

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

**ANALÝZA KETOPROFENU, METHYLPARABENU
A PROPYLPARABENU POMOCÍ MICELÁRNÍ
ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRFIE
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

HRADEC KRÁLOVÉ, 2007

JOSEF BALCAR

Děkuji Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za poskytnuté konzultace, cenné rady a připomínky při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Šafrovi za ochotné předávání zkušeností během celé práce a dalším pracovníkům katedry analytické chemie za jejich vstřícnost.

1. ÚVOD

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

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

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

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

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

Průkopníkem micelární elektrokinetické chromatografie byl Terabe.¹

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

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

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

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

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

Mezi základní varianty kapilární elektroforézy patří:

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

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

Separace probíhá v kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapětového zdroje, které vytvářejí pole nutné pro separaci. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který

snímá analytický signál. Tento signál je zapsán liniovým zapisovačem nebo dále zpracován počítačem.¹

2.1.1. Elektroforetická pohyblivost

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

$$v = u \cdot E$$

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

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

E – intenzita elektrického pole [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$]

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

2.1.2. Iontová pohyblivost

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

2.1.3. Skutečná pohyblivost

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

2.1.4. Efektivní pohyblivost

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

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

u_i = pohyblivost jednotlivých iontových forem látky

x_i = molární zlomky

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

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

Pro slabé jednosytné baze je člen $(pK_a - pH)$ nahrazen členem $(pH - pK_a)$.³

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

2.1.5. Migrační čas

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

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

l_t – celková délka kapiláry [m]

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

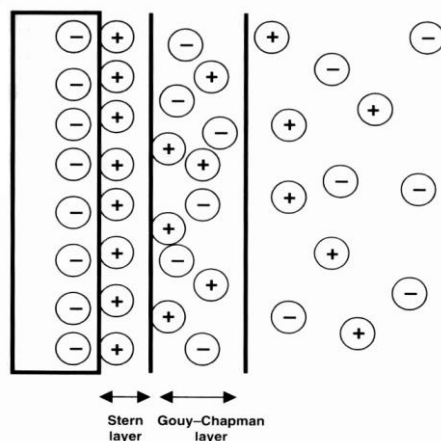
U – pracovní napětí [V]

t_m – migrační čas látky [s]

t_0 – migrační čas nenabitých částic [s]

2.1.6. Elektroosmotický tok (EOF)

Podstatnou složkou HPCE operací je elektroosmotický tok. EOF je objemový tok kapaliny v kapiláře a je důsledkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry. Povrchy pevných látek mají ve vodném prostředí zpravidla přebytek negativních nábojů. To může vyplývat z ionizace povrchu a/nebo z adsorpce iontů na povrch. U křemenných kapilár dochází pravděpodobně k oběma procesům, ačkoliv EOF je nejsilněji kontrolován množstvím silanolových skupin (SiOH), které mohou existovat v aniontové formě (SiO⁻). Negativní náboje těchto skupin přitahují kationty tlumivého roztoku (protiionty) a dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy přilehlé ke stěně kapiláry (Obr. 1). Vytváří se tak zeta potenciál ζ . Když je na kapiláru vloženo napětí, kationty tvořící difúzní dvojvrstvu jsou přitahovány ke katodě. Protože jsou solvatovány, strhávají s sebou roztok v kapiláře².



Obr. 1 Uspořádání iontů v kapiláře⁷

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

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

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

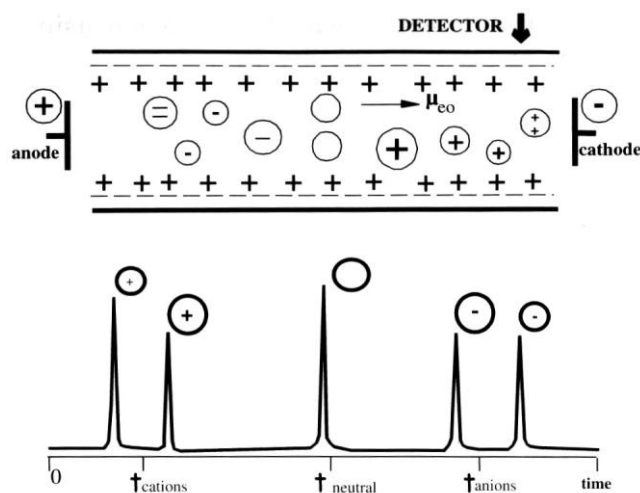
ζ – elektrokinetický potenciál [V]

