

**KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRFIE
PRO SEPARACI A STANOVENÍ INDOMETHACINU
A JEHO DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ**

Diplomová práce

Školitel diplomové práce: PharmDr. Klára Petřů, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2015

Dagmar Mítlenerová

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

V Lázních Bělhradě, 10.5.2015

Dagmar Mitlenerová

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Kláře Petřů, Ph.D., za odborné vedení diplomové práce a poskytnuté konzultace. Dále děkuji Mgr. Lucii Pincové za pomoc při provádění experimentální části diplomové práce, doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc., za cenné rady a ostatním pracovníkům katedry analytické chemie za vstřícnost.

Tato práce je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/30.0061

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Dagmar Mitlenerová

Školitel: PharmDr. Klára Petrů, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Název diplomové práce: Micelární elektrokinetická chromatografie pro separaci a stanovení indomethacinu a jeho degradačních produktů

V této diplomové práci je popsán vývoj a optimalizace metody micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) pro analýzu indomethacinu a jeho degradačních produktů, kyseliny 4-chlorbenzoové (4CHBA) a kyseliny 5-methoxy-2methyl-3indolyloctové (MMIAA). Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm) při vkládaném napětí 15 kV a teplotě kapiláry 25°C. Vlnové délky pro UV detekci byly 224 nm a 234 nm. Optimální základní elektrolyt obsahoval: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS (pH 7,0) a 10% (v/v) methanol. Vnitřním standardem byla kyselina 1-naftyloctová (5 $\mu\text{g/ml}$). Pro zvýšení citlivosti metody byla použita metoda zakoncentrování vzorku z velkého objemu. Směs standardů byla dávkována hydrodynamickým tlakem 100 mBar po dobu 10 s (24% celkového objemu kapiláry). Pro zakoncentrování analytů bylo aplikováno napětí -7,5 kV. Polarita byla přepnuta, po dosažení 95% původní hodnoty proudu, na +15 kV (čas přepnutí 1,5 min). Za optimálních podmínek proběhla analýza standardů v čase kratším, než 7,5 minuty. Kalibrační křivky pro nečistoty byly lineární v rozmezí koncentrací od 0,125 $\mu\text{g/ml}$ do 10 $\mu\text{g/ml}$ s korelačními koeficienty $\leq 0,9992$. RSD opakovatelnosti migračních časů a poměrů ploch dosahovaly hodnot 0,46% a 0,90% (n=6). Limit detekce byl 38 ng/ml (MMIAA) a 36 ng/ml (4CHBA). Opakovatelnost metody (RSD, n=6) byla 6,90% (MMIAA) a 7,11% (4CHBA). Bylo provedeno předběžné stanovení MMIAA a 4CHBA v léčivém přípravku Indobene gel.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Dagmar Mitlenerová

Supervisor: PharmDr. Klára Petřů, Ph.D.

Consultant: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Title of Diploma Thesis: Micellar electrokinetic chromatography for the separation and assay of indomethacin and its degradations products

A new method of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) for analysis of indomethacin and its degradation products, 4-chlorobenzoic acid (4CHBA) and 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetic acid (MMIAA), was developed and optimized. The separation was carried out in uncoated fused silica capillary (with i.d. 75 μm , total length 33 cm and effective length 24,5 cm) with applied voltage 15 kV and temperature of capillary 25°C. Wave length for UV detection was 224 nm and 234 nm. The optimized background electrolyte contained: 10mM phosphate buffer, 60mM SDS (pH 7,0) and 10% (v/v) of methanol. Internal standard was 1-naftylacetic acid. Large volume sample stacking method was used for sensitivity enhancement. The mixture of standards was injected hydrodynamically at 100 mBar for 10 s (24% of capillary total length). Voltage -7,5 kV was applied for stacking of the analytes. Polarity was switched to +15 kV (time of switching 1,5 min), when 95% of original voltage was reached. Analysis of standards took place in time shorter than 7,5 min under optimal conditions. The calibration curves for the impurities were linear in the range 0,125 $\mu\text{g/ml}$ do 10 $\mu\text{g/ml}$ with correlation coefficients $\leq 0,9992$. The RSD of migration times and areas ratio ranged between 0,46% and 0,90% (n=6). The limit of detection was 38 ng/ml (MMIAA) and 36 ng/ml (4CHBA). The repeatability of the method (RSD, n=6) was 6,90% (MMIAA) and 7,11% (4CHBA). Preliminary assay of MMIAA and 4CHBA in pharmaceutical product Indobene gel was also carried out.

OBSAH

| | |
|---|--------|
| SEZNAM ZKRATEK..... | - 8 - |
| 1. ÚVOD..... | - 10 - |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | - 12 - |
| 2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY | - 13 - |
| 2.1.1. ELEKTROFORÉZA..... | - 13 - |
| 2.1.2. ELEKTROFORETICKÁ POHYBLIVOST | - 14 - |
| 2.1.3. EFEKTIVNÍ POHYBLIVOST..... | - 15 - |
| 2.1.4. ELEKTROOSMOTICKÝ TOK..... | - 15 - |
| 2.1.5. DĚJE OVLIVŇUJÍCÍ SEPARACI..... | - 17 - |
| 2.1.6. INSTRUMENTÁLNÍ PROVEDENÍ..... | - 19 - |
| 2.1.7. PARAMETRY ANALÝZY OVLIVŇUJÍCÍ SEPARACI | - 23 - |
| 2.1.8. SEPARAČNÍ METODY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY | - 25 - |
| 2.2. MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE..... | - 26 - |
| 2.2.1. PRINCIP SEPARACE..... | - 26 - |
| 2.2.2. MIGRACE V MEKC | - 27 - |
| 2.2.3. TENZIDY POUŽÍVANÉ V MEKC..... | - 28 - |
| 2.3. METODY ZAKONCENTROVÁNÍ VZORKU V CE | - 29 - |
| 2.3.1. ELEKTROFORETICKÉ METODY..... | - 30 - |
| 2.3.2. CHROMATOGRAFICKÉ METODY | - 32 - |
| 2.3.3. ZAKONCENTROVÁNÍ VZORKU V MEKC..... | - 33 - |
| 2.4. INDOMETHACIN A JEHO DEGRADAČNÍ PRODUKTY..... | - 34 - |
| 2.4.1. INDOMETHACIN | - 34 - |
| 2.4.2. KYSELINA 4-CHLORBENZOOVÁ | - 34 - |
| 2.4.3. KYSELINA 5-METHOXY-2METHYL-3INDOLYLOCTOVÁ | - 35 - |
| 2.5. METODY STANOVENÍ INDOMETHACINU A JEHO DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ..... | - 35 - |
| 3. CÍL PRÁCE | - 37 - |
| 4. PRAKTICKÁ ČÁST | - 39 - |
| 4.1. PŘÍSTROJE..... | - 40 - |
| 4.2. CHEMIKÁLIE | - 40 - |
| 4.3. ROZTOKY..... | - 41 - |
| 4.3.1. ROZTOK ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU..... | - 41 - |
| 4.3.2. ZÁSOBNÍ ROZTOKY STANDARDŮ | - 41 - |
| 4.3.3. ZÁSOBNÍ ROZTOK VNITŘNÍHO STANDARDU | - 41 - |
| 4.3.4. PRACOVNÍ ROZTOKY STANDARDŮ PRO OPTIMALIZACI..... | - 41 - |

| | | |
|--------|--|--------|
| 4.3.5. | ROZTOKY PRO VÝBĚR VNITŘNÍHO STANDARDU | - 42 - |
| 4.3.6. | ZÁSOBNÍ ROZTOKY PRO KALIBRACI | - 42 - |
| 4.3.7. | PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ | - 42 - |
| 4.3.8. | PŘÍPRAVA VZORKU HVLP | - 44 - |
| 4.4. | PRACOVNÍ POSTUPY | - 44 - |
| 4.4.1. | KONDICIONACE KAPILÁRY | - 44 - |
| 4.4.2. | PROMÝVÁNÍ KAPILÁRY | - 44 - |
| 4.4.3. | MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI | - 44 - |
| 4.5. | VÝPOČTY | - 45 - |
| 4.5.1. | LIMIT DETEKCE (LOD), LIMIT KVANTIFIKACE (LOQ) | - 45 - |
| 4.5.2. | FAKTOR SYMETRIE (AS) | - 45 - |
| 4.5.3. | ROZLIŠENÍ (RS) | - 46 - |
| 4.5.4. | POČET TEORETICKÝCH PATER (N) | - 46 - |
| 4.5.5. | VÝŠKOVÝ EKVIVALENT TEORETICKÉHO PATRA (H) | - 46 - |
| 4.5.6. | OPAKOVATELNOST ANALÝZY | - 47 - |
| 5. | VÝSLEDKY A DISKUSE | - 48 - |
| 5.1. | OPTIMALIZACE METODY PRO STANOVENÍ DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ INDOMETHACINU - 49 - | |
| 5.1.1. | OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO MEKC | - 49 - |
| 5.1.2. | OPTIMALIZACE LVSS | - 59 - |
| 5.1.3. | OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE | - 60 - |
| 5.1.4. | ZPŮSOBILOST SYSTÉMU | - 61 - |
| 5.2. | KVANTITATIVNÍ ANALÝZA | - 64 - |
| 5.2.1. | KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST PRO MMIAA | - 65 - |
| 5.2.2. | KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST PRO KYSELINU 4-CHLORBENZOVOU | - 66 - |
| 5.3. | LIMIT DETEKCE A KVANTIFIKACE | - 67 - |
| 5.4. | PŘESNOST METODY | - 67 - |
| 5.5. | KONCENTRAČNÍ FAKTOR | - 67 - |
| 5.6. | TESTOVÁNÍ STANOVENÍ DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ V HVLP | - 69 - |
| 5.7. | SROVNÁNÍ S METODOU HPLC | - 70 - |
| 6. | ZÁVĚR | - 71 - |
| 7. | CITOVANÁ LITERATURA | - 73 - |

SEZNAM ZKRATEK

- BGE: základní elektrolyt
- CD: cyklodextriny
- CCD: zařízení s vázanými náboji
- CE: kapilární elektroforéza
- CEC: kapilární elektrochromatografie
- CGE: kapilární gelová elektroforéza
- 4CHBA: 4-chlorbenzoová kyselina
- CIEF: kapilární isoelektrická fokusace
- CMC: kritická micelární koncentrace
- DAD: detektor diodového pole
- DHFS: dihydrogenfosforečnan sodný
- EOF: elektroosmotický tok
- FASS: polem zesílené zakoncentrování vzorku
- GE-SIC: gradientová eluce v sekvenční injekční chromatografii
- HPCE: vysokoúčinná kapilární elektroforéza
- HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HVLP: hromadně vyráběný léčivý přípravek
- IND: Indomethacin
- IS: vnitřní standard
- ITP: izotachoforéza
- LOD: limit detekce
- LOQ: limit kvantifikace
- LVSS: stacking z velkého objemu vzorku
- MEKC: micelární elektrokinetická chromatografie
- MeOH: methanol
- MMIAA: 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová kyselina
- NAA: 1-naftyloctová kyselina
- RP: obrácená polarita
- RSD: relativní směrodatná odchylka
- SDS: dodecylsírán sodný
- SPE: extrakce na tuhou fázi
- UV: ultrafialové záření
- UV-VIS: ultrafialové-viditelné záření
- ZR IS: zásobní roztok vnitřního standardu
- ZR ST: zásobní roztok standardů

1. ÚVOD

Při používání léčivých přípravků mohou vznikat nečistoty v důsledku rozkladu účinné látky nebo interakcí účinné látky s ostatními složkami. Je považováno za nezbytné kontrolovat požadavky na nečistoty. (1)

Hlavním úkolem kontrolně-analytického hodnocení léčiv je zajištění jejich jakosti, bezpečnosti a účinnosti. Tato problematika patří celosvětově v současné farmacii mezi důležité priority. Čistota léčiv velmi úzce souvisí s jejich kvalitou, nicméně lékopisy zpravidla povolují minimální množství doprovodných nečistot, jejichž množství nepředstavuje žádná zdravotní rizika. (2)

Ve farmaceutickém průmyslu je důležité měření hladiny organických molekul, stejně tak jako techniky posuzování profilu nečistot těchto molekul. (3)

Pro hodnocení nečistot organického původu mají dominantní postavení metody chromatografické. (2) Další možnosti nabízí také například metody spektrofotometrické nebo elektroforetické, mezi které patří i kapilární elektroforéza.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektroforézu (CE) lze obecně popsat jako vysoce účinnou separaci vzorku iontového charakteru v kapiláře, o vnitřním průměru 25-100 μm , která je naplněna roztokem elektrolytu. (4)

CE je vnímána jako účinná analytická separační technika, která přináší rychlost, kvantitu, opakovatelnost a automatizaci do elektroforetických metod. Kapilární elektroforéza si vybudovala pozici jako důležitá a široce využívaná metoda pro rutinní analytickou separaci. (5)

Je to separační metoda pro separaci látek iontové povahy, založená na jejich pohybu kapalinou, pod vlivem elektrického pole. Pokud mají dvě analyzované složky rozdílnou elektroforetickou pohyblivost, pak obvykle nastane jejich separace. Separaci umožňuje vodivý elektrolyt, který udržuje potřebné pH a poskytuje dostatečnou vodivost, umožňující průchod elektrického proudu během analýzy. Často jsou do vodivého elektrolytu přidávány další přísady, které upravují rovnováhu separace, a také zabraňují interakci analytů se stěnou kapiláry. (6)

V letech 1833 a 1834 Michael Faraday studoval kvantitativně řadu elektrodových reakcí. Své poznatky shrnul v Zákonech elektrolyzy. To vyvolalo značnou aktivitu ve zbývajících letech 19. století, kdy přední vědci, zejména Hittorf, Helmholtz a Kohlrausch, provedli významné pokusy v oblasti elektroforézy malých anorganických iontů. Nastínili teorie pro mechanismus elektroforézy, objevili roli elektroosmózy a studovali pohyblivost iontů v elektrickém poli ke stanovení fyzikálních parametrů, jako jsou iontové poloměry a velikosti náboje. (7)

Kapilární elektromigrační metody, souhrnně označované jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (high performance capillary electrophoresis- HPCE), se stávají stále více uznávaným protějškem, resp. doplňkem, dosud nejrozšířenějších metod – různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). (8)

2.1.1. Elektroforéza

Elektroforéza je pohyb iontů obsažených ve vzorku pod vlivem vloženého napětí. Částice se pohybuje směrem k příslušné elektrodě a prochází přes detektor. Migrační čas nebo pohyblivost iontu analyzované látky se do značné míry řídí jeho velikostí a velikostí náboje. (4)

2.1.2. Elektroforetická pohyblivost

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ_E , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě: (8)

$$\mu_E = \frac{v}{E}$$

Rovnice 1

μ_E ... elektroforetická pohyblivost

v... rychlost elektroforetického pohybu

E... intenzita elektrického pole

Aktuální elektroforetická rychlost neboli rychlost iontů analyzované směsi je závislá na jejich pohyblivosti a velikosti vloženého napětí. (4)

Elektroforetické pohyblivosti jsou kvalitativními charakteristikami ionogenních látek pro dané prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost iontů silných elektrolytů, vztažená k dané iontové síle a teplotě, se nazývá aktuální pohyblivost, elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečném zředění se nazývá limitní pohyblivost. (8)

Pohyblivost je ovlivněna hybnou silou F_E , která uvádí částici do pohybu. (9)

$$F_E = Q \cdot E$$

Rovnice 2

Q... náboj částice

E... intenzita elektrického pole

Proti této síle působí síla třecí, která je dána odporem kapaliny, ve které se částice pohybuje. (9)

$$F_F = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

Rovnice 3

η ... viskozita

r... poloměr částice

v... rychlost pohybu částice

Krátce potom, kdy je poprvé použita hybná síla, je dosaženo ustáleného stavu. Obě síly jsou vyrovnané, ale působí proti sobě. (9)

$$Q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

Rovnice 4

Elektroforetická pohyblivost se vypočítá z rovnice: (9)

$$\mu E = \frac{Q}{6. \pi. \eta. r. v}$$

Rovnice 5

Z této rovnice je zjevné, že malé, vysoce nabité částice, mají větší pohyblivost, zatímco velké, méně nabité částice, mají nízkou pohyblivost. (9)

2.1.3. Efektivní pohyblivost

Čas, který potřebuje analyzovaná látka, aby se dostala k místu detekce, se nazývá „migrační čas“ a je dán poměrem migrační vzdálenosti a rychlosti. Migrační čas a další experimentálně zjištěné parametry mohou být použity k výpočtu zdánlivé pohyblivosti. (10) Celkový migrační čas rozpouštěné látky se proto vztahuje k pohyblivosti rozpouštěné látky a pohyblivosti elektroosmotického toku. Výraz zdánlivá pohyblivost (μA) se měří od migračního času a je součtem obou pohyblivostí, μE a μEOF : (4)

$$\mu A = \mu E + \mu EOF = \frac{l. L}{t_m. V}$$

Rovnice 6

l... efektivní délka kapiláry

V... napětí

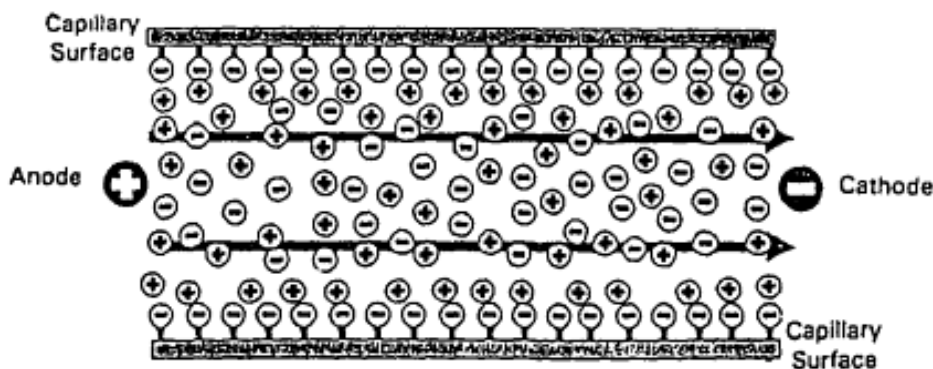
L... celková délka kapiláry

t_m ... migrační čas

2.1.4. Elektroosmotický tok

Aplikace napětí napříč kapilárou, naplněnou elektrolytem, způsobuje tok roztoku podél kapiláry. Tento tok efektivně pumpuje rozpuštěné ionty směrem k detektoru. Tok nastává z důvodu ionizace kyselých silanolových skupin na vnitřní straně kapiláry, při kontaktu s roztokem pufru. Při vysokém pH jsou tyto skupiny disociovány, což má za následek negativní náboj povrchu kapiláry. Vysoký počet kationtů je na mezifázi mezi stěnou kapiláry a roztokem, což je zdroj takzvané elektrické dvojvrstvy, která je tvořena stagnující vrstvou přiléhající ke stěně kapiláry (Sternova vrstva) a difúzní vrstvou, která je pohyblivá (Gouy-Chapmanova vrstva). (4,11)

Pokud je aplikováno napětí, putují kationty ke katodě (Obr.1). Pohybují se také molekuly vody obalující kationty, což způsobuje konečný tok roztoku podél kapiláry. Tento efekt je možné považovat za „elektrickou pumpu“. (4) Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů, a tím i účinnost separace a dobu analýzy. (8)



Obrázek 1: Schéma elektroosmotického toku (4)

Rozsah toku souvisí s nábojem v kapiláře, s viskozitou pufru a s dielektrickou konstantou pufru: (4)

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

Rovnice 7

μ_{EOF} ... pohyblivost elektroosmotického toku

η ... viskozita

ζ ... Zeta potenciál (náboj na povrchu kapiláry)

ϵ ... dielektrická konstanta

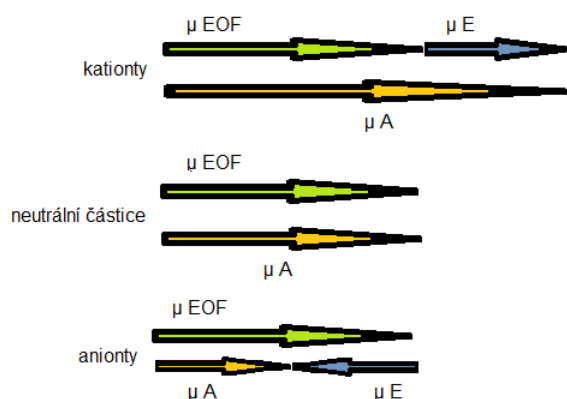
Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož je disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je elektroosmotický tok v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu použitého při elektromigračních separacích.

