, M.J. Hernández, C.G. Barroso, Chromatographia 56 (2002) 57.
- [61] J. Dahlén, J. Hagberg, S. Karlsson, Fresenius' J. Anal. Chem. 366 (2000) 488.
- [62] A.F. Faria, M.V.N. Souza, R.E. Bruns, M.A.L. Oliveira, J. Chromatogr., A 1202 (2008) 224.
- [63] S. Kodama, Y. Ito, A. Taga, Y. Nomura, A. Yamamoto, S. Chinaka, K. Suzuki, T. Yamashita, T. Kemmel, K. Hayakawa, J. Health Sci. 54 (2008) 602.
- [64] A.J. Gavron, S.M. Lunte, Electrophoresis 21 (2000) 2067.
- [65] A.J. Gavron, S.M. Lunte, Electrophoresis 21 (2000) 3205.
- [66] N.A. Lacher, K.E. Garrison, S.M. Lunte, Electrophoresis 23 (2002) 1577.
- [67] European Pharmacopoeia, 6th edition, Council of Europe, Strasbourg, France, 2007.
- [68] The United States Pharmacopoeia 30, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, 2007.

## Příloha II



## Assay of Citrus Flavonoids, Troxerutin, and Ascorbic Acid in Food Supplements and Pharmaceuticals by Capillary Zone Electrophoresis

Jitka Šírká · Andrea Martincová · Marie Pospíšilová · Miroslav Polásek

Received: 11 December 2012 / Accepted: 21 January 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Capillary electrophoretic method suitable for the assay of citrus flavonoids (hesperidin, diosmin, and rutin), troxerutin, and ascorbic acid in food supplements and pharmaceutical formulations was devised and validated. The separation was carried out at 25 kV in uncoated fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  i.d.; total length, 32 cm (21 cm to detector); and spectrophotometric detection at 280 nm) maintained at 25 °C with 40 mM sodium tetraborate buffer of pH 9.5 containing 25 % (v/v) of methanol as the background electrolyte. The samples were injected hydrodynamically (50 mbar, 6 s). The calibration curves were linear (correlation coefficients  $r=0.9994\text{--}0.9998$ ) for 0.05–0.50 mg/mL of hesperidin, diosmin, rutin, and troxerutin and 0.10–1.00 mg/mL of ascorbic acid when using cinnamic acid (0.05 mg/mL) as internal standard (IS). The LOQ values (S/N=10) ranged between 0.02 and 0.04 mg/mL of an analyte. The intra- and interday repeatability of migration times and corrected peak areas was characterized by RSD  $\leq$  3.6 %. Single CE analysis of a standard mixture containing all five analytes and the IS took less than 11 min. Accuracy of the method was evaluated by the added/found analyte recovery experiments (recoveries, 95.5–99.8 %). The method was applied to the analysis of five commercially available food supplements and pharmaceuticals.

**Keywords** Ascorbic acid · Capillary zone electrophoresis · Citrus flavonoids · Pharmaceuticals · Nutraceuticals · Troxerutin

J. Šírká · A. Martincová · M. Pospíšilová · M. Polásek (✉)  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic  
e-mail: polasek@faf.cuni.cz