η – viskozita roztoku [N.s.m]

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

Z praktického hlediska může být přítomnost EOF výhodná, protože způsobuje pohyb téměř všech látek stejným směrem bez ohledu na náboj. Za normálních podmínek (tj. negativně nabitý povrch kapiláry) EOF směřuje od anody ke katodě. Anionty jsou unášeny směrem ke katodě, jelikož velikost toku může být i víc než o řád větší než jejich elektroforetické mobility. Kationty, neutrální molekuly a anionty mohou být tudíž analyzovány zároveň, jelikož migrují stejným směrem. Kationty migrují nejrychleji, neboť elektroforetické přitahování směrem ke katodě a EOF jsou ve stejném směru, neutrální látky jsou všechny nesené rychlostí EOF, ale nejsou od sebe separovány, anionty migrují nejpomaleji, protože jsou sice nesené ke katodě, ale přitahovány jsou k anodě (Obr. 2).

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



Obr. 2 Migrace elektricky nabitých a neutrálních látek v kapiláře působením EOF⁷

2.1.7. Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti

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

2.1.7.1. Vliv pH pracovního elektrolytu

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

2.1.7.2. Tvorba komplexů

Tvorbu komplexů lze využít pro zlepšení separace kovů, kdy se hledá vyhovující ligand a jeho koncentrace, nebo analogicky pro separaci ligandů, kdy se hledá vhodný

kov.¹ Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů se podstatně odlišuje od pohyblivosti samotného analytu. Konstanta stability komplexu závisí na druhu kovu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivní analýze.⁷

2.1.7.3. Tvorba iontových asociátů

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

2.1.7.4. Tvorba hostitelských komplexů

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

2.1.7.5. Vliv nevodných rozpouštědel

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

2.1.7.6. Vliv síťujícího prostředí

Síťující prostředí se využívá pro separaci polymerů, které se liší molekulovou hmotností, avšak ne hustotou elektrického náboje. Síťujícím prostředím s největší tradicí je polyakrylamidový gel. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší

molekuly jsou při migraci sítujícím prostředím více zpomalovány. Dnes jsou gelové kapiláry nahrazovány roztoky lineárních polymerů, které vytvářejí síť. Nejčastěji používanými jsou deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a další.¹

2.1.7.7. Vliv ionogenních smáčedel

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

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

2.1.8. Děje ovlivňující separaci

2.1.8.1. Difúze

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

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

D – difúzní koeficient

σ^2 se nazývá rozptyl

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

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

u – elektroforetická pohyblivost

U – napětí

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

2.1.8.2. Elektromigrační disperze

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

2.1.8.3. Jouleov ohřev

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

2.1.8.4. Sorpce

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

2.1.8.5. Délka detekční cely

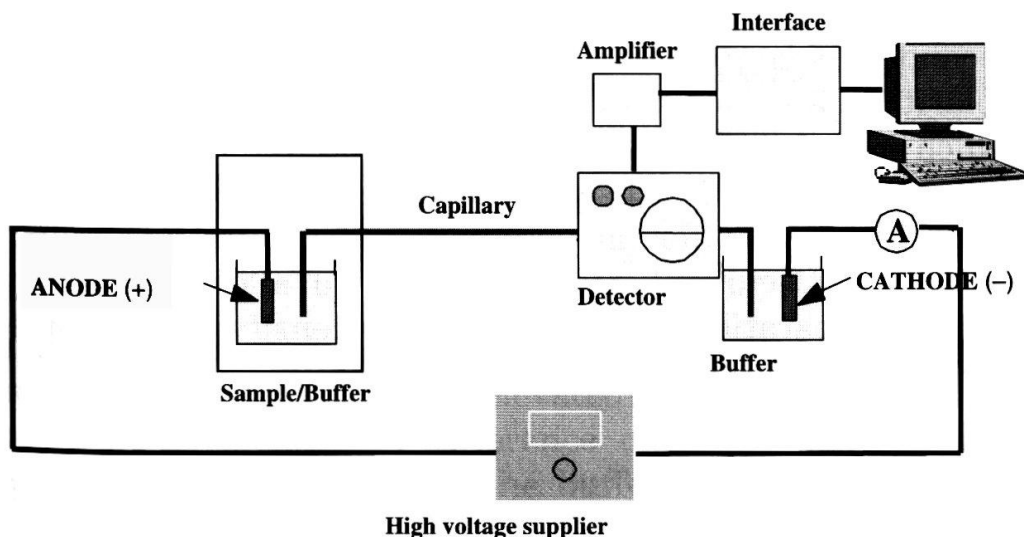
Pro zvýšení účinnosti separace je žádoucí délku detekční cely minimalizovat, to však vede ke snížení detekční citlivosti. Délka detekční cely je tedy kompromisem mezi účinností separace a citlivostí detekce.¹