Mezi pH 3-8 elektroosmotický tok několikanásobně (4-5krát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů.

(8)

Výhodou elektroosmotického toku je, že způsobuje pohyb téměř všech druhů látek, bez ohledu na náboj, ve stejném směru. Za normálních podmínek (tj. negativní náboj povrchu kapiláry) směřuje tok od anody ke katodě. Anionty putují směrem ke katodě, protože velikost toku může být o více než jeden řád větší než jejich elektroforetická pohyblivost. Kationty, neutrální částice a anionty mohou být analyzovány současně, protože se všechny pohybují stejným směrem. Kationty migrují nejrychleji, protože jejich elektroforetická přitažlivost a elektroosmotický tok jsou ve stejném směru, neutrální molekuly jsou všechny unášeny rychlostí elektroosmotického toku, ale nejsou od sebe navzájem separovány, a anionty putují nejpomaleji, neboť jsou přitahovány k anodě, ale stále jsou unášeny elektroosmotickým tokem směrem ke katodě. (Obr. 2)

U analýzy malých iontů, například sodných, draselných, chloridových, není obvykle velikost elektroosmotického toku větší než pohyblivost rozpuštěné látky. Kromě toho úprava náboje stěny kapiláry může snížit elektroosmotický tok, zatímco pohyblivost rozpuštěné látky nechává nedotčenou. (10)



Obrázek 2: *Migrace látek v kapiláře působením EOF*

2.1.5. Děje ovlivňující separaci

2.1.5.1. Molekulární difúze

Molekulární difúze je hlavní příčinou rozšiřování zón rozpuštěných složek při postupu kapilárou. Tato difúze je nejmenší u velkých molekul, např. proteinů a nukleotidů, protože mají malé difúzní koeficienty. Pro tyto látky je možné dosahovat počtu teoretických pater N v řádu milionů, pro menší molekuly v řádu set tisíc. (12)

2.1.5.2. Joulovo teplo

Teplo vznikající průchodem elektrického proudu vodičem se nazývá Joulovo teplo. Hlavní výhodou provádění elektroforézy v kapiláře o úzkém vnitřním průměru je snížení účinků tepla, které obvykle omezuje elektroforetické techniky. Teplo je problematické, protože může způsobit nerovnoměrnost teplotních gradientů, lokální změny ve viskozitě a následné rozšíření zóny. Zatímco teoretické rovnice pro efektivitu a rozlišení podporují používání tak vysokého elektrického pole jak jen to je možné, Joulovo teplo nakonec omezuje výhody tohoto přístupu, bez ohledu na rozměry kapiláry a teplotní regulaci měření. (9)

2.1.5.3. Interakce analytů a povrchu stěny kapiláry

Interakce mezi analyty a stěnou kapiláry má neblahý vliv na účinnost v CE. V závislosti na rozsahu interakce může dojít k chvostování píků, a dokonce k úplné adsorpci analytů na křemennou stěnu kapiláry. Primární příčinou adsorpce jsou iontové interakce mezi kladně nabitými analyty a negativním nábojem stěny, spolu s hydrofilními a hydrofobními interakcemi. Velký povrch kapiláry, který je výhodou pro vedení tepla, ve skutečnosti zvyšuje pravděpodobnost adsorpce. (9)

2.1.5.4. Elektrodisperze

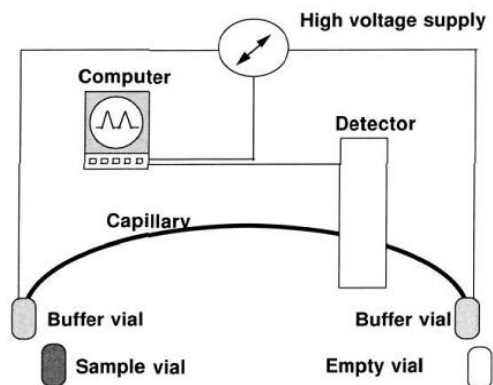
Závislost intenzity elektrického pole na koncentraci analytu uvnitř zóny může vést k jejímu rozšíření procesem zvaným elektrodisperze. Za předpokladu, že se vodivost analyzovaného roztoku zvyšuje se zvyšující se koncentrací analytu, intenzita pole, a z toho důvodu elektroforetická pohyblivost analyzovaných iontů, bude poměrně nižší v této části zóny s vysokou koncentrací analytu. Elektrodisperze je základním jevem v CE a její efekt je více zřetelný se zvyšujícím se množstvím vzorku. (9)

2.1.5.5. Velikost dávkovaného objemu vzorku

Dávkovaný objem vzorku je omezen na 1-5% celkového objemu kapiláry, objemy vzorků se tedy pohybují v nízkých nanolitrových rozmezech, aby se předešlo jejímu přetížení. (13)

2.1.6. Instrumentální provedení

Mezi základní složky instrumentace patří: přívod vysokého napětí; kapilára, která prochází přes optické centrum detekčního systému, napojeného na zařízení pro sběr dat; vstupní zařízení a automatický dávkovač (Obr.3) (4):



Obrázek 3 : *Typické instrumentální uspořádání (4)*

2.1.6.1. Kapiláry

Separční kapiláry jsou připravovány za pomoci rozdílných materiálů: sklo, tavený křemen nebo teflon. Avšak nejvíce používané jsou ty z taveného křemene, kvůli jejich vlastnostem jako je výborná propustnost pro UV a viditelné záření, snadná výroba a jsou relativně levné. Kromě toho jsou obvykle pokryty polymerovou vrstvou, obvykle polyimidovou, která poskytuje pružnost a usnadňuje manipulaci s kapilárou. Tento polyamidový povlak musí být odstraněn v malé části kapiláry za účelem zajištění detekčního okna. (11)

Kapilára je běžně 25 - 100 cm dlouhá a nejčastěji používané vnitřní průměry jsou 50 a 75 μm . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, např. ke snížení adsorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na kapilární stěně. (12)

2.1.6.1.1. Kondicionace kapiláry

Při použití nově instalované kapiláry nebo při změně nového separačního pufre musí být kapilára dostatečně vyvážena separačním pufrem, procesem zvaným kondicionace. (13) Obvykle zahrnuje aktivaci vnitřního křemenného povrchu kapiláry hydroxidem sodným, promytí vodou a pufrem. (11)

2.1.6.1.2. Promývání kapiláry

Údržba kapiláry hraje zásadní roli v udržení opakovatelnosti výsledků kapilární elektroforézy. Stejně jako u jakéhokoli neošetřeného křemenného povrchu, jsou ionizované silanolové skupiny ideální pro interakce s nabitými analyty, zejména peptidy a proteiny, v neutrálním nebo bazickém pH pufru. (13)

Nabízejí se různé strategie pro údržbu kapilár po jejich použití, některé z nich zahrnují promývání hydroxidem sodným, destilovanou vodou a nasávání vzduchu kapilárou nebo promývání kapilárou. (11)

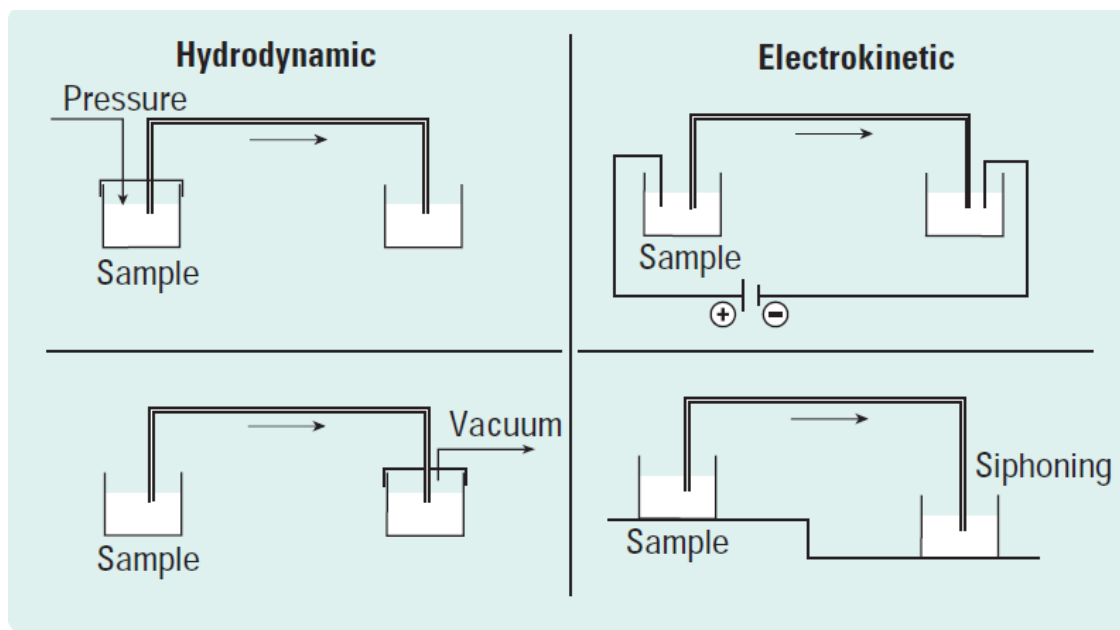
2.1.6.2. Dávkování vzorku

V kapilární elektroforéze jsou rozlišovány dva hlavní způsoby dávkování vzorku, jsou to hydrodynamické dávkování a elektrokinetické dávkování (Obr.4).

Hydrodynamické dávkování je nejvíce používanou metodou. Může být provedeno aplikací tlaku na dávkovací konec kapiláry, vakuem na distálním konci kapiláry nebo sifonovým efektem. (9) Toho se docílí tak, že zásobník s pufrém je nahrazen lahvičkou se vzorkem, a ta je poté pozvednuta do určité výšky na danou dobu, což vytváří výškový rozdíl mezi hladinou ve vzorku a v zásobníku pufru na druhém konci kapiláry. Tento rozdíl ve výšce vytváří hydrostatický tlak, který umožňuje vzorku vniknout do kapiláry. Elektroforetická pohyblivost analytu nebo složení rozpuštěného vzorku neovlivňují tento druh dávkování v CE. (11)

Dávkované množství je obvykle 1 – 50 nL, v závislosti na rozměrech kapiláry. Optimální dávkovací objem obvykle bývá ten největší objem, který může být dávkován bez ztráty rozlišení. (14)

Elektrokinetické dávkování vyžaduje náhradu zásobníku s pufrém, umístěného na konci kapiláry, na který je přiváděno napětí, za zásobník obsahující vzorek. Poté je aplikováno napětí (obvykle 3-5 krát nižší než napětí při separaci) na krátkou dobu (obvykle několik sekund). Tento krátký přívod napětí způsobuje migraci vzorku do kapiláry. Zásobník se vzorkem je opět nahrazen druhým, obsahujícím pufr. Poté je aplikováno separační napětí a začíná elektroforetický proces. (11)



Obrázek 4: **Metody dávkování vzorku v kapilární elektroforéze** (9)

2.1.6.3. Aplikace vysokého napětí

Separace jsou obvykle prováděny za použití napětí v rozsahu 5 - 30 kV. Zavedení napětí nad tyto hodnoty může vést k nestabilním a neopakovatelným podmínkám. (4) Během toho se totiž zvýší migrace vzorku a rychlost elektroosmotického toku, dále se zkrátí čas analýzy, může se zvýšit ostrost píků a zlepšit se rozlišení. Avšak výhody spojené se vzrůstajícím napětím mohou být ztraceny, pokud je iontová síla v prostředí vzorku mnohem větší, než iontová síla vedoucího elektrolytu, takže vzrůstající produkce Joulova tepla nemůže být efektivně rozptýlena. (13)

2.1.6.4. Detekce

Jako v jiných separačních technikách, hraje i v kapilární elektroforéze detekce významnou roli. V principu všechny typy použitelné v kapalinové chromatografii mohou být také použity v kapilární elektroforéze. Nejčastěji využívanými detekčními technikami jsou spektrofotometrická detekce (UV-VIS absorpce, fluorescence), elektrochemická detekce (potenciometrie, voltametrie, konduktometrie) a detekce hmotnostním spektrometrem. (15) Výstup detektoru představuje signál, který je převeden na konečný objem. (9) Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforeogram. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu. (12)

2.1.6.4.1. UV-VIS detekce

UV-VIS absorpce je nejvíce využívanou detekční metodou, především kvůli svojí univerzální povaze. S kapilárou z taveného křemene může být využita detekce od 200 nm až po viditelné spektrum. (9) Nejvíce využívané jsou nyní UV-VIS detektory diodového pole (Diod-array detector, DAD), které mají tu výhodu, že poskytují čistotu píků a strukturní informace. (11)

Většina sloučenin může být detekována přímo, jelikož jsou schopny produkovat přímý analytický signál. V přímé detekci, která využívá UV detektor, je pík detekován pokaždé, když zóna obsahující sloučeninu, která absorbuje v UV, projde detekční celou.

Při použití současných komerčně dostupných CE systémů, vybavených fotometrickými detektory, není možné detekovat sloučeninu, která nevykazuje UV absorpci. V takovém případě je aplikována nepřímá UV detekce přidáním absorbující sloučeniny do elektrolytu. V důsledku toho je vytvořen signál pozadí (základní linie), který ukáže pokles pokaždé, když zóna, která obsahuje UV-neabsorbující sloučeninu, projde detekční celou. (16)

2.1.6.4.2. Fluorescenční detekce

Metody detekce jsou založeny na měření přirozené nebo laserem indukované fluorescence. Použití fluorescenční detekce umožňuje zvýšení citlivosti ve srovnání s UV-VIS absorpcí. (16)

2.1.6.4.3. Hmotnostní detekce

Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie je velmi slibnou a nadějnou technikou ve farmaceutické analýze pro její jedinečnou selektivitu v důsledku odlišného separačního principu, ve srovnání s ostatními. Charakteristiky jako citlivost, opakovatelnost a reprodukovatelnost jsou vynikající a umožňují detekci nečistot na velmi nízkých úrovních ve farmaceutických vzorcích. (16)

2.1.6.5. Elektrochemická detekce

Elektrochemické detektory se v kapilární elektroforéze v posledních letech stávají stále důležitější. Tento způsob detekce je založen na reakci povrchu elektrody, a na rozdíl od optické detekce, kde je odezva závislá na délce kapiláry, velikost cely může být vyrobena velmi malá, a to bez snížení citlivosti. (11)

2.1.6.6. Regulace teploty

Navzdory používání kapilár o úzkém průměru, teplotní rozdíl mezi stěnou kapiláry a okolním vzduchem může vyšplhat až na několik stupňů, a to kvůli samozahřívání kapiláry v důsledku tvorby energie uvnitř kapiláry. V kapilární elektroforéze je kontrola teploty založena na maximálním rozptylu Joulova tepla, za použití chlazení buď vzduchem, nebo prouděním kapaliny. (16)

2.1.7. Parametry analýzy ovlivňující separaci

Pro kapilární elektroforézu je charakteristické mnoho možností kontroly a změn separace. V závislosti na aktuálním mechanismu separace existují různé parametry, avšak je zde určité překrývání v rámci různých technik kapilární elektroforézy. (17)

2.1.7.1. Vlastnosti základního elektrolytu

Volba BGE je rozhodující pro dosažení úspěšné separace analytů. BGE musí být zvolen tak, aby nenarušoval schopnost detekce, zachovával rozpustnost analytů, udržoval pufrační kapacitu během analýzy a přinášel požadovanou separaci. (13)

Analyzované sloučeniny by měly být ve vybraném BGE rozpustné a stabilní. V určitých případech jsou vybrány pufrы na základě jejich schopnosti tvořit komplexy. (17)

2.1.7.2. Vliv koncentrace základního elektrolytu

Vhodná koncentrace BGE je omezena několika parametry zahrnujícími délku kapiláry a vnitřní průměr, sílu aplikovaného elektrického pole a účinnost termostátového systému. (13)

Vysoké koncentrace a iontová síla elektrolytu vyvolávají vysoký proud, snižují elektroosmotický tok a omezují chvostování píků, které vede k delším migračním časům a lepším separacím. Velká iontová síla pufru může být výhodou k omezení adsorpčních problémů. (17)

2.1.7.3. Vliv pH základního elektrolytu

Silná závislost elektroforetické pohyblivosti iontu, stejně tak jako elektroosmotického toku, na pH elektrolytu vede k nutnosti použít pufr s cílem udržet konstantní pH během separačního procesu. (11)

Povaha pufru by měla být vybrána s ohledem na použitou odezvu detekčního systému, vyvolanou intenzitou proudu a rozsah pH, v kterém má být použit. (11)

2.1.7.4. Vliv teploty

Vyšší teplota snižuje viskozitu BGE a zvyšuje elektroosmotický tok, což vede ke zkrácení migračních časů. Dovoluje také dávkování vyššího objemu vzorku. (17)

Je možné zlepšovat separační citlivost snižováním teploty. Na druhé straně, pokud je citlivost systému dostatečná, mohou být vysoké teploty využity ke zlepšení tvaru píku, ke zkrácení doby analýzy nebo k vyvolání speciálních jevů, jako jsou např. konformační změny. (11)

2.1.7.5. Použití modifikátorů

Jedním ze způsobů, jak zamezit absorpci analytů na stěnu kapiláry, je použití modifikátorů. Použití modifikátorů v prostředí elektrolytu má za následek vysoce účinnou separaci. (3) Správný výběr modifikátoru umožňuje zvýšení koncentrace elektrolytu bez významného zvýšení vodivosti. (11)

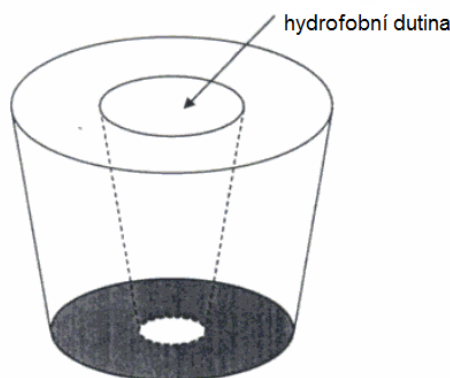
Mezi nejčastěji používané modifikátory patří chirální selektory, organická rozpouštědla, zwitterionty, tenzidy a aminové modifikátory.