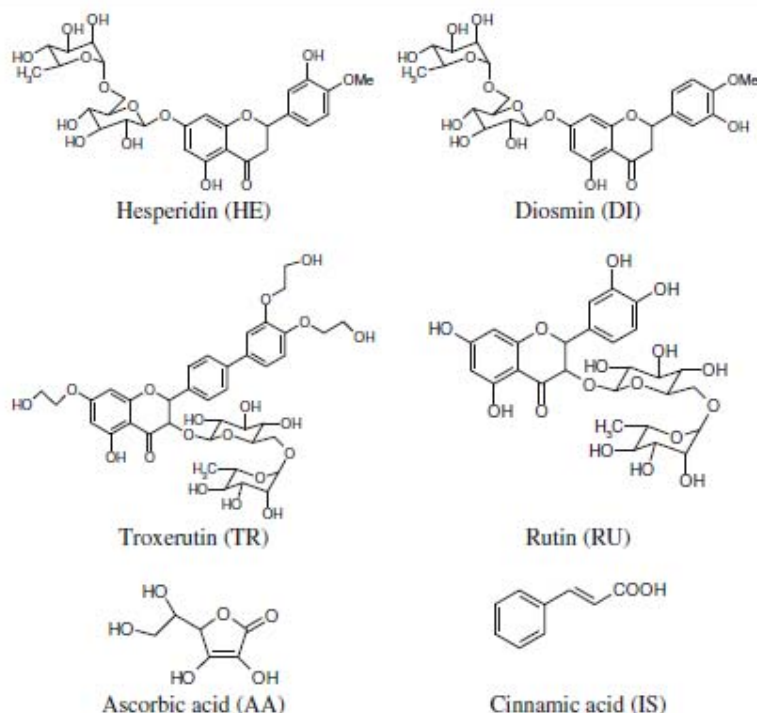
### Introduction

Citrus flavonoids are polyphenolic compounds structurally derived from flavanone, flavone, and/or flavonol. These natural antioxidants have been studied and reported for various health beneficial functions: anti-carcinogenic, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-allergic, cardiovascular, etc. However, the mechanisms of action are not completely known; it seems that their antioxidant capacity is the decisive factor (Benavente-García et al. 1997; Benavente-García and Castillo 2008; Tripoli et al. 2007).

Owing to positive effects on vascular system (Benavente-García et al. 1997; Hodgson and Croft 2006; Garg et al. 2001), the citrus flavonoids hesperidin (HE) ((2S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-one), diosmin (DI) (5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one), rutin (RU) (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy)methyl]oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one), and its trihydroxyethylated derivative troxerutin (TR) (2-[3,4-bis(2-hydroxyethoxy)phenyl]-5-hydroxy-7-(2-hydroxyethoxy)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-(6-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside) (for chemical structure, see Fig. 1) play important role in the medication of vascular system disorders (Garg et al. 2001). Preparations based on the citrus flavonoids are frequently formulated with addition of ascorbic acid (AA) or other antioxidant (e.g., tocopherol or carotenoids). The contribution of AA and flavonoids to antioxidant potential has been studied, and the



**Fig. 1** Chemical structure of the analytes and internal standard (IS)



results revealed that the overall antioxidant effect is more dependent on interactions among the all-mixture components rather than on particular interactions of individual flavonoids with AA (Gardner et al. 2000; González and Nazareno 2011).

Recently published liquid chromatographic assays of AA, DI, HE, RU, and/or TR (as single analytes or in combination with some other substances) comprise a number of matrices, such as citrus fruit (He et al. 2011), peel (Londono-Londono et al. 2010), and extracts (Hamdan et al. 2011); human plasma (Cui et al. 2011) and urine (Baranowska and Magiera 2011); plants (Klimek et al. 2010); plants and pharmaceuticals (El-Shafie and El-Domiaty 2001); chicken plasma; and rat urine (Yang et al. 2007). The CE has strong position in the separation of four compounds of interest as well. The CE applications concern analysis of citrus fruits (HE) (Peng et al. 2006), peel (HE, RU, and AA) (Wu et al. 2007), and pericarpium (HE) (Chen et al. 2002), wines (RU) (Peres et al. 2009), Chinese traditional medicines (HE) (Zhao et al. 2003), tears (AA) (Georgakopoulos et al. 2010), and human urine (AA) (El-Hady et al. 2008). The CE with indirect  $C^{4}D$  detection was employed to separate five flavonoids and to determine naringenin in a phytomedicine containing five different herbal drugs (Bachmann et al. 2007).

In the CE assays listed above, borate buffers were typically used as separation background electrolytes (BGEs) (except of Bachmann et al. 2007). With respect to mostly polyhydric character of the analytes, the use of borate is quite reasonable due to ability of such molecules to form negatively charged complex species with borate resulting in the improvement of selectivity and sensitivity of the CE separations (Siroka et al. 2011). Recently, various mixtures of flavonoids or mixtures of phenolic acids with flavonoids were analyzed by pressurized capillary electrochromatography (Wang et al. 2009), by pressurized liquid extraction–capillary electrochromatography (Chen et al. 2009), by microemulsion electrokinetic chromatography using surfactant-coated single-wall carbon nanotubes as additive to the mobile phase containing also sodium tetraborate (pH 9.0), heptane, sodium dodecylsulfate, and 1-butanol (Cao et al. 2010), and by 2-dimensional liquid chromatography–micellar electrokinetic chromatography (Cesla et al. 2012). To the best of our knowledge, none of the CE methods published so far was employed for the complete assay of all active components in nutraceuticals or pharmaceuticals containing combination of AA and more than two citrus flavonoids.