2.1.8.6. Délka nástřiku

Délku nástřikového pulsu je vhodné minimalizovat.¹

2.1.9. Instrumentální uspořádání

Zařízení pro kapilární elektroforézu (Obr. 3) vždy obsahuje separační kapiláru, zdroj napětí, dávkovač vzorku, detektor a zařízení na zpracování analytického signálu.¹



Obr. 3 Schéma instrumentálního uspořádání pro kapilární elektroforézu⁷

2.1.9.1. Separační kapilára

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

2.1.9.2. Zdroj vysokého napětí

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

2.1.9.3. Dávkování vzorku

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

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

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

2.1.9.4. Detekce

Vhodný detektor je volen s ohledem na jeho citlivost, selektivitu, linearitu záznamu a hladinu šumu. Vhodně zvolený detektor přispívá ke správné identifikaci, neboť získaný signál je závislý na charakteru analytu.⁹ U kapilární elektroforézy je nejběžnější on-line detekce, kdy je analytický signál získáván přímo na kapiláře.¹

UV absorpce

UV (- VIS) absorpce je nejrozšířenější metodou detekce v kapilární elektroforéze, především kvůli své téměř univerzální povaze. S křemennými kapilárami může být užito detekce od 200 nm nahoru přes viditelnou oblast.² Většina analytů totiž obsahuje chromofory, které umožňují absorpci v UV oblasti bez předchozí derivatizace. Vzhledem k velkému počtu sloučenin absorbujících v UV oblasti však dochází k častým interferencím, což vede k překrývání píků analyzovaných složek.⁷ Pro identifikaci elektroforetických píků je užitečný diode-array detektor. Polychromatický paprsek světla je po průchodu kapilárou rozložen na jednotlivé pásy, z nichž každý je detekován jednou fotodiodou. Výsledkem je trojrozměrný elektroforeogram zachycující spektrum pro každý pík.¹

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

Laserem indukovaná fluorescence

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

Hmotnostní spektrometrie

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

Amperometrie

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

Konduktometrie

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

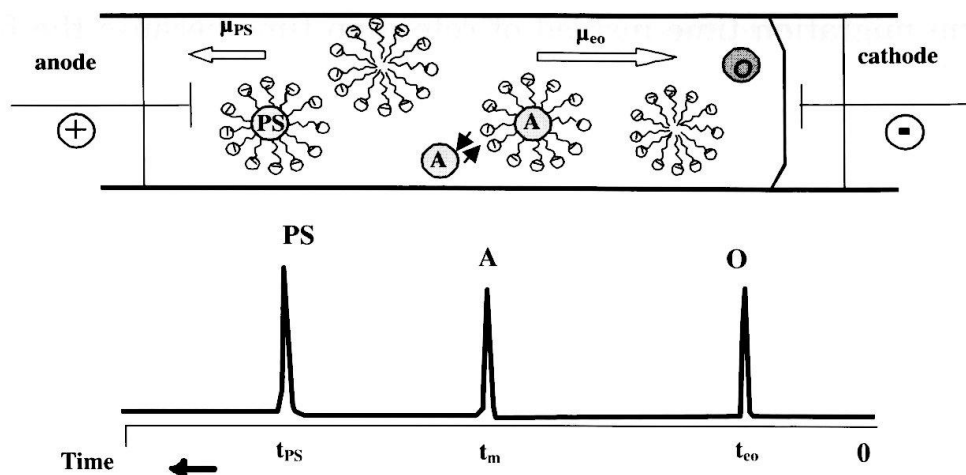
2.1.10. Aplikace kapilární elektroforézy