2.1.7.5.1. Chirální selektory

Jako chirální selektory jsou využívány cyklodextriny a crown-ethery. Tyto modifikátory tvoří s molekulami analytů komplexy, což má za následek změnu pohyblivosti. (18)

Nejčastěji využívané jsou cyklodextriny. Jsou to cyklické oligosacharidy, které se skládají z šesti (α -CD), sedmi (β -CD) nebo osmi (γ -CD) glukózových podjednotek, a mají několik chirálních center. Trojrozměrná struktura cyklodextrinů se podobá komolému kuželu s hydrofobní dutinou. (Obr.5) Tato dutina může pojmout řadu molekul. (14)

Zahrnují řadu původních i odvozených forem a mohou tvořit rozdílné komplexy s migrujícími analyty, a tím zvyšovat jejich migrační časy a separační citlivost. (4)



Obrázek 5: *Trojrozměrná struktura molekuly cyklodextrinu (14)*

2.1.7.5.2. Organická rozpouštědla

Organická rozpouštědla, jako je např. methanol nebo acetonitril, mají za následek jak snížení vodivosti elektrolytu, tak i EOF, a to díky jejich vlastnosti narušovat uspořádanou strukturu molekul vody. (13)

Organické modifikátory zvyšují rozpustnost hydrofobních analytů, umožňují provádět separaci v nevodném elektrolytu, vedou ke snížení EOF, vedou k delším migračním časům a snižují dielektrickou konstantu. (17)

2.1.8. Separační metody kapilární elektroforézy

Jedna z nejdůležitějších charakteristik kapilární elektroforézy je její uplatnění na řadu analytických problémů. (11)

Je vypracována celá řada separačních technik, které doplňují prostou kapilární elektroforézu o další možnosti. (12)

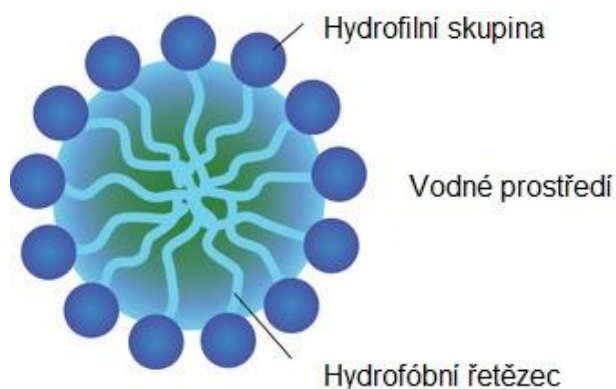
- **Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)** se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.
- **Kapilární gelová elektroforéza (CGE)** využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- **Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)** slouží k separaci amfolytů v gradientu pH.
- **Kapilární elektrochromatografie (CEC)** využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu, jako stacionární fázi. Separační selektivita v CEC je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu. (12)

2.2. Micelární elektrokinetická chromatografie

Hlavní nevýhodou kapilární zónové elektroforézy je neschopnost separovat neutrální částice vzorku, které jednoduše migrují spolu s EOF. K překonání této nevýhody lze použít micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), někdy nazývanou jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC). MEKC může být použita na separaci nejen neutrálních, ale také nabitých analytů. (14)

MEKC nabízí vysokou účinnost, rychlost analýzy, malé množství vzorku a nízkou spotřebu rozpouštědla. Další jedinečnou předností je pružnost a univerzálnost zahrnující chemickou citlivost separačního procesu. (19)

Při překročení kritické micelární koncentrace (CMC) tvoří tenzidy micely ve vodném prostředí elektrolytu. Micely jsou dynamické struktury skládající se z agregátů molekul tenzidu. V závislosti na použitém tenzidu bývají vysoce hydrofobní ve vnitřku struktury a hydrofilní na vnější části. (Obr.6) (16)



Obrázek 6: **Schématické znázornění micely** (20)

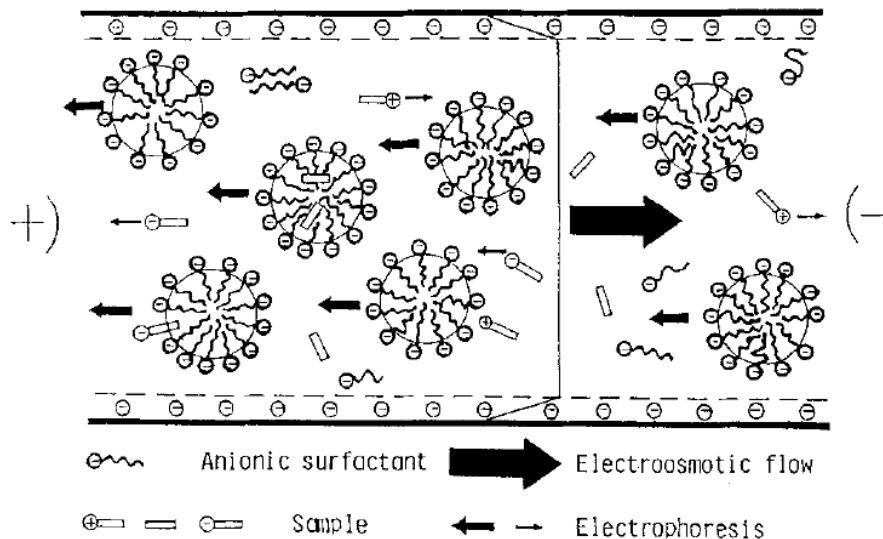
2.2.1. Princip separace

MEKC je založena na rozdělování analytů mezi dvě fáze, micelární a vodnou. Micely mohou být považovány za pseudo-stacionární fázi. Během separace jsou hydrofobní sloučeniny včleněny do hydrofobních částí micel. Na rozdíl od nich nejsou hydrofilní sloučeniny uzavřeny do micel, ale místo toho zůstávají v celém objemu roztoku elektrolytu. K tvorbě micelární fáze jsou použity iontové tenzidy, což znamená, že micely nesou náboj, který určuje jejich migrační rychlost vzhledem k EOF. (16)

Anionické tenzidy, jako je SDS, mají velký negativní náboj, a tak migrují vlivem elektroforézy k pozitivně nabitě anodě. To znamená v opačném směru vzhledem k EOF. Jelikož je EOF

rychlejší než migrační rychlost micel v neutrálním nebo bazickém prostředí, je konečný pohyb ve směru EOF. (9, 21) (Obr.7)

Podobná situace nastává také při použití kationických tenzidů a při současném obrácení polarity. (7)

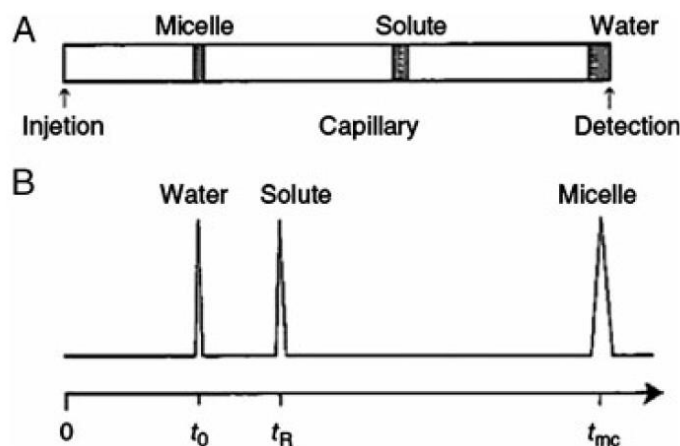


Obrázek 7: Schématické znázornění separačního principu v MEKC (21)

2.2.2. Migrace v MEKC

Migrace v MEKC obvykle závisí na hydrofobních vlastnostech analytů. Více hydrofobní analyty, např. Sudan III, interagují silněji s micelární fází, a tak je jejich migrační čas (t_m) pomalejší, než migrační čas (t_0) hydrofilních analytů, např. methanolu. (9,21)

U neutrálních částic je separace uskutečněna pouze na základě rozdělování mezi vnitřní a vnější částí micel, tzn. na základě jejich hydrofobních vlastností. Neutrální analyty jsou eluovány mezi t_0 a t_m . (9, 3) (Obr.8)



Obrázek 8: Schéma migrace v MEKC (21)

2.2.3. Tenzidy používané v MEKC

MEKC používá různé typy stacionárních fází, což pomáhá separaci analytů. Varianty zahrnují žlučové soli, cyklodextriny, různé polymery, mikroemulze a suspenze. (7)

2.2.3.1. Aniontové tenzidy

Nejvíce používaným tenzidem v MEKC je SDS kvůli jeho vysoké stabilitě, nízké absorpci v UV oblasti a vysoké solubilizační schopnosti. Struktura SDS zahrnuje hydrofobní řetězec a negativně nabitou hydrofilní hlavu. (13)

2.2.3.2. Kationtové tenzidy

Použití kationtových tenzidů obrátí směr EOF ve srovnání s CE a s MEKC používající neutrální a aniontové tenzidy. Děje se tak z důvodu tvorby dvojvrstvy tenzidu na stěně kapiláry, která mění rozložení náboje na stěně z negativního na pozitivní. Změna směru EOF nemá přímý vliv na separační principy v MEKC, avšak je nezbytné obrátit polaritu elektrod. (17)

Většina kationtových tenzidů má alkytrimethylamoniovou skupinu. Nejvíce oblíbený je cetyltrimethylamonium bromid, používá se však více k úpravě povrchu kapiláry, než k tvorbě micel. (22)

2.2.3.3. Neiontové a zwitteriontové tenzidy

Neiontové tenzidy samy o sobě nemají vliv na elektroforetickou pohyblivost a nemohou být použity jako pseudo-stacionární fáze v běžné MEKC. Avšak micely neiontových tenzidů jsou užitečné pro separaci nabitých sloučenin.

Neiontové tenzidy mohou být využity jako pseudo-stacionární fáze v MEKC, pokud jsou v kombinaci s iontovými tenzidy. (22)

S použitím těchto tenzidů je menší dopad na velikost EOF než u nabitých tenzidů. Na rozdíl od kationtových tenzidů nezpůsobují zvrát EOF, navíc mají účinek na proteinové struktury. (23)

2.2.3.4. Makromolekulární tenzidy

Tyto tenzidy mají několik výhod proti běžným nízkomolekulárním tenzidům. CMC je v podstatě nulová, a proto může být připravena jejich přesná koncentrace, bez ohledu na teplotu a složení pufru. Konstantní koncentrace micel poskytuje vysokou opakovatelnost migračních časů a ploch píků. (22)

2.2.3.5. Chirální tenzidy

Žlučové soli jsou přírodní a chirální tenzidy se steroidní strukturou. V MEKC jsou také používány choláty a deoxycholáty. Žlučové soli mohou separovat neutrální enantiomery. Rozšiřují tak MEKC o analýzu směsí obsahujících chirální a nechirální složky. (22)

2.3. Metody zakoncentrování vzorku v CE

Limity detekce (LOD) u kapilární elektroforézy jsou omezeny průměrem a délkou kapiláry. Bylo vypracováno několik technik ke snížení detekčního limitu. Tyto techniky spočívají v zakoncentrování vzorku a zvýšení množství vzorku, které může být nanášeno do kapiláry, bez snížení separace. (24)

Zakoncentrování vzorku, obvykle uváděné jako „stacking“, je založené buď na rozdílech v elektroforetické pohyblivosti analytů na rozhraní dvou elektrolytů s rozdílnými odpory (elektroforetické metody), nebo na rozdělení analytů do stacionární nebo pseudo-stacionární fáze (chromatografické metody). (24)

2.3.1. Elektroforetické metody

Elektroforetické techniky zakoncentrování vzorku zahrnují úpravu elektroforetické rychlosti analytů změnou vodivosti nebo pH vzorku. (25)

Tento typ stackingu je vhodný pro vzorky s nízkou vodivostí a jednoduchou maticí. Vzorek je hydrodynamicky nebo elektrokineticky vpraven do kapiláry. Po aplikaci napětí migrují ionty vzorku rychle v důsledku vyšší intenzity elektrického pole (nižší vodivosti) v zóně nástřiku ve srovnání s BGE. Když ionty vzorku procházejí přes rozhraní mezi zónou vzorku a BGE, jsou zpomaleny kvůli nižší intenzitě elektrického pole, a tak jsou zakoncentrovány do krátké zóny. (26)

2.3.1.1. Polem zesílené zakoncentrování vzorku (FASS)

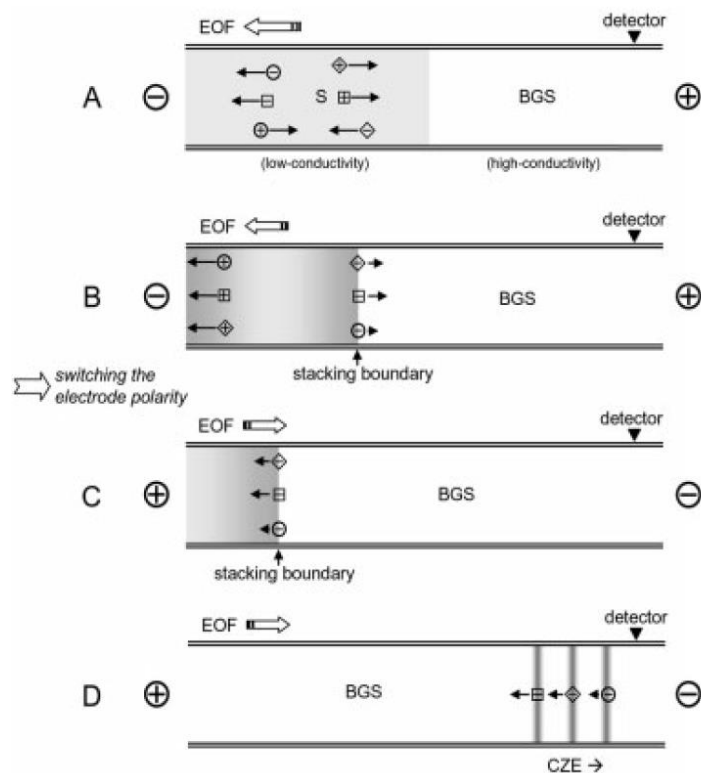
FASS je nejjednodušší elektroforetická metoda zakoncentrování, která využívá hydrodynamické dávkování. To umožňuje větší dávkovací objem bez zničení separační účinnosti a snížení detekčního limitu. (27)

Ve FASS má základní elektrolyt i roztok vzorku stejné složení, ale matrice vzorku je připravena ve zředěnějším roztoku, který má nižší elektrickou vodivost než vedoucí elektrolyt. (27)

2.3.1.2. Stacking z velkého objemu vzorku (LVSS)

Tato metoda představuje zakoncentrování po nástřiku velkého objemu vzorku. Na úvod LVSS je vzorek rozpuštěn ve vodě nebo ve zředěném elektrolytu a hydrodynamicky dávkován do $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$ objemu kapiláry. (24, 27)

V základním uspořádání je do kapiláry naplněné elektrolytem o vysoké vodivosti aplikováno napětí se zápornou polaritou. V tomto okamžiku je směr EOF přímo k dávkovacímu konci kapiláry. Aniontové analyty se pohybují směrem k detekčnímu konci kapiláry a jsou zakoncentrovány na rozhraní mezi zónou vzorku a elektrolytu. Mezitím jsou kationty a neutrální částice vylučovány na dávkovacím konci kapiláry. Elektroforetický proud musí být pozorně sledován, až dosáhne přibližně 95-99% jeho původní hodnoty. Poté je polarita rychle obrácena na kladnou, což vede k obrácení EOF. Pokud by polarita nebyla změněna, mohlo by dojít k migraci analyzovaných aniontů ven z kapiláry. Následující separace je stejná jako v CE. (Obr.9) (28)



Obrázek 9: Schématické znázornění LVSS (28)

Ve srovnání s FASS poskytuje tato metoda dávkování většího objemu vzorku bez výrazné ztráty separační účinnosti. (28)

2.3.1.3. Zakoncentrování zprostředkované pomocí pH

Tento typ stackingu je vhodný pro vzorky s vysokou vodivostí nebo pro vzorky s výraznou biologickou maticí. Využívá pH k vytvoření zóny vzorku s nízkou vodivostí. (26)

Nejprve je vzorek připraven v prostředí o velké iontové síle a je elektrokineticky vpraven do kapiláry. Potom je elektrokineticky dávkována silná kyselina a je aplikováno separační napětí o kladné polaritě. Protóny z kyseliny rychle migrují přes zónu vzorku, a tak titrují roztok vzorku až do vytvoření neutrální zóny. To dovoluje kationtům vzorku migrovat přes titrovanou zónu na rozhraní s elektrolytem, kde jsou zakoncentrovány. Tuto metodu lze použít i pro detekci aniontů za pomoci modifikátorů EOF do základního elektrolytu a při obrácené polaritě. (24, 28)

2.3.1.4. Izotachforetické zakoncentrování

Na rozdíl od kapilární elektroforézy se izotachforéza (ITP) vyznačuje nespojitým prostředím elektrolytu. Tato metoda je vhodná pro vzorky špatně rozpustné ve vodě, ale které mají vodivé ionty. ITP se často provádí tak, že se zóna vzorku nachází mezi elektrolytem s vyšší (vedoucí elektrolyt) a nižší elektroforetickou pohyblivostí (koncový elektrolyt). Po aplikaci elektrického napětí jsou analyzované ionty zakoncentrovány mezi vedoucími a koncovými ionty elektrolytů, a poté jsou separovány jako v kapilární elektroforéze. (24, 28)

2.3.2. Chromatografické metody

Použití kapiláry vybavené zakoncentrovávací komorou, založené na chromatografické bázi, umožňuje několikrát zavést objem vzorku do kapiláry, a tak zakoncentrovat analyty s minimálním nepříznivým vlivem na separační proces. (27)