## Materials and Methods

### Equipment

The analyses were performed on Beckman Coulter capillary electrophoretic system P/ACE™ MDQ (Fullerton, CA) equipped with DAD and 32Karat™ software (version 5.0) for data collection and processing. The pH of electrolytes was measured by PHM 220 (Radiometer, France) pH meter with PHC2401-8 combined glass electrode calibrated with standard aqueous Radiometer buffers. All the solutions were degassed in Sonorex RK 31 (Bandelin Electronic, Germany) ultrasonic bath prior to the CE analysis.

### Capillary Electrophoretic Procedures

The separations were performed in 32 cm long (21 cm effective length), 50  $\mu\text{m}$  i.d., 360  $\mu\text{m}$  o.d. internally uncoated fused-silica capillary. The daily conditioning before and after the separations was carried out at 1,500 mbar for 10 min with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, and ultrapure water. The flushing between the runs was performed at 1,000 mbar with 0.1 M NaOH for 2 min, ultrapure water for 2 min, and the BGE for 3 min.

### Chemicals

Acetonitrile, AA at  $\geq 99\%$ ,  $\alpha$ -cyclodextrin hydrate,  $\beta$ -cyclodextrin hydrate, boric acid for electrophoresis, cinnamic acid at  $\geq 99\%$ , DI at 95 %, DMSO, ethanol, methanol (MeOH), RU hydrate at 95 %, sodium tetraborate decahydrate at 99 %, sodium hydroxide, sorbic acid at  $\geq 99\%$ , and TR at  $\geq 80,0\%$  were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Benzoic acid and HE 90 % were purchased from Fluka (Germany). Methylparaben and propylparaben were purchased from RNDr. Jan Kulich Company (Hradec Kralove, Czech Republic), propan-2-ol from Penta a.s.

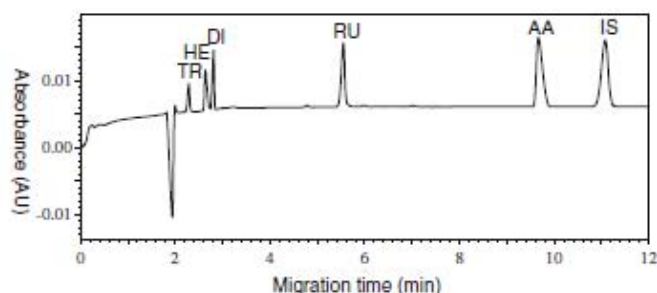
(Czech Republic) and butan-1-ol from Lachema a.s. (Czech Republic). All chemicals listed without purity specification were of analytical grade. Ultra-pure water was produced by the Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA). Asconutin tablets (Zentiva, Czech Republic), Cilkanol capsules (Zentiva, Czech Republic), Detralex tablets (Les Laboratoires Servier, France), Hemodin Prebio Forte tablets (Valosun a.s., Czech Republic) and HemoStop ProBio capsules (Simply You s.r.o., Czech Republic) were purchased from the local pharmacy.

### Standard and Electrolyte Solutions

Stock solution of the standard mixture (used for method optimization) containing HE, DI, RU, TR, AA, and cinnamic acid as internal standard (IS; 0.25 mg/mL of each) was prepared by dissolving the weighted amounts of the compounds in a mixture of DMSO/MeOH/H<sub>2</sub>O 40:45:15 (v/v/v).

For calibration purposes, individual solutions of the analytes were prepared (2.5 mg/mL of HE and DI in DMSO, 2.5 mg/mL of RU and TR in MeOH, 10 mg/mL of AA in water). Thereafter these solutions were mixed together and diluted with DMSO/MeOH/H<sub>2</sub>O 40:45:15 (v/v/v) to obtain one stock calibration solution containing 0.5 mg/mL of HE, DI, RU, TR, and 1 mg/mL of AA. The final calibration solutions containing 0.05–0.50 mg/mL of HE, DI, RU, and TR, 0.1–1.00 mg/mL of AA, and 0.05 mg/mL of the IS were prepared by mixing appropriate volumes of the stock calibration solution with the stock solution of the IS containing 1 mg/mL of cinnamic acid in MeOH and diluting the mixtures with DMSO/MeOH/H<sub>2</sub>O 40:45:15 (v/v/v).

The BGEs were prepared by dissolving the weighted amount of sodium tetraborate in water, adding appropriate amount of MeOH and adjusting the pH with 0.5 M boric acid or 0.1 M sodium hydroxide. All BGEs and standard solutions were degassed and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membrane syringe filters.



**Fig. 2** Electropherogram of standard mixture of analytes. Separation conditions: BGE, 40 mM sodium tetraborate of pH 9.5 containing 25 % (v/v) of MeOH; voltage, 25 kV; 25 °C; and detection at 280 nm. Generated current was about 90  $\mu\text{A}$ . Concentration of

analytes: troxerutin (TR), hesperidin (HE), diosmin (DI), and rutin (RU) 0.15 mg/mL; ascorbic acid (AA), 0.30 mg/mL; and cinnamic acid (internal standard (IS)), 0.05 mg/mL.



Quantitative Analysis

Corrected peak area ratios  $A_x/A_{IS}$  ( $A_x$  is the peak area of analyte corrected with the analyte migration time and  $A_{IS}$  is the peak area of the IS corrected with the IS migration time) were involved in calculations of validation parameters and in the analysis of nutraceutical and pharmaceutical preparations.

The linearity of the method was examined in the range 0.05–0.50 mg/mL of HE, DI, RU, and TR and 0.1–1.0 mg/mL of AA (six calibration solutions were measured in triplicate under the optimal conditions). The parameters of calibration curves relating the corrected peak area ratios to concentration of the analytes were evaluated by linear regression. The LOQ values were assessed at  $S/N=10$ . Precision was estimated as run-to-run repeatability ( $n=6$ ) and as intermediate precision during 3 days testing of the same solution ( $n=18$ ) for migration times and corrected peak area ratios at single concentration level (0.15 mg/mL for TR, HE, DI, RU, and 0.3 mg/mL for AA); the results were expressed as corresponding RSD values.

The accuracy was evaluated by standard additions at one concentration level into the tablet or capsule test solutions (prepared as indicated in 2.6) and expressed as percentage of recoveries and their RSD values ( $n=6$ ).

Analyses of Nutraceutical and Pharmaceutical Preparations

The tablets or the contents of the capsules were weighed, homogenized, and subjected to extraction with DMSO in ultrasonic bath for 15 min. According to the expected content of analytes in individual preparations, the solutions were treated with the stock solution of the IS and further diluted with DMSO, MeOH, and water to get 40:45:15 (v/v/v) proportion of DMSO/MeOH/H<sub>2</sub>O and the concentrations of analytes within the calibration range. All the test solutions were filtered through 0.45 μm membrane syringe filters prior the CE analysis. The peaks of analytes were identified by spiking the test solution with corresponding standards. The final test solutions were analyzed six times during 1 day, and the concentration of the analyte was related to that of a standard solution measured in parallel. The content of individual analytes in one tablet or capsule was expressed as percentage of the content found relative to the nominal (label) content of the active substance.

Results and Discussion

Method Optimization

Since borate-based buffers proved successful as BGEs in previous studies due to specific beneficial interaction of borate with polyhydric analytes (see “Introduction”) only borate

Table 1 Analytical and calibration parameters of the CZE method

	Number <sup>a</sup>	ASM	$R_s$	Intraday repeatability of migration times/corrected peak area ratios (RSD %; $n=6$ )	Interday repeatability of migration times/corrected peak area ratios (RSD %; $n=18$ )	Equation of calibration curve ( $y=kx+b$ ) <sup>b</sup>	$r$	$S_k$	$S_q$	LOQ (mg/mL)	LOD (mg/mL)
TR	15569	0.83	TR/HE 3.96	1.27/1.65	2.03/1.28	$y=4.2506x-0.0316$	0.9997	0.0508	0.0142	0.05	0.02
HE	11561	1.38	HE/DI 2.10	1.08/0.72	2.36/0.75	$y=6.8836x-0.0378$	0.9996	0.0944	0.0262	0.05	0.02
DI	28024	0.81	DI/RU 27.5	0.99/0.94	1.89/2.63	$y=5.9244x+0.0099$	0.9998	0.0662	0.0185	0.04	0.01
RU	33191	0.88	RU/AA 9.38	1.54/1.49	3.56/1.07	$y=6.1827x+0.0024$	0.9995	0.0969	0.0270	0.06	0.02
AA	21495	2.08	AA/IS 5.32	1.02/2.17	1.95/2.43	$y=9.6831x-0.4375$	0.9994	0.1624	0.0910	0.13	0.04