2.3.2.1. Extrakce na pevnou fázi (SPE)

SPE je obvykle používána jako off-line separace. Je to užitečná technika, která umožňuje nanést velký objem vzorku o nízké koncentraci na pevnou fázi a eluovat ho v malém množství, které poskytuje koncentrace, jež mohou být detekovány. (24)

2.3.2.2. Zametání (sweeping)

Jedná se o jednoduchou a praktickou on-line metodu zakoncentrování vzorku buď pro nabitě, nebo neutrální analyty. Základní elektrolyt obsahuje tenzid (například SDS), který tvoří micely, ale vzorek je rozpuštěn v elektrolytu bez obsahu micel. Po nástřiku základního elektrolytu a vzorku je aplikováno napětí se zápornou polaritou k zahájení separace. Kationty se pohybují směrem k dávkovacímu konci, anionty opačným směrem. Ve výsledku aniontové micely, tvořené SDS, zametají analyty. (28)

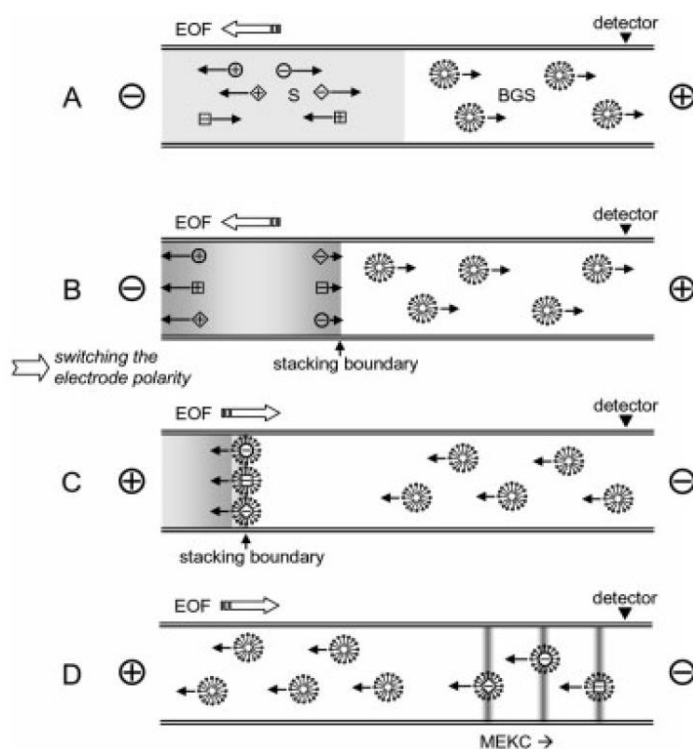
2.3.3. Zakoncentrování vzorku v MEKC

2.3.3.1. MEKC s normálním stackingem

Vzorek je rozpuštěn v nízkovodivostním elektrolytu nebo vodě, základní elektrolyt obsahuje micely tvořené SDS. Po nástřiku základního elektrolytu a vzorku do kapiláry je aplikováno pozitivní napětí. Mezitím micely SDS z dávkovacího konce kapiláry vstupují do zóny vzorku (jelikož pohyblivost EOF je větší, než ta micelární). Jakmile analyty v SDS micelách dosáhnou hranice mezi zónou vzorku a základním elektrolytem, dojde k zakoncentrování analytů. Dále probíhá separace jako v MEKC. (28)

2.3.3.2. MEKC s reverzním stackingem

Vzorek je rozpuštěn v elektrolytu o nízké vodivosti, zatímco základní elektrolyt má vysokou vodivost a obsahuje micely tenzidu (např. SDS). Je aplikováno napětí o negativní polaritě a EOF se pohybuje směrem k dávkovacímu konci kapiláry. Anionty analytů se pohybují směrem k detekčnímu konci a jsou zakoncentrovány na rozhraní, mezitím kationty a neutrální částice opouští kapiláru na dávkovacím konci. Když elektroforetický proud dosáhne 95-99% jeho původní hodnoty, rychle se obrátí polarita na kladnou. To vede k obrácení EOF. Micely v základním elektrolytu nesou a koncentrují analyt na stackingovém rozhraní. Poté jsou SDS-analyty separovány pomocí MEKC. (Obr. 10) (28)



Obrázek 10: Schématické znázornění stackingu v MEKC (28)

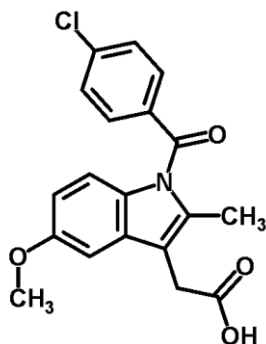
2.4. Indomethacin a jeho degradační produkty

2.4.1. Indomethacin

$C_{19}H_{16}ClNO_4$

Mr= 357,79 (29)

pKa= 4,5 (30)



Obrázek 11: **Indomethacin** (www.chemspider.com, ID:3584, 11.4.2015)

Vlastnosti:

Bílý nebo žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu 96%. (29)

Stabilita:

Roztoky s pH pod 7,4 jsou stabilní. Při pH 7,4 nebyly pozorovány žádné změny během 24 hodin. Rychlý rozklad nastává v zásaditém prostředí. (31)

Indomethacin je nesteroidní protizánětlivé léčivo s antipyretickými a analgetickými vlastnostmi. Bývá používán k léčbě pacientů se středně těžkou až těžkou revmatoidní artritidou, ankylozující spondylitidou, osteoartritidou a akutní bolestí ramena. (30)

2.4.2. Kyselina 4-chlorbenzoová

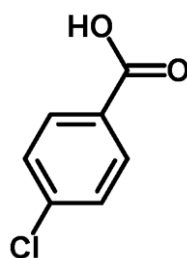
$C_7H_5ClO_2$

Mr=156,566

pKa=4,07

Vlastnosti:

Bílý prášek nebo hrubé krystaly. Je stabilní. Inkompatibilní s bázemi a silnými oxidačními činidly. (www.chemspider.com, ID:6079, 11.4.2014)



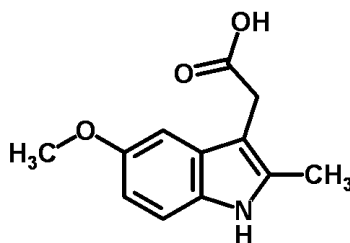
Obrázek 12: kys. 4-chlorbenzoová (www.chemspider.com, ID:6079, 11.4.2014)

2.4.3. Kyselina 5-methoxy-2methyl-3indolyloctová

$C_{12}H_{13}NO_3$

Mr=219,236

pKa=4,38 (www.chemspider.com, ID:68635, 11.4.2014)



Obrázek 13: kyselina 5-methoxy-2-methyl-3indolyloctová (www.chemspider.com, ID:68635, 11.4.2014)

2.5. Metody stanovení indomethacinu a jeho degradačních produktů

Pro stanovení indomethacinu bylo vyvinuto několik metod, především v oblasti HPLC. Ovšem jenom některé z nich se zabývaly také jeho degradačními produkty. Ty by měly být monitorovány, spolu s aktivní substancí, během výrobního procesu a uchování farmaceutických přípravků za účelem kontroly kvality. (32)

Český lékopis používá ke stanovení substance indomethacinu titrací 0,1M hydroxidem sodným, za provedení slepé zkoušky. (29)

- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-0,2%kyselina fosforečná, Zorbax-Phenyl kolona (75 x 4,6 mm; 3,5 μ m), stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů v topickém gelu. (32)

- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-0,2% kyselina fosforečná, RP-18e chromolithová kolona (25 x 4,6 mm; 50 x 4,6 mm; 100 x 3 mm), stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů (MMIAA,4CHBA). (33)
- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-voda , C18 kolona, pH 2,0 (upraveno 0,2% kyselinou o-fosforečnou), stanovení indomethacinu v plazmě. (34)
- GE-SIC, UV CCD detektor, mobilní fáze: acetonitril-0,2% kyselina fosforečná, C18 monolithová kolona (25 x 4,6 mm), separace a simultánní stanovení obsahu indomethacinu jako účinné látky a jeho dvou degradačních produktů (MMIAA,4CHBA) ve farmaceutickém přípravku. (35)
- RP-HPLC, UV detekce, mobilní fáze: ethylacetát (100% v/v), RP-C8 kolona (250 x 4,0 mm), stanovení stability indomethacinu. (36)
- Elektrokatalytická oxidace, měděná elektroda, zásaditý roztok, stanovení kyseliny mefenamové a indomethacinu. (37)

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu zakoncentrování vzorku z velkého objemu (LVSS) v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) pro separaci a stanovení dvou degradačních produktů indomethacinu, a to kyseliny 4-chlorbenzoové a kyseliny 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctové.

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1. Přístroje

- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
- Magnetická míchačka Vortex Genius 3, IKA, Německo
- Kapilární elektroforetický systém Agilent 7100, Agilent Technologies, Německo, Agilent ChemStation Software – separace byla prováděna v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 µm, celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm
- Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter, USA, software Karat 32 - separace byla prováděna v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 µm, celkové délce 40,2 cm a efektivní délce 30 cm
- Laboratorní digitální pH metr SI400, Sentron, Holandsko
- (kalibrace přístroje pomocí pufrů Sentron)
- pH elektroda MicroFET, Sentron, Holandsko
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex Digitec DT 52, Bandelin Electronic, Německo

4.2. Chemikálie

- Dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrát, p.a., Sigma-Aldrich
- Dodecylsírán sodný, p.a., Sigma-Aldrich
- Ethanol, p.a., Fisher Chemical
- Hydroxid sodný, ≥97%, Sigma-Aldrich
- Indobene gel (1%), ratiopharm GmbH
- Indomethacin, ≥ 99%, Sigma-Aldrich
- Ketoprofen, p.a., Sigma-Aldrich
- Kyselina benzoová, ≥ 99,5%, Fluka
- Kyselina boritá, ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich
- Kyselina 4-chlorbenzoová, ≥ 99%, Sigma-Aldrich
- Kyselina 5-methoxy-2-methyl-3-indolyloctová, ≥ 98%, Sigma-Aldrich
- Kyselina 1-naftyloctová, Sigma-Aldrich
- Methanol, ≥ 99,9%, Sigma-Aldrich
- Naproxen, ≥ 98%, Sigma-Aldrich
- Voda, ultračistá voda připravená přístrojem Milli-Q-System, Millipore, Bedford, MA, USA

4.3. Roztoky

Roztoky byly připraveny podle následujících postupů. Každý roztok byl před vpravením do přístroje odplyněn na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

4.3.1. Roztok základního elektrolytu

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo takové množství SDS, které odpovídalo 60 mM koncentraci, a bylo rozpuštěno přibližně v 12 ml vody, za použití ultrazvukové lázně po dobu 15 minut. Ze zásobního roztoku 50mM dihydrogenfosforečnanu sodného bylo odebráno 5 ml a přidáno k roztoku SDS v baňce. Roztok byl titrován pomocí hydroxidu sodného na hodnotu 7,0 a bylo přidáno 2,5 ml methanolu. Roztok byl doplněn vodou po rysku. Každý roztok BGE byl do vialky filtrován přes membránový filtr (o velikosti pórů 0,45 μ m).

4.3.2. Zásobní roztoky standardů

Do 5 ml odměrných baněk bylo naváženo přibližně asi 25 mg indomethacinu, 2,5 mg kyseliny 4-chlorbenzoové a 2,5 mg MMIAA. Každá látka byla jednotlivě rozpuštěna v methanolu a doplněna po rysku.

4.3.3. Zásobní roztok vnitřního standardu

Do odměrné baňky bylo naváženo takové množství kyseliny 1-naftyloctové, aby její koncentrace v methanolu byla 0,5 mg/ml.

4.3.4. Pracovní roztoky standardů pro optimalizaci

Z každého zásobního roztoku bylo do odměrné baňky odebráno potřebné množství standardu tak, aby pracovní roztoky obsahovaly indomethacin o koncentraci 250 μ g/ml, nečistoty o koncentraci 2,5 μ g/ml a vnitřní standard o koncentraci 5 μ g/ml. Byl přidán methanol v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 10% (v/v). Baňka byla doplněna po rysku 2,5mM dihydrogenfosforečnanem sodným o pH 7,0.

4.3.5. Roztoky pro výběr vnitřního standardu

Při výběru vnitřního standardu byla zkoušena kyselina benzoová, kyselina 1-naftylactová, naproxen a ketoprofen.

Ve 2 ml odměrné baňce byl připraven methanolický zásobní roztok zkoušené látky tak, aby její koncentrace byla 1mg/ml.

Ze zásobního roztoku bylo odebráno 10 μ l a vpraveno do odměrné vialky o objemu 1ml. Objem byl doplněn po rysku methanolem.

4.3.6. Zásobní roztoky pro kalibraci

Byly připraveny tři zásobní roztoky, jeden obsahoval indomethacin a zbylé dva roztoky obsahovaly každý jednu nečistotu. Bylo naváženo přibližně asi 25 mg indomethacinu do 5 ml odměrné baňky. Do 2 ml odměrné baňky bylo odváženo množství přibližně asi 1 mg kyseliny 4-chlorbenzoové a 1 mg MMIAA. Jednotlivé látky byly rozpuštěny a doplněny methanolem po rysku (ZR ST1).

4.3.7. Příprava kalibračních roztoků

Ze zásobních roztoků (ZR ST1) MMIAA a kyseliny 4-chlorbenzoové bylo odebráno vždy 0,5 ml. Každá látka byla zvlášť vpravena do 5 ml odměrné baňky a zředěny methanolem po rysku, výsledná koncentrace takto vzniklých roztoků byla vždy 50 μ g/ml (ZRS ST2). Takto připravené roztoky byly použity pro přípravu roztoků kalibrační řady od koncentrace 0,125 mg/ml do 10 mg/ml podle tabulky (Tab.1). Do jednotlivých odměrných baněk kalibrační řady bylo přidáno 40% (v/v) methanolu. Každý roztok obsahoval vnitřní standard o koncentraci 5 μ g/ml a indomethacin o koncentraci 250 μ g/ml. Roztok byl doplněn 2,5mM dihydrogenfosforečnanem sodným o pH 7,0.

Tab.1 Ředění kalibrační řady roztoků (μl ZR ST2 4CHBA + μl ZR ST2 MMIAA +250 μl ZR ST1 IND + 50 μl ZR IS + ml MeOH do 5 ml 2,5mM DHFS)

Tabulka 1: Příprava kalibračních roztoků o koncentraci 0,125-5,0 $\mu\text{g/ml}$

| Kalibrační roztok | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C MMIAA [$\mu\text{g/ml}$] | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 |
| C 4CHBA [$\mu\text{g/ml}$] | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 |
| ZR ST2 4CHBA [μl] | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 250,0 | 500,0 |
| ZR ST2 MMIAA [μl] | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 250,0 | 500,0 |
| ZR ST1 IND [μl] | 250,0 | 250,0 | 250,0 | 250,0 | 250,0 | 250,0 |
| MeOH [ml] | 1,675 | 1,650 | 1,600 | 1,500 | 1,200 | 0,700 |
| ZR IS [μl] | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Pro koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ MMIAA a kyseliny 4-chlorbenzoové byl roztok pro kalibraci připraven odebráním 0,1 ml ze ZR ST1 každé nečistoty, 0,25 ml ZR ST1 indomethacinu, přidáním 50 μg ZR IS, 1,75 ml MeOH a doplněním 2,5mM dihydrogenfosforečnanem sodným po rysku 5 ml odměrné baňky (Tab. 2).

Tabulka 2: Příprava kalibračního roztoku o koncentraci 10,0 $\mu\text{g/ml}$

| | |
|-------------------------------------|------|
| Kalibrační roztok | 7 |
| C MMIAA, 4CHBA [$\mu\text{g/ml}$] | 10,0 |
| ZR ST1 4CHBA [ml] | 0,1 |
| ZR ST1 MMIAA [ml] | 0,1 |
| ZR ST1 IND [ml] | 0,25 |
| MeOH [ml] | 1,50 |
| ZR IS [μl] | 50 |

4.3.8. Příprava vzorku HVLP

Do 10 ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně asi 0,2500 g přípravku Indobene gel, což odpovídá koncentraci 250 µg/ml indomethacinu. K tomuto obsahu bylo přidáno 3,9 ml methanolu a 100 µl ZR IS, vše bylo doplněno 2,5mM fosfátem po rýsku baňky. Takto připravený roztok byl odplyněn na ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Před měřením byl každý vzorek vpraven do vialky přes membránový filtr.

4.4. Pracovní postupy

Na začátku analýzy byl zapnut počítač, elektroforetický systém a počítačový software. V počítačovém programu byly nastaveny parametry analýzy. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky, tlakem 100 mBar po dobu 10 sekund (odpovídá přibližně 24% efektivní délky kapiláry). Klasická elektroforetická separace byla prováděna při napětí 15 kV a teplotě 25°C. Při LVSS bylo vloženo záporné napětí -7,5kV a po dosažení proudu odpovídajícímu 95% jeho původní hodnoty (1,5 minutě) byla obrácena polarita napětí na 15 kV. Vlnové délky pro detekci byly 224 a 234 nm.

4.4.1. Kondicionace kapiláry

Každá nová kapilára byla kondicionována nejprve 5 minut methanolem, poté 10 minut 1M hydroxidem sodným, 10 minut 0,1M hydroxidem sodným a na závěr 10 minut vodou. Tlak byl nastaven na 500 mBar.

4.4.2. Promývání kapiláry

Na začátku každé analýzy byla kapilára proplachována 1 minutu methanolem, 2 minuty 0,1M hydroxidem sodným, poté 30 sekund vodou a na závěr 2 minuty pracovním elektrolytem. Tlak pro promývání byl zvolen 1000 mBar. Stejný postup promývání byl zvolen na konci každého dne, ve kterém probíhalo měření.

4.4.3. Měření kalibrační závislosti

Každý roztok pro kalibraci byl změřen šestkrát. K vyhodnocení byla použita funkce lineární regrese, v počítačovém programu Excel, jako korigovaný poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci degradačních produktů µg/ml.