The repeatability measurements were carried out at 0.15 mg/mL for TR, HE, DI, and RU and at 0.3 mg/mL for AA

ASM asymmetry,  $R_s$  resolution,  $r$  correlation coefficient,  $S_k$  standard deviation of slope,  $S_q$  standard deviation of intercept

<sup>a</sup> Number of theoretical plates for capillary of 21 cm effective length

<sup>b</sup>  $y$  stands for corrected peak area ratio and  $x$  stands for concentration of analyte that equals 0.10–1.00 mg/mL for AA and 0.05–0.50 mg/mL for the rest of the analytes

buffer was utilized in our study and optimized with respect to its pH (8.0–9.8) and concentration (20–50 mM tetraborate). At pH 8.0–8.5, the separation was poor, with increasing pH the migration times of analytes increased as well as peak resolution. At pH 9.8, the separation became relatively lengthy and the generated operational current exceeded 100  $\mu$ A. Therefore BGE of pH 9.5 was chosen as optimal leading to compromise in terms of achieving good resolution, shorter migration times, and better peak shapes. Rising concentration of borate in the BGE resulted in prolonged migration times and improved resolution; with 40 mM sodium tetraborate, the peaks were well shaped and separated and the time of analysis was acceptable.

Considering relatively low solubility of some of the analytes (namely DI and HE) in purely aqueous solutions the effect of the addition of organic solvents (MeOH, ethanol, and ACN) into the BGE was tested. Below 10 % (v/v) of ethanol or ACN in the BGE the peak resolution was unsatisfactory and at higher content of these solvents problems with solubility of sodium tetraborate appeared. Therefore, further investigation was focused on the effect of the content of 10–30 % MeOH (v/v). For 10 % (v/v) of MeOH the peaks of HE and DI were not separated while in BGE containing 25 % (v/v) of MeOH-sufficient resolution of HE and DI was achieved. With 30 % (v/v) of MeOH, the time of analysis was prolonged, asymmetry of the peak of HE increased, and unstable running current was generated. Hence, 25 % (v/v) of MeOH was the best option. Finally, the effect of additions of neutral CDs ( $\alpha$ -CD or  $\beta$ -CD) to the BGE was tested but the presence of these CDs was not beneficial.

UV absorption spectra of the separated analytes recorded by the DAD of the CE setup were analyzed to find optimum detection wavelength for the whole group of analytes. Although at 200 nm the sensitivity of detection was fairly high for all analytes, a partial interference of DMSO (used for extraction of the analytes from real samples and co-migrating with the EOF) with the peak of TR had occurred at this wavelength. Additional absorption maxima were

observed around 260 nm for TR, DI, RU, and AA and at 280 nm for HE. The detection wavelength of 280 nm was chosen compromisingly.

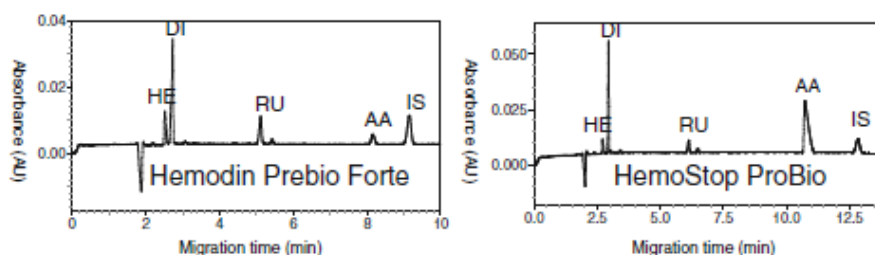
Five compounds (benzoic acid, cinnamic acid, sorbic acid, methylparaben, and propylparaben) were tested as potential IS that would migrate shortly after the “slowest” analyte (AA), exhibit symmetric peak and allow sensitive enough detection at 280 nm. Cinnamic acid was chosen as the optimal IS since it met these criteria to a large extent.

Other parameters optimized were injection time (6–12 s), injection pressure (50–100 mbar), applied voltage (15–30 kV), and temperature (15–30 °C). Optimum separation was achieved at 25 °C with applied voltage of 25 kV, injection pressure at 50 mbar, and injection time of 6 s.

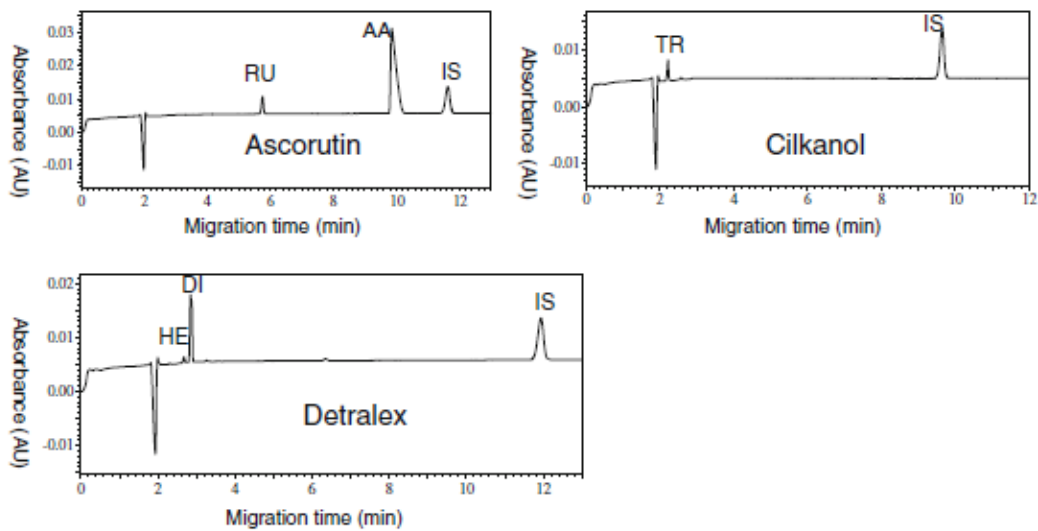
Electropherogram of a standard mixture of all analytes separated under the optimum conditions (in summary, 40 mM tetraborate buffer of pH 9.5 containing 25 % (v/v) of MeOH, applied voltage of 25 kV, temperature at 25 °C, detection wavelength at 280 nm, and hydrodynamic injection at 50 mbar for 6 s) is presented in Fig. 2. The analysis of the standard mixture took approximately 11 min mainly due to longer migration times of RU and AA. Data related to system suitability testing (resolution, peak asymmetry, and number of theoretical plates) calculated automatically by the 32Karat™ software are presented in Table 1.

#### Method Validation

For the method validation data, see Table 1. The devised method showed excellent linearity (correlation coefficients, >0.999) for TR, HE, DI, and RU in the range 0.05–0.50 mg/mL and for AA in the range 0.10–1.0 mg/mL. Sensitivity expressed as LOQ (S/N=10) is sufficient for the determination of all the analytes in pharmaceutical formulations or food supplements involved in the study. Interday precision evaluated at one concentration level (0.15 mg/mL for TR, HE, DI, RU, and 0.3 mg/mL for AA) within the span of 3 days ( $n=18$ ) was characterized



**Fig. 3** Electropherograms of nutraceuticals HemoStop ProBio and Hemodin Prebio Forte. Separation conditions: BGE, 40 mM sodium tetraborate of pH 9.5 containing 25 % (v/v) of MeOH; voltage, 25 kV; 25 °C; and detection at 280 nm. Generated current about 90  $\mu$ A



**Fig. 4** Electropherograms of pharmaceuticals Ascorutin, Cilkanol, and Detralex. Separation conditions: BGE, 40 mM sodium tetraborate of pH 9.5 containing 25 % (v/v) of MeOH; voltage, 25 kV; 25 °C; and detection at 280 nm. Generated current about 90  $\mu$ A

by RSDs of 1.89–3.56 % for migration times and 0.75–2.63 % for corrected peak area ratios. More detailed analytical figures of merit summarized in Table 1 indicate that the devised method has good potential for practical applications in quality testing of formulations containing antioxidants such as AA and citrus flavonoids.