4.5. Výpočty

4.5.1. Limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ)

LOD vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnížší detekovaná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. Lze ho určit jako koncentraci analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. (2)

LOQ je také parametrem citlivosti metody. Je to nejnížší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. (2)

$$\text{LOD} = 3,3 \times \left(\frac{SD}{S}\right)$$

Rovnice 8 (38)

$$\text{LOQ} = 10 \times \left(\frac{SD}{S}\right)$$

Rovnice 9 (38)

SD... směrodatná odchylka absolutního členu „q“ v Rovnici 20

S... směrnice přímky „k“ v Rovnici 20

4.5.2. Faktor symetrie (As)

Faktor symetrie byl vypočítán pomocí vzorce (29):

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \times d}$$

Rovnice 10

w_{0,05}... šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d... vzdálenost vzestupné části píku ke kolmici vedené z vrcholu píku

4.5.3. Rozlišení (Rs)

K výpočtu rozlišení mezi dvěma píky látek byl použit vzorec: (29)

$$R_S = \frac{1,18 \times (T_{Rb} - T_{Ra})}{W_{50a} + W_{50b}}$$

Rovnice 11

T_R ... retenční časy sousedních látek a,b; kde $T_{Rb} > T_{Ra}$,

W_{50} ... šířky píků v jejich polovině

4.5.4. Počet teoretických pater (N)

Počet teoretických pater slouží k výpočtu účinnosti systému: (29)

$$N = 5,54 \times \left(\frac{T_R}{W_{50}} \right)^2$$

Rovnice 12

T_R ... retenční čas

W_{50} ... šířka píku v jeho polovině

4.5.5. Výškový ekvivalent teoretického patra (H)

Výškový ekvivalent teoretického patra se vypočítá ze vztahu: (9)

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

Rovnice 13

l ... efektivní (celková) délka kapiláry

N ... počet teoretických pater

4.5.6. Opakovatelnost analýzy

Pro zjištění opakovatelnosti metody byl šestkrát připraven vzorek HVLP, postupem uvedeným v kap. 4.3.8. Každý vzorek byl měřen třikrát. Průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byly vypočítány podle následujících vztahů:

Aritmetický průměr výsledků měření \bar{x} : (39)

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

Rovnice 14

n... počet měření

x... jednotlivé hodnoty měření

Směrodatná odchylka měření s: (40)

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

Rovnice 15

Relativní směrodatná odchylka RSD v procentech: (29)

$$\text{RSD} = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

Rovnice 16

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Optimalizace metody pro stanovení degradačních produktů indomethacinu

Na proces separace má vliv mnoho parametrů, které musí být optimalizovány. Jedná se o parametry instrumentální a parametry základního elektrolytu. K instrumentálním parametrům patří výběr napětí a teploty pro separaci, vhodná délka a průměr kapiláry. K parametrům základního elektrolytu patří volba typu tlumivého roztoku, jeho koncentrace a vhodné pH. Vzhledem k tomu, že analýza je prováděna pomocí MEKC, řadí se mezi optimalizované parametry i typ a koncentrace tenzidu a také modifikátorů, např. organických rozpouštědel.

Optimalizace separačních podmínek probíhala v křemenné kapiláře, jejíž vnitřní průměr byl 75 μm , celková délka 33 cm a efektivní délka 24,5 cm. Dávkování vzorku probíhalo za tlaku 27,6 mBar pod dobu 6 sekund bez aplikace LVSS.

5.1.1. Optimalizace podmínek pro MEKC

5.1.1.1. Detekce - volba vlnové délky

Kapilární elektroforetický systém s integrovaným detektorem diodového pole (DAD) umožňoval detekci při více vlnových délkách. Optimální vlnová délka byla stanovena změřením spekter analytů v BGE, který obsahoval 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS a 10% (v/v) MeOH. Spektrum bylo měřeno v rozsahu od 190 do 500 nm. Analyzované látky vykazovaly maxima při následujících vlnových délkách:

- MMIAA: 224 a 286 nm
- NAA (IS): 224 a 278 nm
- 4CHBA: 234 nm
- IND: 254 a 320 nm

Pro současné stanovení indomethacinu, MMIAA a 4CHBA byla zvolena vlnová délka 224 nm. MMIAA byla vyhodnocována při 224 nm a 4CHBA při 234 nm.

5.1.1.2. Testování druhu BGE

Volba vhodného typu BGE má vliv na citlivost analýzy.

Jako první byl testován borát-fosfátový pufr. Ten vykazoval dobrou separaci všech analytů, ale proud během analýzy nebyl stabilní. Následně byl zkoušen fosfátový pufr s přídavkem

methanolu a SDS, který byl vybrán pro další práci, díky dobrým separačním podmínkám a konstantním parametrům analýzy.

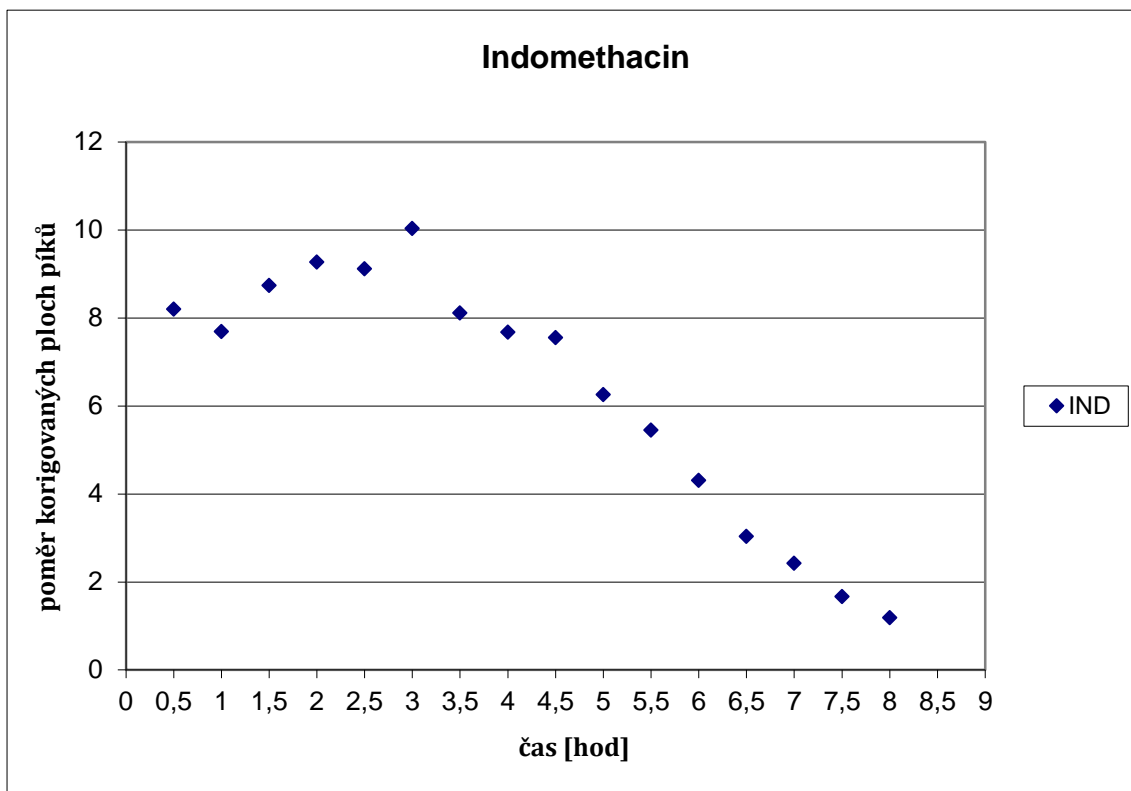
5.1.1.3. Stabilita pracovního roztoku standardů

Při optimalizaci vhodného prostředí pro stanovení analytů byla testována stabilita. Cílem bylo najít takové prostředí, ve kterém si analyty uchovají konstantní vlastnosti, a jejich koncentrace se nebude výrazně měnit v průběhu analýzy.

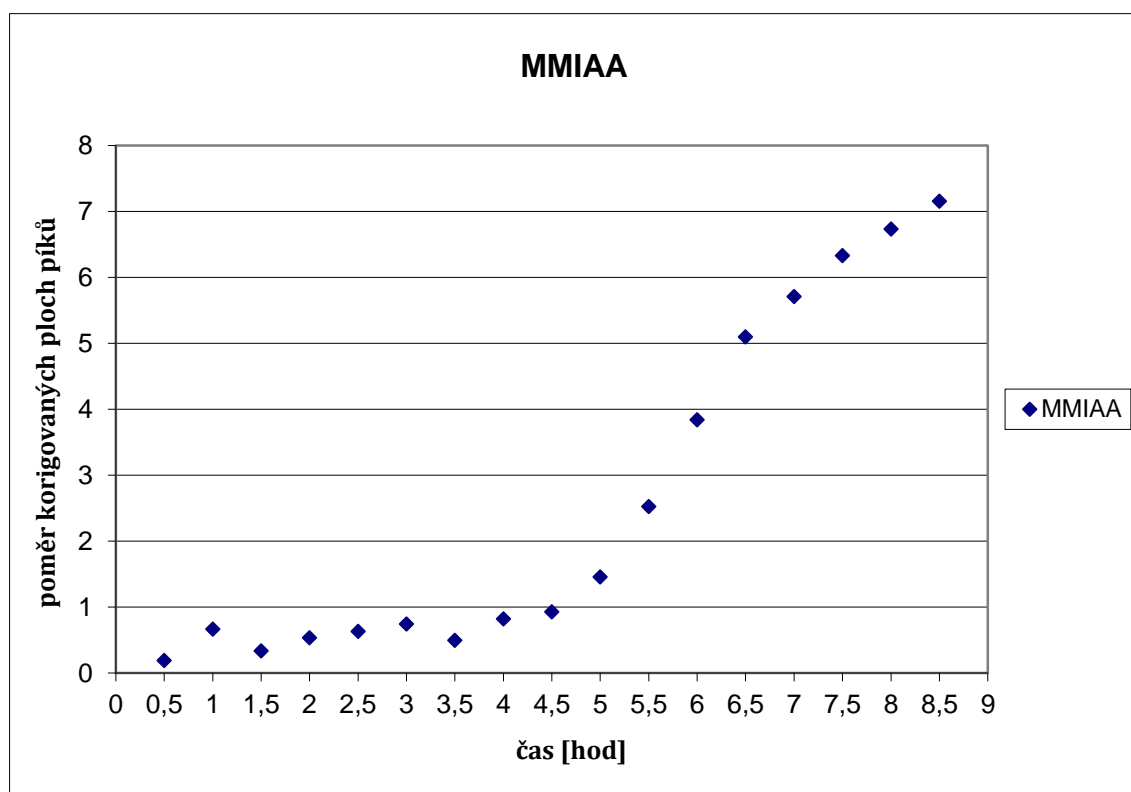
Stabilita byla testována na kapilárním elektroforetickém systému P/ACE MDQ (Beckman Coulter). Analýza probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 40,2 cm a efektivní délce 30 cm.

Byly testovány následující možnosti:

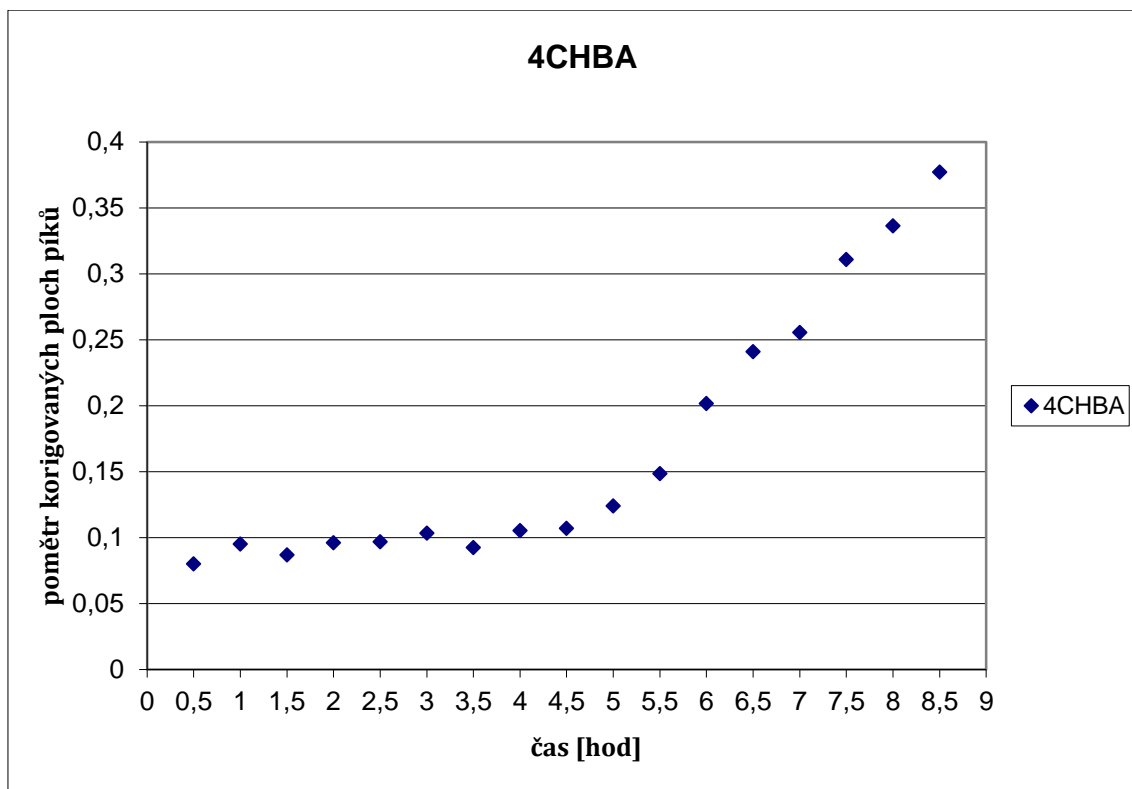
- Napětí -25 kV, dávkovací tlak 27,6 mBar, doba dávkování 6 s, analýza opakována vždy po 30 minutách
- BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,2
- PR ST: 250 $\mu\text{g/ml}$ IND; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ MMIAA; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 4CHBA; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) H₂O
- V tomto prostředí docházelo zhruba po 5 hodinách analýzy k rozkladu indomethacinu (Obr.14), zároveň docházelo ke zvyšování koncentrací MMIAA a 4CHBA (Obr.15, Obr.16)



Obrázek 14: **Stabilita indomethacinu v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) H₂O**

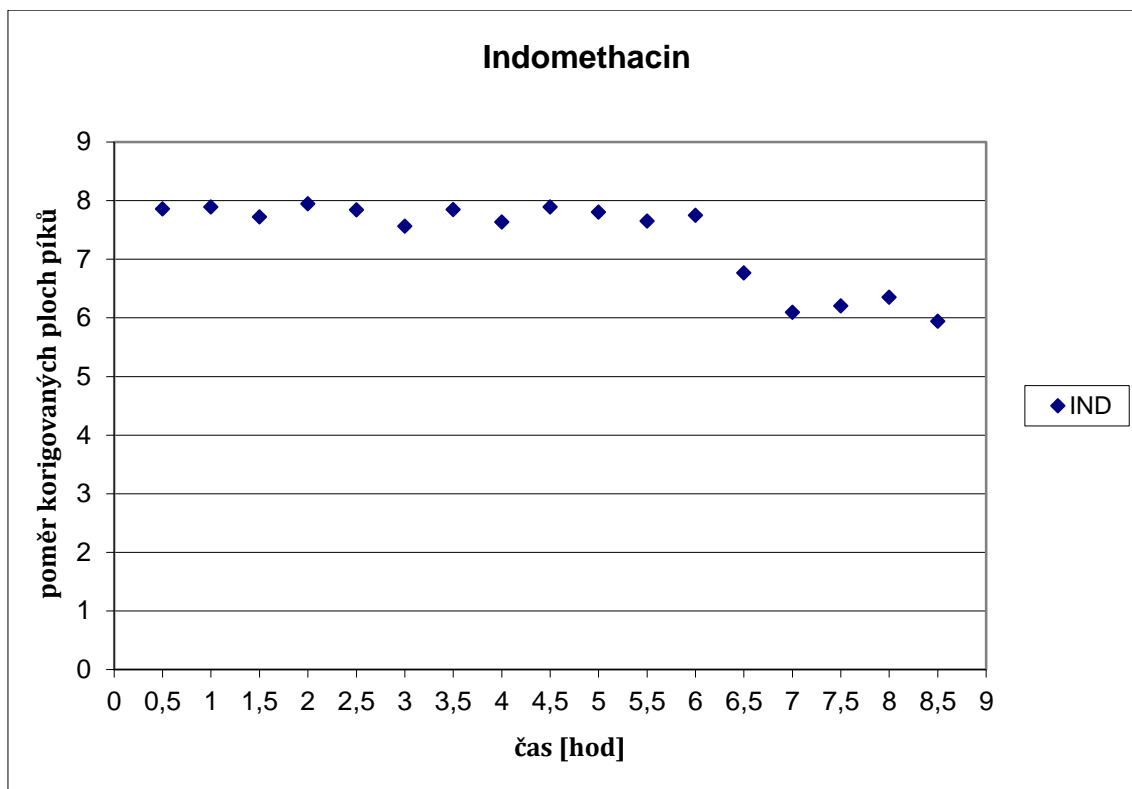


Obrázek 15: **Stabilita MMIAA v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) H₂O**

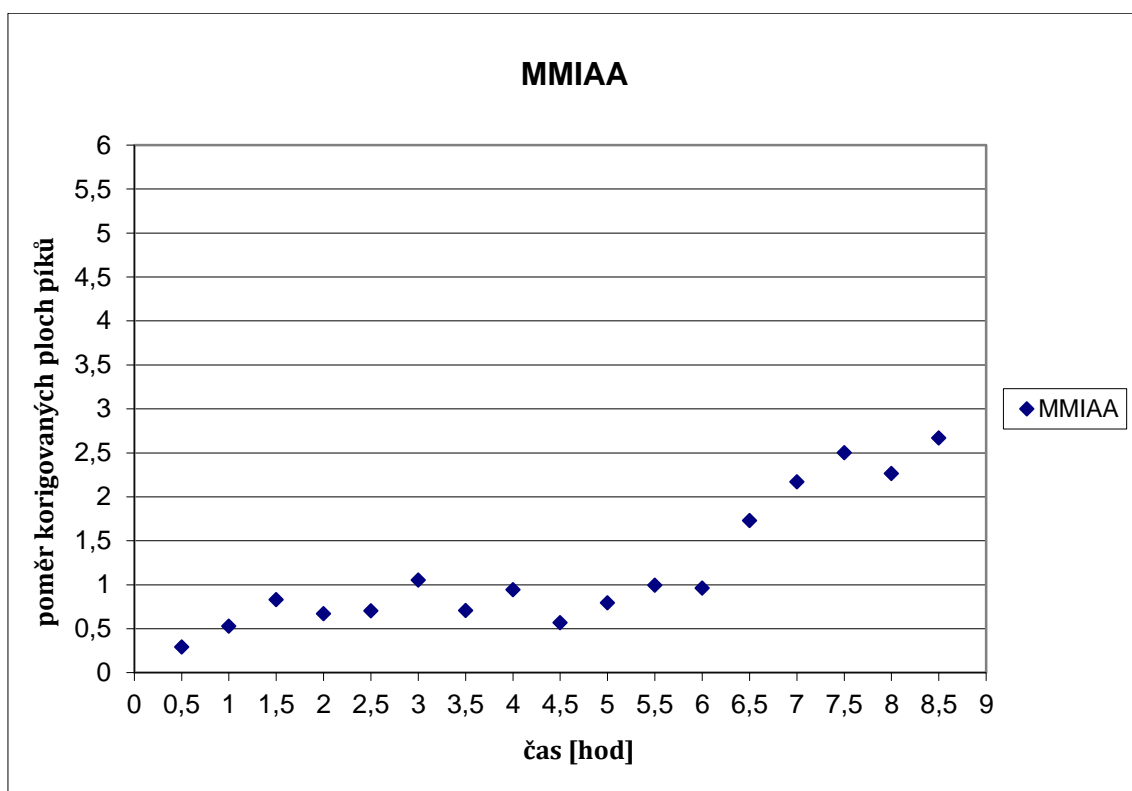


Obrázek 16: **Stabilita 4CHBA v pracovním roztoku: Stabilita indomethacinu v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) H₂O**

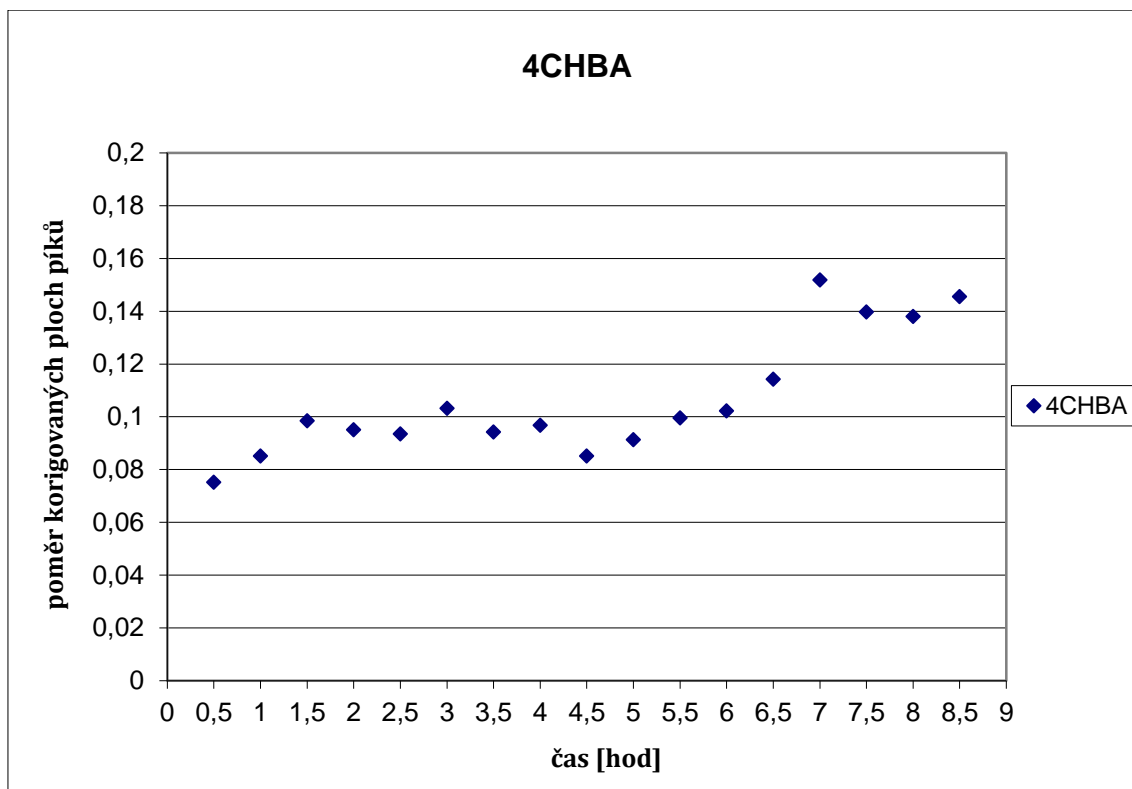
- Napětí -25 kV, dávkovací tlak 27,6 mBar, doba dávkování 6 s, analýza opakována vždy po 30 minutách
- BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,2
- PR ST: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH; 60% (v/v) 10mM dihydrogenfosforečnan sodný
- Za těchto podmínek byl indomethacin stabilní a k jeho mírnému rozkladu docházelo zhruba po 6 hodinách analýzy (Obr.17), v tom samém čase docházelo k nárůstu MMIAA a 4CHBA (Obr.18, Obr.19)



Obrázek 17: **Stabilita indomethacinu v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) 10mM DHFS**



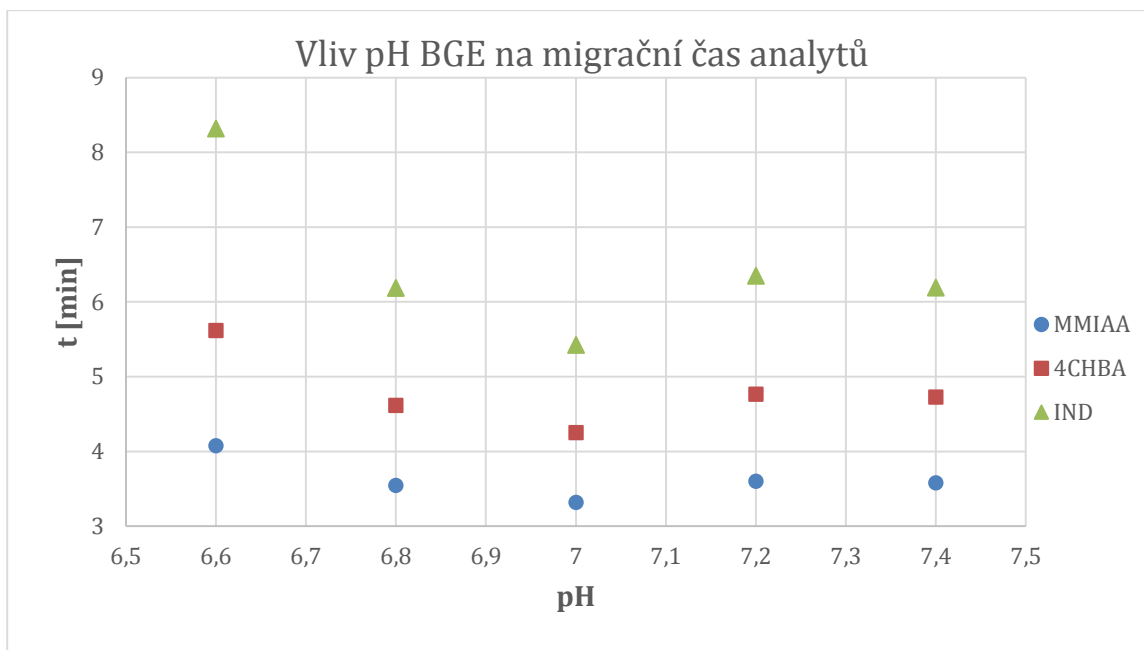
Obrázek 18: **Stabilita MMIAA v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) 10mM DHFS**



Obrázek 19: **Stabilita 4CHBA v pracovním roztoku: 250 µg/ml IND; 2,5 µg/ml MMIAA; 2,5 µg/ml 4CHBA; 2,5 µg/ml NAA (IS); 40% (v/v) MeOH, 60% (v/v) 10mM DHFS**

5.1.1.4. Vliv pH BGE

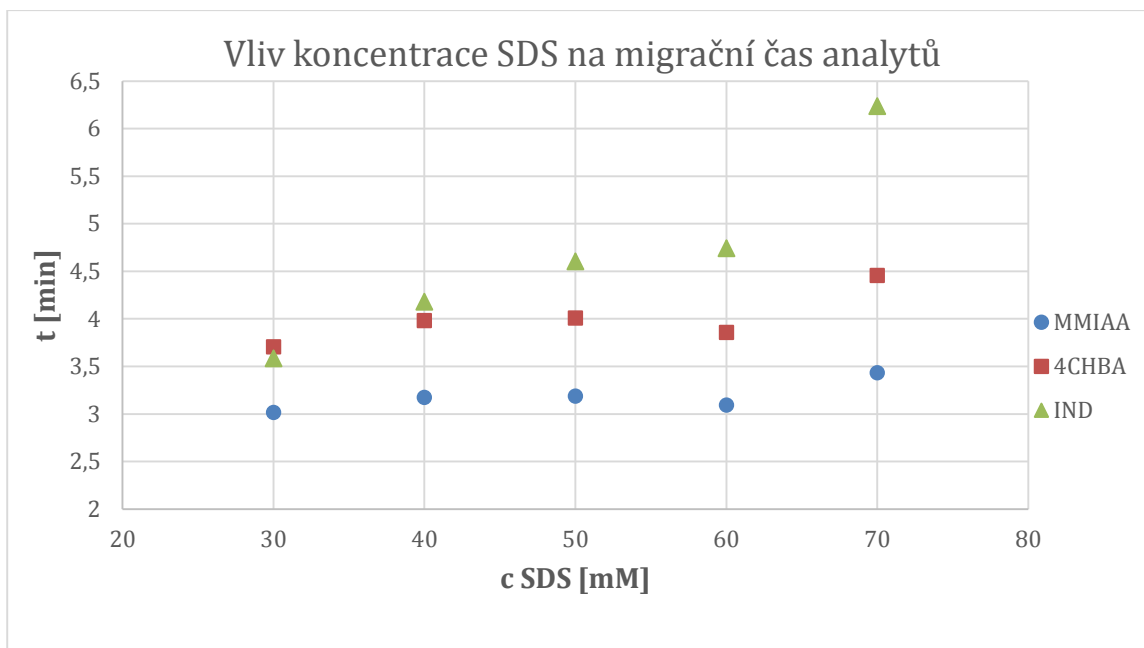
Hodnota pH byla optimalizována pro roztok elektrolytu, který obsahoval 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS a 10% (v/v) MeOH. Roztok standardů obsahoval indomethacin (250 µg/ml), MMIAA (2,5 µg/ml) a kyselinu 4-chlorbenzoovou (2,5 µg/ml). Vliv pH byl měřen pro hodnoty 6,6; 6,8; 7,0; 7,2 a 7,4. Hodnoty pH byly upravovány pomocí 0,1M roztoku hydroxidu sodného. Vzhledem k tomu, že pH má vliv na elektroforetickou pohyblivost, bylo zvoleno pH 7,0; kdy bylo dosaženo nejkratšího migračního času analytů (Obr.20). Na migraci analytů má kromě pH vliv také mechanismus MEKC, což způsobuje různorodou tendenci migračních časů.



Obrázek 20: **Vliv pH na migrační čas analytů, BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, koncentrace IND: 250 µg/ml, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5mg/ml**

5.1.1.5. Vliv koncentrace tenzidu

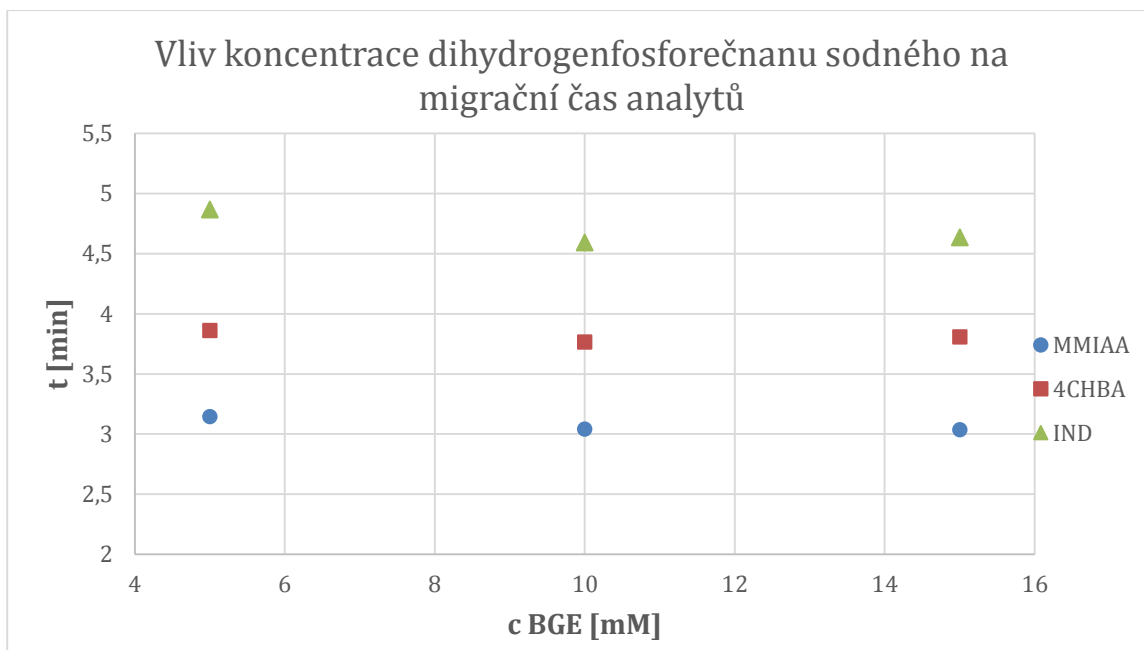
Vliv koncentrace SDS na migrační čas analytů byl zjišťován pro hodnoty 30 mM, 40 mM, 50mM, 60mM, 70mM SDS. Roztok elektrolytu dále obsahoval 10mM hydrogenufosforečnan sodný, 10% (v/v) MeOH, pH upraveno na 7,0. Byl použit roztok standardů o koncentraci indomethacinu 250 µg/ml, koncentraci MMIAA a kys. 4- chlorbenzoové 2,5 µg/ml. Při koncentraci 30mM SDS byl migrační čas indomethacinu kratší než migrační čas kys. 4- chlorbenzoové. Při 70mM SDS měl indomethacin vyšší migrační čas. Nejlepší seperace píků byla dosažena při 60mM SDS a zároveň při této koncentraci SDS byla dosažena nejkratší doba analýzy. (Obr.21)



Obrázek 21: **Vliv koncentrace SDS na migrační čas analytů, BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 10% MeOH, koncentrace IND: 250 µg/ml, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 µg/ml, koncentrace IND: 2,5 µg/ml, pH 7,0**

5.1.1.6. Vliv koncentrace dihydrogenfosforečnanu sodného

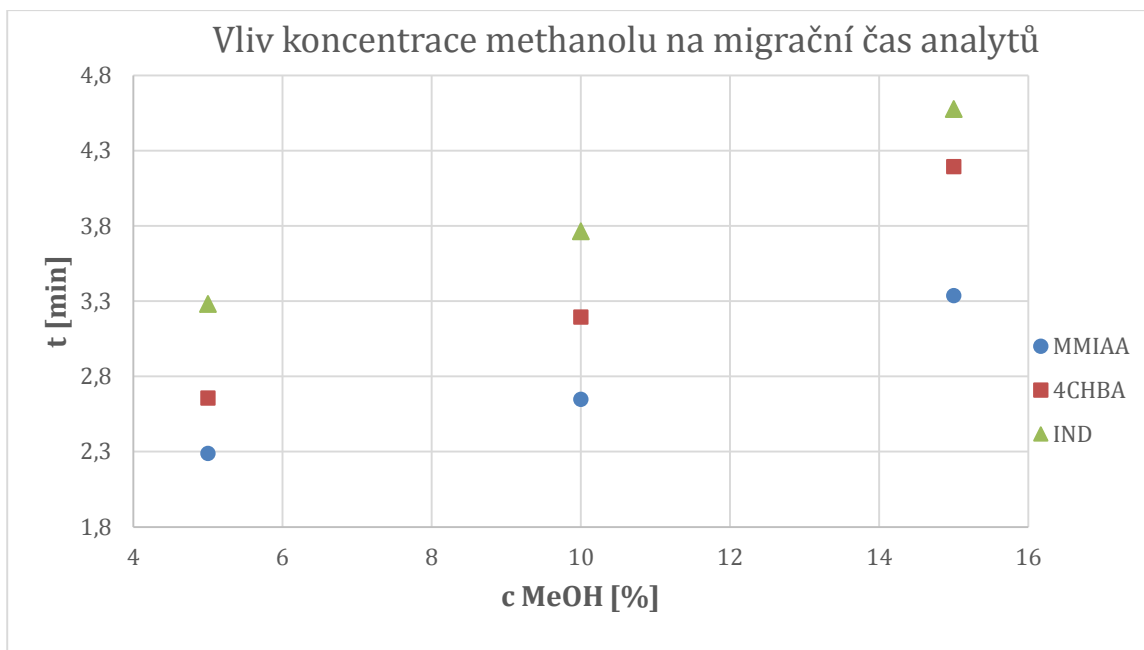
Při optimalizaci hydrogenfosforečnanu sodného v elektrolytovém systému byly proměřeny hodnoty koncentrace 5mM, 10mM a 15mM. Elektrolytový systém dále obsahoval 60mM SDS a 10% (v/v) MeOH, pH bylo upraveno na 7,0. S ohledem na dobu analýzy byla zvolena koncentrace 10 mM dihydrogenfosforečnanu sodného. (Obr.22) Při vyšší koncentraci navíc docházelo k vzestupu proudu.