#### Analysis of Food Supplements and Pharmaceutical Formulations

Considering relatively low solubility of some flavonoids, such as HE and DI in water quantitative extraction of the active principles from the formulations had to be realized with

**Table 2** Assay of the active substances in commercial preparations and accuracy test

	NC (mg)	Found <sup>a</sup> (% (RSD %; n=6))	Added <sup>b</sup> ( $\mu$ g/mL)	Found <sup>c</sup> ( $\mu$ g/mL)	Recovery (% (RSD %; n=3)) <sup>d</sup>
<b>Ascorutin tablets</b>					
RU	20	96.34 (0.57)	150.9	148.7	98.5 (0.60)
AA	100	98.95 (2.36)	780.5	771.6	98.9 (1.75)
<b>Cilkanol capsules</b>					
TR	300	97.63 (2.74)	203.0	195.2	96.2 (1.58)
<b>Detralex tablets</b>					
DI	450	99.59 (2.80)	361.0	344.8	95.5 (4.29)
HE	50	95.79 (0.81)	356.2	353.0	99.1 (0.11)
<b>Hemodin Prebio Forte tablets</b>					
DI	225	98.56 (2.92)	330.6	318.8	96.5 (3.25)
HE	75	97.09 (4.44)	406.7	408.3	99.6 (1.48)
RU	40	96.45 (1.13)	251.9	251.3	99.8 (4.69)
AA	20	99.71 (2.32)	129.3	126.9	98.1 (4.06)
<b>HemoStop ProBio capsules</b>					
DI	405	98.77 (3.12)	298.5	285.5	95.6 (1.15)
HE	45	98.10 (3.86)	322.7	312.8	97.0 (6.09)
RU	20	97.77 (1.01)	148.3	144.2	97.3 (0.45)
AA	107	101.60 (1.78)	765.1	739.0	96.6 (1.17)

NC nominal content of the active substance per single tablet or capsule

<sup>a</sup>Percent of nominal content found

<sup>b</sup>Micrograms per milliliter of analyte added to the injected test solution

<sup>c</sup>Found micrograms per milliliter of analyte added to the injected test solution

<sup>d</sup>Percentage of found/added



DMSO and the extract was subsequently stabilized by dilution with MeOH and water (see "Analyses of nutraceutical and pharmaceutical preparations") before the CE separation.

Electropherograms of extracts from commercial food supplements and pharmaceutical formulations are depicted in Figs. 3 and 4, respectively. A very few minutes unidentified peaks occurred in electropherograms of preparations containing HE and DI, but because of their favorable migration time values, they did not interfere with the CE assay of the active principles (cf. Fig. 3). Benzoic acid, cinnamic acid, sorbic acid, methylparaben, and propylparaben were examined as candidates for IS. Cinnamic acid with its migration time value close to that of the last migrating analyte (AA) absorbed well at the detection wavelength, its peak was symmetric and ensured best reproducibility of the assay of all analytes including AA. It can be clearly seen that the selection of cinnamic acid as IS for the analysis of samples containing AA was reasonable and that the separation takes typically less than 12 min. On the other hand, in the case of preparations not containing RU and AA (Cikanol and Detralex, see Fig. 4), the use of other IS with shorter migration time could reduce the time of analysis down to 4 min (not attempted in this study).

The results of the determination of TR, DI, HE, RU, and AA in the formulations are shown in Table 2 together with the recovery data. The intraday precision of corrected peak area ratios ( $A_x/A_{IS}$ ) was characterized by RSDs ranging between 0.57 and 4.44 % ( $n=6$ ) for all the analytes and all formulations analyzed. All recovery values fit into range 95.5–99.8 % with RSD values of  $\leq 5$  % (except of HE in Hemostop ProBio with RSD=6.09 %).