Obrázek 22: Vliv koncentrace dihydrogenfosforečnanu sodného na migrační čas analytů, BGE: 60mM SDS, 10% MeOH, koncentrace IND: 250 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 $\mu\text{g/ml}$, pH 7,0

5.1.1.7. Vliv koncentrace methanolu

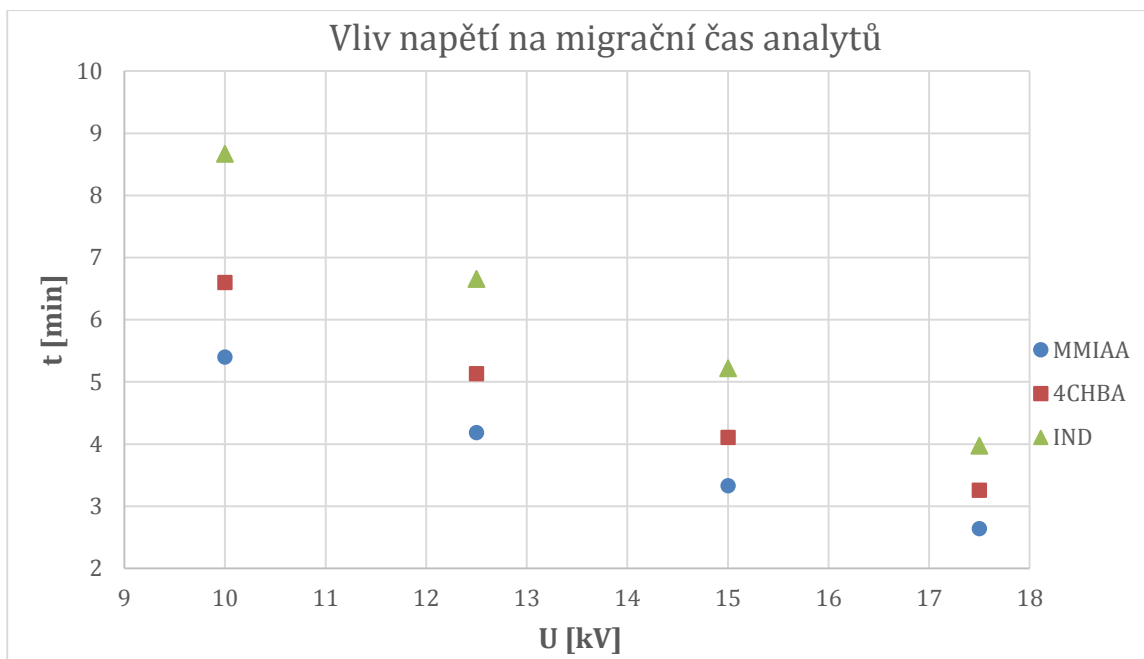
Pro zjištění vhodného obsahu methanolu v celkovém množství elektrolytu, obsahujícím 60 mM SDS, 10 mM dihydrogenfosforečnan sodný a pH 7,0, byly měřeny 5%, 10% a 15% (v/v) koncentrace. Se vzrůstajícím podílem methanolu v elektrolytu se prodlužovala doba analýzy. S ohledem na hodnoty rozlišení byl zvolen 10% (v/v) obsah methanolu v elektrolytovém systému. (Obr.23)



Obrázek 23: **Vliv koncentrace methanolu na migrační čas analytů, BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, koncentrace IND: 250 µg/ml, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 µg/ml, pH 7,0**

5.1.1.8. Vliv napětí

Separace látek v elektrolytovém systému obsahujícím 10 mM hydrogenfosforečnan sodný, 60 mM SDS, 10 % (v/v) MeOH o pH 7,0 byla testována při napětí 10; 12,5; 15; 17,5 kV. Se vzrůstajícím napětím se zkracoval čas analýzy, což odpovídá teoretickým zkušenostem (kap. 2.1.6.3). Vzhledem k optimální separaci, rozlišení a ostrosti píků bylo zvoleno napětí 15 kV. (Obr. 24)



Obrázek 24: *Vliv napětí na migrační čas analytů, BGE: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, koncentrace IND: 250 µg/ml, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 µg/ml, pH 7,0*

5.1.1.9. Testování vnitřního standardu

Mezi vnitřními standardy byly vyzkoušeny kyselina benzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 1-naftyloctová, naproxen a ketoprofen. Jako vhodný vnitřní standard byla vybrána kyselina 1-naftyloctová, jejíž pík měl migrační čas mezi píky nečistot MMIAA a 4CHBA a dobré rozlišení obou nečistot. Kyselina benzoová migrovala až za oběma nečistotami. Kyselina 4-hydroxybenzoová migrovala mezi nečistotami, ale vykazovala špatné rozlišení s 4-CHBA. Špatné rozlišení s MMIAA vykazoval naproxen. Ketoprofen migroval ve stejný čas jako MMIAA a jejich píky se překrývaly. Při testování byla koncentrace zkoušených standardů vždy 5 µg/ml a koncentrace degradačních produktů 2,5 µg/ml.

5.1.2. Optimalizace LVSS

Pro optimalizaci LVSS byl zkoušen hydrostatický tlak 25 mBar a 100 mBar. U hydrostatického tlaku 100 mBar byla testována doba dávkování 10, 20 a 30s. Tlak 100 mBar s dobou dávkování 20 a 30 s způsobilo vymytí analytů. Nejlepší rozlišení píků

bylo dosaženo při dávkování hydrostatickým tlakem 100 mBar po dobu 10 sekund. Objem nadávkovaného vzorku byl 256 nl, což odpovídalo přibližně 24% objemu kapiláry.

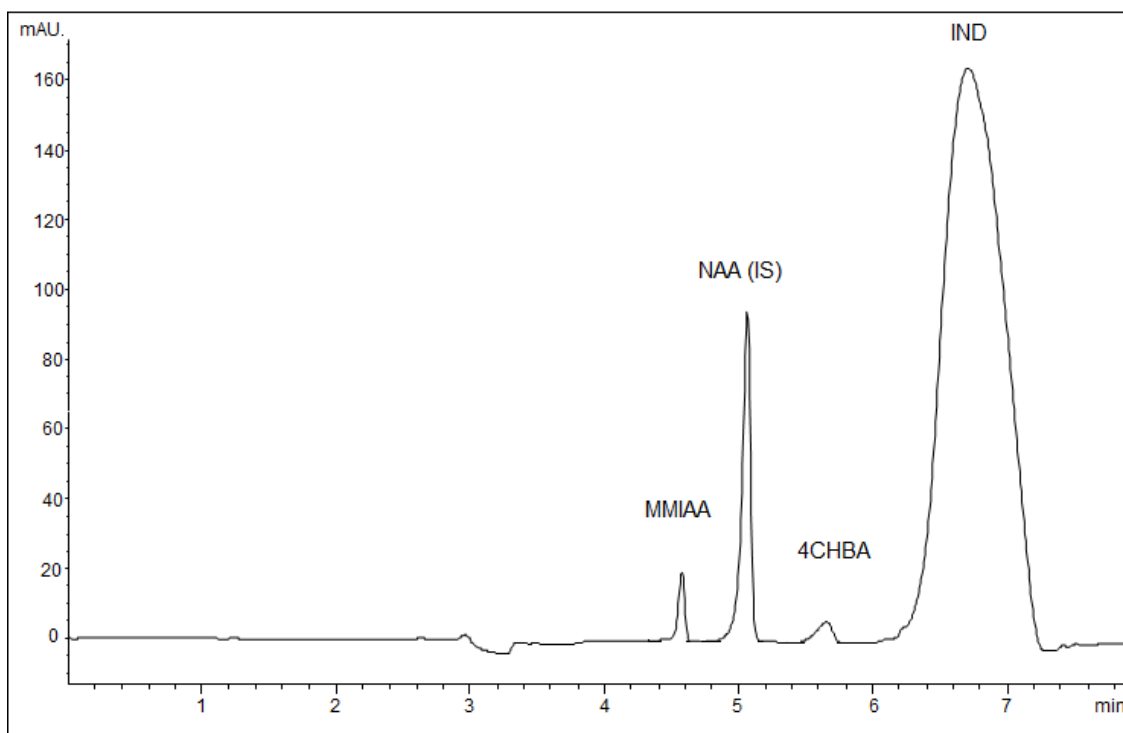
5.1.3. Optimální podmínky separace

Výsledky optimalizace analytických parametrů a složení pracovního elektrolytového systému jsou uvedeny v Tab.3.

Tabulka 3: *Optimální podmínky analýzy*

| | |
|------------------------------|---|
| Rozpouštědlo | 10% (v/v) methanol |
| Složky pufru, koncentrace | Dihydrogenfosforečnan sodný: 10 mM SDS: 60 mM |
| pH | 7,0 |
| Teplota | 25°C |
| Napětí | 15 kV |
| Detekce | 224 nm, 234 nm |
| Dávkovací tlak | 100 mBar |
| Doba dávkování | 10 s |
| Stacking | -7,5 kV po 1,5 min. přepnutí 15 kV |
| Celk. délka kapiláry | 33 cm |
| Efekt. délka kapiláry | 24,5 cm |
| Vnitřní prům. kapiláry | 75 µm |

Záznam analýzy za optimálních podmínek a složení pracovního elektrolytu je uveden na Obr.25. Pracovní roztok obsahoval indomethacin o koncentraci 250 µg/ml, MMIAA a kys. 4-chlorbenzoovou v koncentraci 2,5 µg/ml a kys. 1-naftylactovou o koncentraci 5 µg/ml.



Obrázek 25: **Elektroforeogram – záznam analýzy standardů za optimálních CE-LVSS podmínek, BGE: 10mM hydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,0; koncentrace IND: 250 µg/ml, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 µg/ml, koncentrace NAA: 5 µg/ml**

5.1.4. Způsobilst systému

5.1.4.1. Rozlišení

Rozlišení (R_s) bylo vypočítáno podle Rovnice 14. Hodnoty výpočtů jsou uvedeny v Tab.4. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. (29)

Tabulka 4: **Rozlišení mezi jednotlivými píky (n=6)**

| Dvojice analytů | Rozlišení R_s |
|------------------------------|-----------------|
| MMIAA 2,5µg/ml – IS 5µg/ml | 5,00 |
| IS 5µg/ml – 4CHBA 5µg/ml | 7,38 |
| 4CHBA 5µg/ml – IND 250 µg/ml | 5,81 |

5.1.4.2. Účinnost separace

Účinnost separace se vypočítá jako zdánlivý počet teoretických pater (N) a jako výškový ekvivalent teoretického patra (H) podle Rovnic 14 a 15. Výsledky jsou uvedeny v Tab.5.

Tabulka 5: *Hodnoty zdánlivého počtu teoretických pater a výškových ekvivalentů (n=6)*

| Analyt [µg/ml] | N | H [µm] celk. délka | H [µm] efekt. délka |
|----------------|-------|--------------------|---------------------|
| MMIAA 2,5 | 32189 | 10,2 | 7,6 |
| 4CHBA 5 | 8668 | 38,0 | 28,2 |
| IND 250 | 6131 | 53,8 | 39,9 |

5.1.4.3. Opakovatelnost

Byla hodnocena opakovatelnost migračních časů a poměrů korigovaných ploch píků. Celkem bylo provedeno šest měření, koncentrace standardů byla 2,5 µg/ml MMIAA, 5 µg/ml 4CHBA, 250 µg/ml indomethacinu a 5 µg/ml NAA. Hodnoty jsou zaznamenány v Tab.6.

Tabulka 6: *Opakovatelnost poměru korigované plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu a opakovatelnost migračních časů. (n=6)*

| Analyt | RSD [%] poměr korig. ploch | RSD [%] migrační čas |
|--------|-------------------------------|-------------------------|
| MMIAA | 0,57 | 0,90 |
| 4CHBA | 0,46 | 0,54 |
| IND | 0,30 | 0,06 |

Největší relativní směrodatnou odchylku migračního času i poměru korigovaných ploch píků vykazovala nečistota MMIAA (0,57 a 0,90%). Všechny hodnoty relativních směrodatných odchylek obou analytů můžeme považovat za velmi dobré.

5.1.4.4. Faktor symetrie píku

Hodnota faktoru symetrie (A_s) 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii. U chromatografických separačních metod je rozmezí hodnot faktoru symetrie píku 0,8 až 1,5, pokud není předepsáno jinak. (29)

Faktor symetrie byl vypočítán podle Rovnice 12.

V Tab. 7 jsou uvedené hodnoty faktorů symetrie píků analytů.

Tabulka 7: **Hodnoty faktoru symetrie píku ($n=6$)**

| Analyt | Faktor symetrie A_s |
|----------------------------|-----------------------|
| MMIAA 2,5 $\mu\text{g/ml}$ | 0,85 |
| 4CHBA 5,0 $\mu\text{g/ml}$ | 0,71 |
| IND 250,0 $\mu\text{g/ml}$ | 0,64 |

Požadavek na symetrii píku byl splněn u MMIAA. Hodnoty 4CHBA a IND byly nižší, než je požadovaný limit.

5.2. Kvantitativní analýza

Obsah stanovovaných nečistot se vypočítá pomocí poměru plochy píku nečistoty k ploše píku vnitřního standardu, které jsou korigovány jejich migračními časy. K měření kalibračních závislostí byl použit optimalizovaný pracovní elektrolyt. Každá koncentrace byla měřena celkem šestkrát. Z jednotlivých měření byl pro každou koncentraci vypočítán průměr poměrů ploch. Pro vyhodnocení kalibrační závislosti byla použita metoda lineární regrese. Vlivem zakoncentrování směsi indomethacinu a jeho dvou nečistot v koncentračních poměrech očekávaných v reálných vzorcích, docházelo při vyšších koncentracích indomethacinu k překročení separační kapacity kapiláry a nebylo ho tak možné kvantifikovat. Pro stanovení vlastní účinné látky, indomethacinu, by musel být vzorek naředěn, tím by ovšem došlo k snížení detekčních limitů nečistot. Pro praktické účely byla vyhodnocena kalibrační závislost pouze pro nečistoty (koncentrace indomethacinu byla konstantní), jejichž kvantifikace je z analytického hlediska náročnější na provedení a je také důležitým aspektem v systému jistění jakosti. Vlastní indomethacin by bylo možné kvantifikovat ve stejném vzorku vyvinutou MEKC metodou v režimu bez LVSS.

Rovnice přímky:

$$y = k \cdot x + q$$

Rovnice 17

kde:

y... poměr plochy píku nečistoty k ploše píku vnitřního standardu, korigovaný migračními časy

k... směrnice přímky

x... koncentrace nečistoty

q... absolutní člen

5.2.1. Kalibrační závislost pro MMIAA

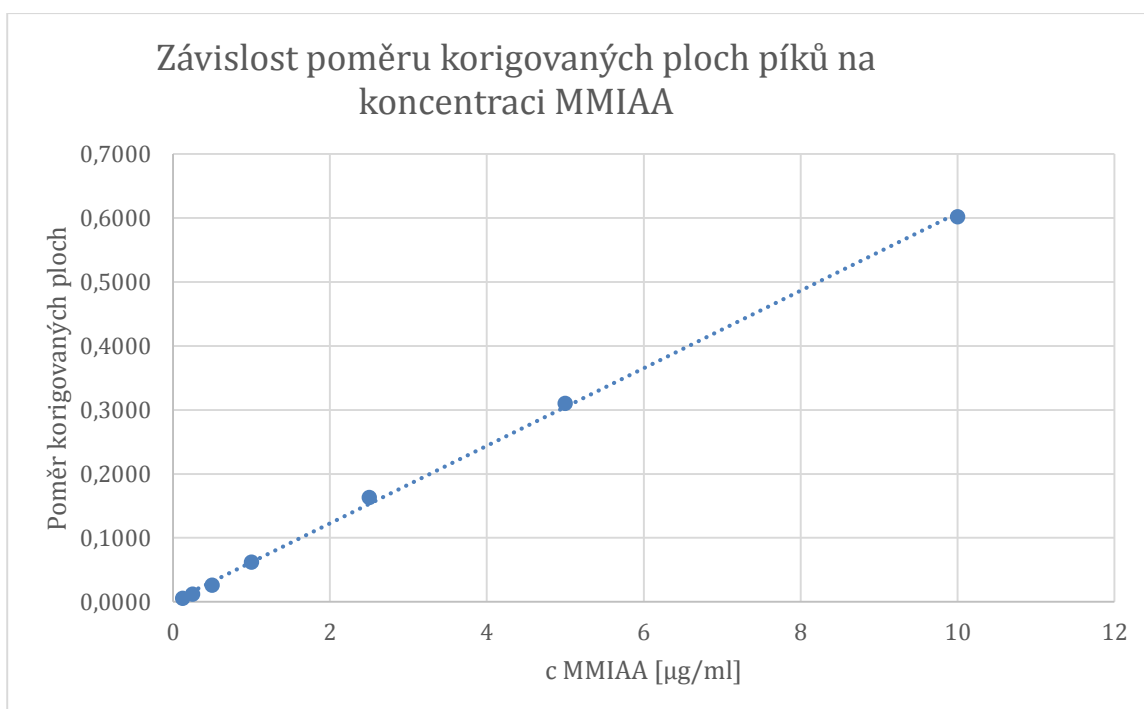
Závislost korigovaného poměru ploch na koncentraci MMIAA byla měřena pro koncentrace: 0,125 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml. (Obr.26)

Počet bodů: 7

$k = 0,0607$

$q = 0,001$

Korelační koeficient = 0,9992



Obrázek 26: **Kalibrační závislost pro MMIAA; BGE: 10mM hydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,0; koncentrace NAA: 5 µg/ml**

5.2.2. Kalibrační závislost pro kyselinu 4-chlorbenzoovou

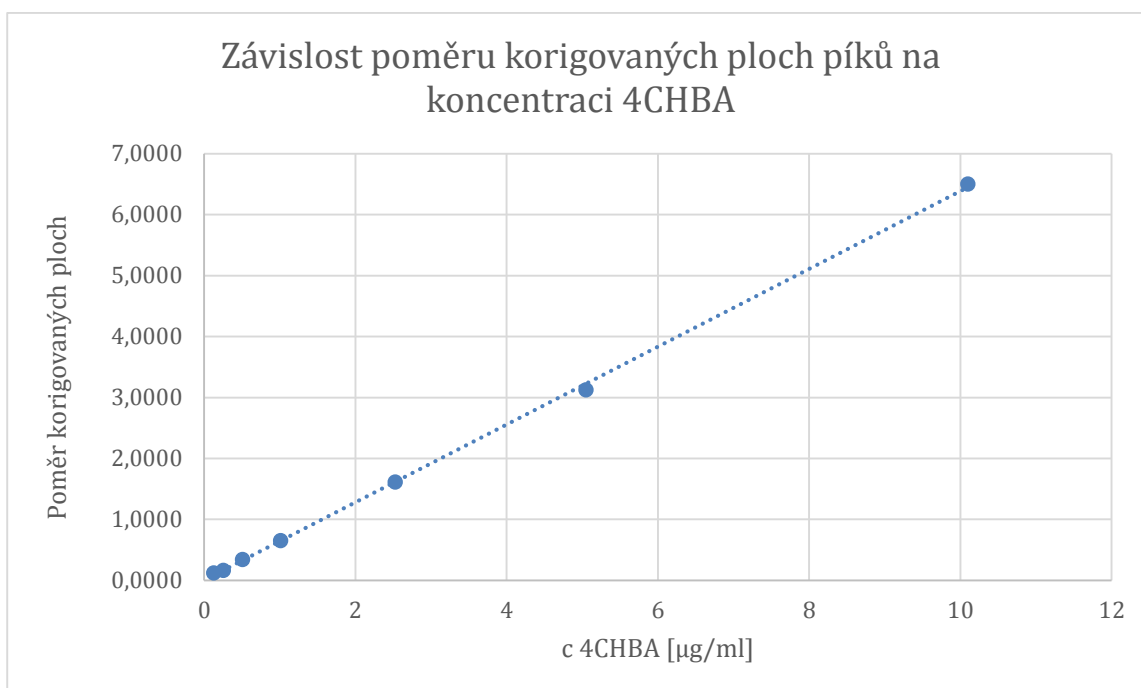
Závislost korigovaného poměru ploch na koncentraci kyseliny 4-chlorbenzoové byla měřena pro koncentrace: 0,125 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5,0 $\mu\text{g/ml}$; 10,0 $\mu\text{g/ml}$. (Obr.27)

Počet bodů: 7

$k = 0,6385$

$q = 0,0022$

Korelační koeficient = 0,9995



Obrázek 27: **Kalibrační závislost pro MMIAA; BGE: 10mM hydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH pH 7,0; koncentrace NAA: 5 $\mu\text{g/ml}$**

5.3. Limit detekce a kvantifikace

Pro oba dva degradační produkty byl stanoven detekční a kvantifikační limit. K výpočtu byla použita Rovnice 11 a Rovnice 12. Výsledky jsou uvedeny v Tab.8.

Tabulka 8: *Hodnoty LOD a LOQ degradačních produktů*

| Analyt | LOD [ng/ml] | LOQ [ng/ml] |
|--------|-------------|-------------|
| MMIAA | 38 | 115 |
| 4CHBA | 36 | 109 |

5.4. Přesnost metody

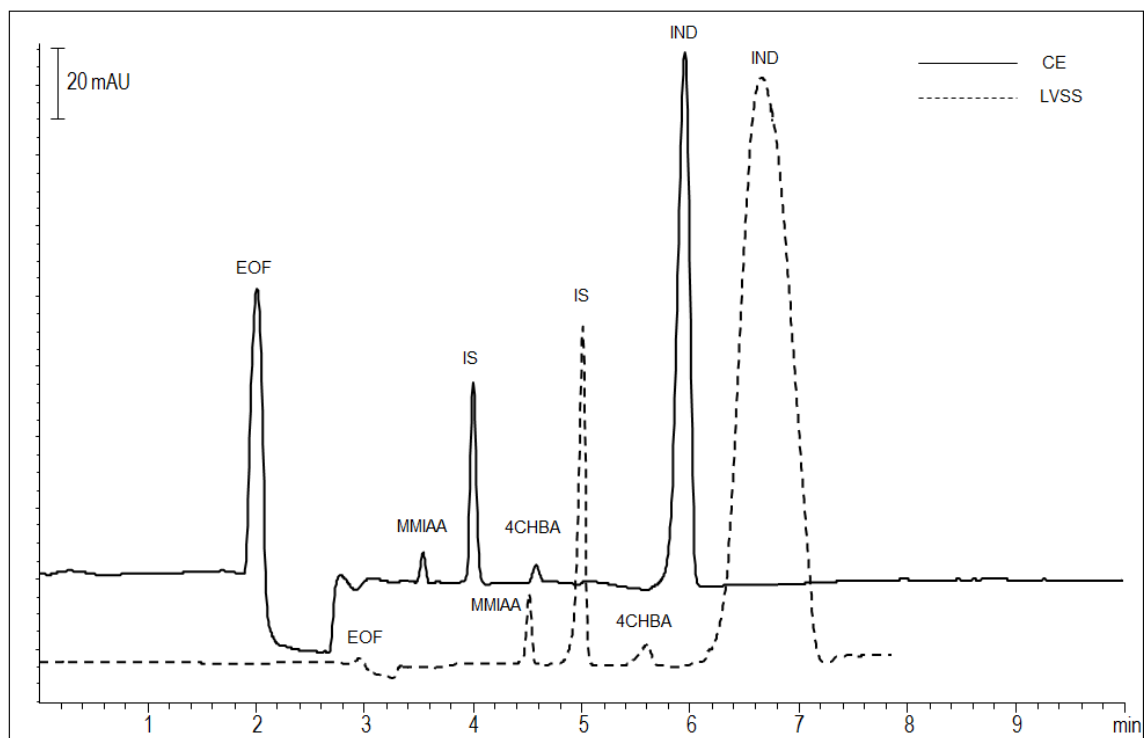
Byla ověřována přesnost poměru ploch píku analytu k ploše píku vnitřního standardu, korigovaných migračními časy. Bylo připraveno šest vzorků HVLP, postupem uvedeným v kap. 4.3.8. Každý byl třikrát změřen, pro výpočet byl použit průměr. RSD byla vypočítána podle Rovnice 18. Výsledky jsou zapsány v Tab. 9.

Tabulka 9: *Hodnoty RSD poměru korigovaných ploch píků*

| Analyt | RSD [%] poměr korig. ploch |
|--------|----------------------------|
| MMIAA | 6,90 |
| 4CHBA | 7,11 |

5.5. Koncentrační faktor

Byl porovnán poměr plochy píků při použití zoptimalizovaného LVSS a při standardní MEKC. Průměrně bylo dosaženo 8násobného zakoncentrování obou degradačních produktů. Srovnání elektroforeogramu standardů pomocí LVSS a v běžném režimu CE znázorňuje Obr.28.



Obrázek 28: **Srovnání elektroforeogramu standardů za optimálních podmínek CE a pomocí LVSS; obě metody při: BGE: 10mM hydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,0; koncentrace IND: 250 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace MMIAA a 4CHBA: 2,5 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace NAA: 5 $\mu\text{g/ml}$**

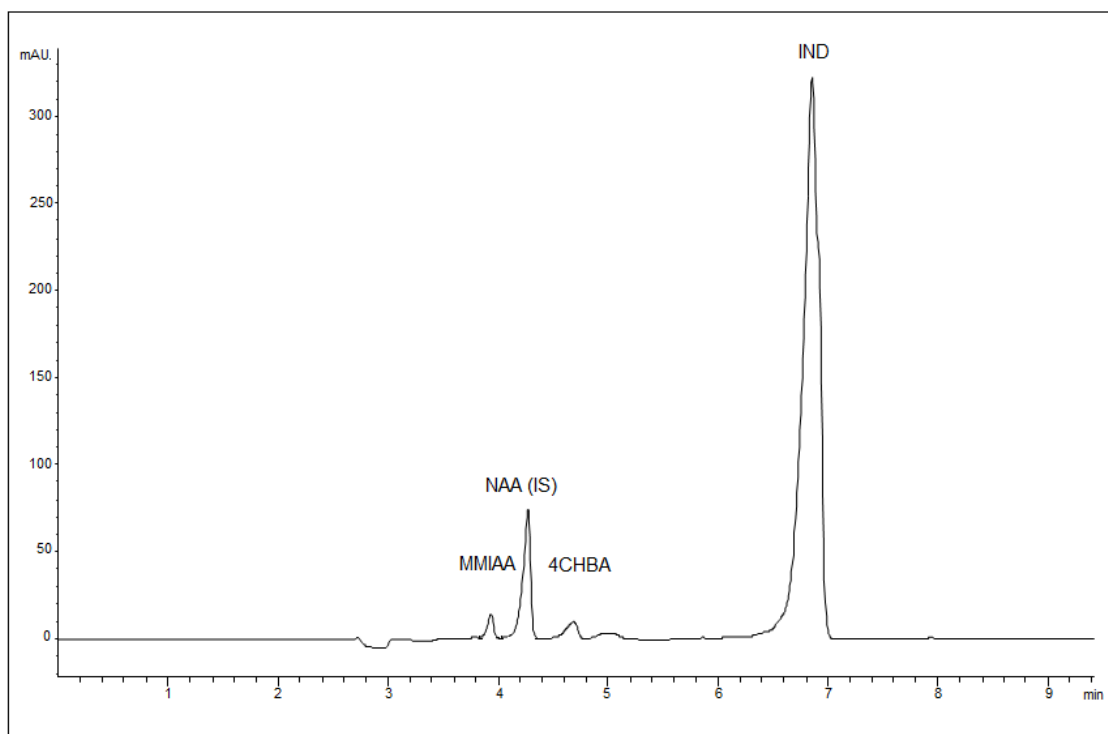
5.6. Testování stanovení degradačních produktů v HVLP

Optimalizované podmínky pro LVSS byly testovány na analýze léčivého přípravku Indobene gel metodou vnitřního standardu.

Ve 100 g léčivého přípravku byl obsažen indomethacin v množství 1g. Léčivý přípravek obsahoval následující pomocné látky: isopropylalkohol, diisopropyl-adipát, smrková silice, karbomer 980, trometamol, čištěná voda.

Na elektroforeogramu znázorňujícím analýzu léčivého přípravku (Obr.29) byl zaznamenán pík s migračním časem okolo 5 minut. Vzhledem ke složení léčivého přípravku by se mohlo jednat o pomocnou látku diisopropyl-adipát, ale tento analyt nebyl více zkoumán.

Pro výpočet obsahu degradačních produktů v přípravku byly použity rovnice lineární regrese z kalibračních závislostí. V přípravku byla zjištěna koncentrace MMIAA 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a koncentrace 4CHBA 4,47 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 29: **Elektroforeogram přípravku Indobene gel, BGE: 10mM hydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% MeOH, pH 7,0; 0,25 g Indobene gel, koncentrace NAA: 5 $\mu\text{g/ml}$**

5.7. Srovnání s metodou HPLC

Metoda vypracovaná v této diplomové práci:

- Celkový čas analýzy: < 7,5 min
- Migrační časy: 3,94 min (MMIAA), 4,69 min (4CHBA), 6,82 min (IND)
- LOD: 38 ng/ml (MMIAA), 36 ng/ml (CHBA)
- LOQ: 115 ng/ml (MMIAA), 109 ng/ml (CHBA)
- Opakovatelnost: migrační čas (n=6): RSD=0,57 % (MMIAA) a RSD=0,46% (4CHBA)
- Opakovatelnost: poměr ploch (n=6): RSD=0,90% (MMIAA) a RSD=0,54% (4CHBA)
- Přesnost metody: RSD=6,90% (MMIAA) a RSD=7,11% (4CHBA)

HPLC analýza indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů: (29)

- Celkový čas analýzy: < 7,5 min
- Migrační časy: 2,04 min (MMIAA), 2,46 min (4CHBA), 5,40 min (IND)
- LOD: 56,9 ng/ml (MMIAA), 225 ng/ml (CHBA)
- LOQ: 190 ng/ml (MMIAA), 750 ng/ml (CHBA)
- Opakovatelnost: migrační čas (n=6): RSD=0,18 % (MMIAA) a RSD=0,23% (4CHBA)
- Opakovatelnost: poměr ploch (n=6): RSD=0,45% (MMIAA) a RSD=0,66% (4CHBA)
- Přesnost metody: RSD=3,10% (MMIAA) a RSD=3,25% (4CHBA)

Z porovnání výsledků obou analýz vyplývá, že doba analýzy je zhruba stejná. Metody dosahují srovnatelných výsledků. Limit detekce byl v CE o něco vyšší. Jedná se o metodu s odlišným mechanismem v porovnání s HPLC, mohou se tak v určitých případech doplňovat. Představuje tak další možnost pro stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů.

6. ZÁVĚR

- Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu zakoncentrování vzorku z velkého objemu (LVSS) v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) pro separaci a stanovení indomethacinu a jeho dvou degradačních produktů.
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm.
- Složení optimálního základního elektrolytu bylo: 10mM dihydrogenfosforečnan sodný, 60mM SDS, 10% (v/v) MeOH, pH bylo upraveno na 7,0.
- Při standardní CE bylo vkládáno napětí 15 kV, při LVSS bylo napětí -7,5 kV, po 1,5 minutě byla polarita obrácena na 15 kV, teplota kapiláry byla v obou případech 25°C.
- Detekce probíhala při vlnové délce 224 nm pro MMIAA a při 234 nm pro 4CHBA.
- Jako vhodný vnitřní standard byla zvolena kyselina 1-naftylactová.
- Migrační časy byly 3,94 min MMIAA, 4,69 min 4CHBA a 6,82 min IND.
- Kalibrační závislost byla pro oba dva degradační produkty měřena v rozmezí od 0,125 $\mu\text{g/ml}$ do 10 $\mu\text{g/ml}$. Korelační koeficient byl pro MMIAA 0,9992 a pro 4CHBA 0,9995.
- Byla hodnocena opakovatelnost migračních časů a poměru korigovaných ploch pro koncentraci IND 250 $\mu\text{g/ml}$, MMIAA 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a 4CHBA 5 $\mu\text{g/ml}$, s obsahem vnitřního standardu 5 $\mu\text{g/ml}$. Celkem bylo provedeno šest měření ihned po sobě. Relativní směrodatná odchylka migračních časů byla pro IND 0,30%, pro MMIAA 0,57% a pro 4CHBA 0,46%. Relativní směrodatná odchylka poměru korigovaných ploch byla pro IND 0,06%, pro MMIAA 0,90% a pro 4CHBA 0,54%.
- Rozlišení R_s mezi jednotlivými píky degradačních produktů a vnitřního standardu bylo 5,00 (MMIAA) a 7,38 (4CHBA), mezi píkem 4CHBA a IND bylo 5,81.
- Počet teoretických pater N byl 6131 u IND; 32189 u MMIAA a 8668 u 4CHBA. Výškový ekvivalent teoretického patra H byl pro celkovou délku kapiláry 53,8 μm (IND); 10,2 μm (MMIAA) a 7,6 μm (4CHBA), pro efektivní délku kapiláry 39,9 μm (IND); 38,0 μm (MMIAA) a 28,2 μm (4CHBA).
- Limit detekce byl 38 ng/ml (MMIAA) a 36 ng/ml (CHBA) a limit kvantifikace 115 ng/ml (MMIAA) a 109 ng/ml (CHBA).
- Metoda byla předběžně testována pro stanovení kyseliny 4-chlorbenzoové a kyseliny 5-methoxy-2methyl-3indolyloctové v přípravku Indobene gel (RSD= 6,90% (MMIAA) a RSD= 7,11% (4CHBA)).

7. CITOVANÁ LITERATURA

1. International Conference on Harmonization (ICH). ICH Tripartite Guideline Q3B(R2): Impurities in new Drug Substances. [s.l.] : ICH, 2 červěn 2006. 12 s. dostupné z:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Concept_papers/Q3B_R2_Concept_Paper.pdf
2. KLIMEŠ, J. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. 265 s. ISBN 978-80-87009-291
3. LUNTE, S., D. RADZIK. Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis. 1st ed. Tarrytown, N.Y., U.S.A.: Pergamon, 1996, x, 511 p. ISBN 0080420141.
4. Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications. Editor Kevin D. A. Totowa, N.J.: Humana Press, c1996, ix, 349 p. Methods in molecular biology, v. 52. ISBN 0896033155.
5. GROSSMAN, P. D., J. C. COLBURN. Capillary electrophoresis: theory & practice. San Diego: Academic Press, c1992, xvi, 352 p. ISBN 012304250-x
6. WEINBERGER, R. Practical capillary electrophoresis. 2nd ed. San diego, CA: Academic Press, c2000, xvii, 462 p. ISBN 0127423567-.
7. CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1998, 552 p. ISBN 084939127x.
8. KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chemické Listy. 1997, (91) 5, 320-329.
9. 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.
10. HEIGER, D. N. High performance capillary electrophoresis: an introduction. 2nd ed. France?: Hewlett Packard Co., c1992, ii, 2-136 p.
11. RÍOS CASTRO, Á. Analysis and detection by capillary electrophoresis. 1st ed. Editor M Marina, Miguel Valcárcel Cases. Amsterdam: Elsevier, 2005, xxviii, 767 s. Comprehensive analytical chemistry, vol. 45. ISBN 0444517189.
12. KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 8086369072.
13. Handbook of capillary electrophoresis. Boca Raton: CRC Press, 1994, 649 s. ISBN 084938690x.
14. FRAZIER, R. A., J. M. AMES a H. E. NURSTEN. Capillary electrophoresis for food analysis: method development. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, xiv, 127 p.

15. VOLPI, N. Capillary electrophoresis of carbohydrates: from monosaccharides to complex polysaccharides. New York: Humana/Springer, c2011, xiii, 277 p. ISBN 1607618753-.
16. SATINDER AHUJA, M. Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 9780123725738.
17. SØRENSEN, H. Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis. Cambridge: Royal Society of Chemistry, c1999, xvii, 470 p. RSC food analysis monographs.
18. RIGHETTI, P. Capillary electrophoresis in analytical biotechnology. Boca Raton: CRC Press, c1996, 551 p. ISBN 0849378257-.
19. KHALEDI, M. G. High-performance capillary electrophoresis: theory, techniques, and applications. New York: Wiley, c1998, xxxii, 1047 p. ISBN 0471148512.
20. PASQUALI, M. Gelation: Grow with the flow. Nature materials, 2010, 9.5: 381-382.
21. NISHI, H., TERABE, S. Application of micellar electrokinetic chromatography to pharmaceutical analysis. Electrophoresis, 1990, 11.9: 691-701.
22. MUIJSELAAR, P. G.; OTSUKA, K., TERABE, S. Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography A, 1997, 780.1: 41-61.
23. LI, S. F. Capillary electrophoresis: principles, practice and applications. Amsterdam: Elsevier, 1993, 582 s. Journal of chromatography library, vol. 52. ISBN 0444815902.
24. OSBOURN, D. M., WEISS, D. J., LUNTE, C. E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. Electrophoresis, 2000, 21.14: 2768.
25. PUIG, P. et al. Use of large-volume sample stacking in on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis for improved sensitivity. Electrophoresis, 2008, 29.6: 1339-1346.
26. MALA, Z., GEBAUER, P., BOČEK, P. Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis. Electrophoresis, 2011, 32.1: 116-126.
27. Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: principles, applications, and limitations. Editor C. D García, K. Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho. Hoboken: John Wiley & Sons, c2013, xxii, 394 s. ISBN 9780470572177.
28. LIN, C., KANETA, T. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. Electrophoresis, 2004, 25.23-24: 4058-4073.
29. Český lékopis 2009. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.

30. O'BRIEN, M., et al. Analytical profiles of drug substances. Indomethacin. San Diego: Academic Press Inc, 1984, 211-38.
31. CURRY, S. H., et al. Preparation and stability of indomethacin solutions. Canadian journal of physiology and pharmacology, 1982, 60.7: 988-992.
32. NOVÁKOVÁ, L., et al. Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005, 37.5: 899-905.
33. ŽÁKOVÁ, P., et al. Application of monolithic columns in pharmaceutical analysis. Determination of indomethacin and its degradation products. Journal of separation science, 2009, 32.15-16: 2786-2792.
34. DAWIDOWICZ, A. L., KONDZIOLA, K., KOBIELSKI, M. Determination of Free Indomethacin in Human Plasma Using HPLC with UV Detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®, 2009, 32.18: 2686-2698.
35. KOBLOVÁ, P., et al. Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolithic column. Talanta, 2011, 84.5: 1273-1277.
36. HAQ, N., et al. An environmentally benign approach for rapid analysis of indomethacin using a stability-indicating RP-HPLC method. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2014, 37.6: 878-892.
37. HAJJIZADEH, M., et al. Electrooxidation and determination of mefenamic acid and indomethacin using a copper electrode. Chemia analityczna, 2008, 53.3: 429-444.
38. SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. Journal of chromatography A, 2003, 987.1: 57-66.
39. NEUBAUER, J., M. SEDLAČÍK, O. KŘÍŽ. Základy statistiky: aplikace v technických a ekonomických oborech. 1. vyd. Praha: Grada, 2012, 236 s. ISBN 9788024742731.
40. HENDL, J. Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat. 3., přeprac. vyd. Praha: Portál, 2009, 695 s. ISBN 9788073674823.