To the best of our knowledge, no other CE method allowing simultaneous determination of TR, HE, DI, RU, and AA in food supplements or pharmaceuticals has been published so far. Compared with our method, the determination of HE, RU, and AA in grapefruit fruit and peel by CE employing electrochemical detection (Wu et al. 2007) is more sensitive (LODs  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ), but it is characterized by longer migration times (22 min) and worse resolution between the peaks of RU and AA. In a sensitive HPLC/UV method (LODs  $\leq 0.05$   $\mu\text{g/mL}$ ) dealing with the determination of six flavonoids (including RU) and TR in rat urine and chicken plasma (Yang et al. 2007), the retention time of RU was 5 min which is similar to migration time of RU in our method while the retention time of TR was 6 min (compared with 2.5 min in our paper).

## Conclusions

In the recent two decades, plethora of food supplements is supposed contain, e.g., mixtures of antioxidants involving different flavonoids and AA appeared in the market. In contrast to pharmaceutical preparations, in most countries

the food supplements need not comply with criteria for clinical testing of drugs; therefore, the state health authorities do not attempt to approve their efficiency. It means that there is also a lack of validated analytical methods appropriate for confirming identity of active principles and determining their content in food supplements as a tool supporting curative claim appearing on the product packing.

This work presents a novel CE method facilitating reliable and relatively rapid identification and quantification of antioxidants DI, HE, RU, TR, and AA not only in pharmaceuticals but particularly in multicomponent food supplements.

**Acknowledgments** The financial support from Charles University Project SVV 2012–265 002 is gratefully acknowledged.

**Conflict of Interest** The authors have declared no conflict of interest.

## References

- Bachmann S, Huck CW, Bakry R, Born GK (2007) *Electrophoresis* 28:799
- Baranowska I, Magiera S (2011) *Anal Bioanal Chem* 399:3211
- Benavente-García O, Castillo J (2008) *J Agric Food Chem* 56:6185
- Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuno A, Del Río JA (1997) *J Agric Food Chem* 45:4505
- Cao J, Qu H, Cheng Y (2010) *Electrophoresis* 31:1689
- Cesla P, Fischer J, Jandera P (2012) *Electrophoresis* 33:2464
- Chen G, Zhang L, Zhao J, Ye J (2002) *Anal Bioanal Chem* 373:169
- Chen XJ, Zhao J, Meng Q, Li SP, Wang YT (2009) *J Chromatogr A* 1216:7329
- Cui XY, Zhang ML, Guan X, Yin L, Sun YT, Fawcett JP, Gu JK (2011) *Chromatographia* 73:165
- El-Hady DA, Gotti R, El-Maali NA (2008) *J Sep Sci* 31:2252
- El-Shafae AM, El-Domiaty MM (2001) *J Pharm Biomed Anal* 26:539
- Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG (2000) *Food Chem* 68:471
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK (2001) *Phytother Res* 15:655
- Georgakopoulos CD, Lamari FN, Karathanasopoulou IN, Gartaganis VS, Pharmakakis NM, Karamanos NK (2010) *Biomed Chromatogr* 24:852
- González EA, Nazareno MA (2011) *LWT-Food Sci Technol* 44:558
- Hamdan D, El-Readi MZ, Tahrani A et al (2011) *Food Chem* 127:394
- He DX, Shan Y, Wu YH, Liu GZ, Chen B, Yao SZ (2011) *Food Chem* 127:880
- Hodgson JM, Croft KD (2006) *J Sci Food Agric* 86(2492)
- Klimek B, Olszewska MA, Tokar M (2010) *Phytochem Anal* 21:150
- Londono-Londono J, de Lima VR, Lara O, Gil A, Pasa TBC, Arango GJ, Pineda JRR (2010) *Food Chem* 119:81
- Peng Y, Liu F, Ye J (2006) *J Chromatogr B* 830:224
- Peres RG, Micke GA, Tavares MFM, Rodriguez-Amaya DB (2009) *J Sep Sci* 32:3822
- Siroka J, Jac P, Polasek M (2011) *TRAC-Trends Anal Chem* 30:142
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M (2007) *Food Chem* 104:466
- Wang S, Jia L, Chen D (2009) *J Sep Sci* 32:388
- Wu T, Guan Y, Ye J (2007) *Food Chem* 100:1573
- Yang GJ, Liu P, Qu XL et al (2007) *J Chromatogr B* 856:222
- Zhao SG, Chen XG, Hu ZD (2003) *Chromatographia* 57:593