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

2.2. MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE

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

Během migrace mohou micely interagovat se soluty v určitém chromatografickém smyslu prostřednictvím hydrofobních a elektrostatických interakcí. Pro neutrální látky je to jen rozdělování do vnitřku a vnějšku micely, co způsobuje separaci. Čím víc solut interaguje s anionaktivní micelou, tím delší je jeho migrační čas, poněvadž micela ho nese proti EOF. Když solut není v kontaktu s micelou, je jednoduše nesen EOF (Obr. 4). Více hydrofobní sloučeniny interagují silněji s micelou a jsou „zadržovány déle.“² Nenabitě soluty potom mohou být separovány díky rozdílným rozdělovacím koeficientům P_{mw} .³



Obr. 4 Separace při micelární elektrokinetické chromatografii⁷ O – nezadržované částice, A - zadržované částice, PS – látky migrující v micelách, μ_{eo} – pohyblivost toku, μ_{ps} – pohyblivost micel

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

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

2.2.1. Pseudostacionární fáze

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

2.2.1.1. Micely

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

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

2.2.1.2. Polymerní fáze

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

2.2.2. Migrace v MEKC

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

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

2.2.3. Kapacitní faktor

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

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

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

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

t_r – retenční čas solutu

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

t_{mc} – retenční čas micely

2.2.4. Rozlišení

Základní rovnice rozlišení R_S pro nenabitě soluty v MEKC má stejný tvar jako v chromatografii. Ukazuje, že rozlišení závisí na třech členech vztahujících se

k účinnosti, selektivitě a retenci, čtvrtý člen je jedinečný v MEKC a reprezentuje fenomén elučního okna.³

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

N – počet teoretických pater

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

k_1' , k_2' – kapacitní faktory solutů

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

t_{mc} – retenční čas micely

2.2.5. Faktory ovlivňující separaci

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

2.2.5.1. Koncentrace surfaktantu

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

2.2.5.2. Typy pseudostacionární fáze

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

Aniontové surfaktanty s alkylovým řetězcem

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

Kationtové surfaktanty

Z kationtových surfaktantů je používán např. dodecyltrimethylamoniumbromid, cetyltrimethylamoniumbromid, cetylmethylamoniumchlorid.³

Neiontové a amfoterní surfaktanty

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

Žlučové soli

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

Další typy surfaktantů

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

Smíšené micely

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

Polymerní pseudostacionární fáze

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

2.2.5.3. Modifikátory

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

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

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

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

2.2.5.4. Vliv pH a teploty

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

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

2.3. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)

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

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

2.4. KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (ITP)

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

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

Při ITP lze separovat jen složky migrující jedním směrem, během jedné analýzy lze tak rozdělit pouze kationty nebo je anionty. ITP se proto dělí na kationtovou a aniontovou.¹⁰

2.5. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

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

2.6. KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAFIE (CEC)

Kapilární elektrochromatografie je analytická separační technika kombinující v principu výhody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (vysoká selektivita) a kapilární elektroforézy (vysoká účinnost). Tok mobilní fáze kolonou je udržován spíše elektrickým polem než aplikovaným tlakem. Separací princip spočívá běžněji v rozdělování mezi kapalnou a pevnou fází, ačkoliv při použití pro nabitě analyty lze očekávat rozdílné elektromigrace.¹¹ CEC využívá metod elektrického pole při použití mikro-HPLC kolon. Její předností je také vysoká rychlost separace. Výhodou CEC oproti většině metod CE je schopnost separovat molekuly, které mají stejný poměr náboj/hmota či jsou nenabitě.¹²

2.7. MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE (MEEKC)

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

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

2.8. KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

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

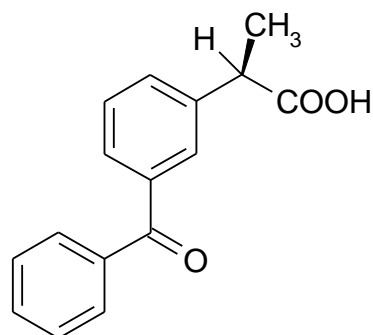
2.9. KETOPROFEN

Ketoprofenum

$C_{16}H_{14}O_3$

$Mr = 254,28^{13}$

$pK_a \text{ ketoprofenu} = 4,23 \pm 0,10^{14}$



Ketoprofen je velmi účinná nesteroidní protizánětlivá látka, náležící k podtřídě kyseliny propionové. Vyznačuje se třemi hlavními účinky, které jsou společné všem

NSAID: protizánětlivý, analgetický a antipyretický. Jeho použití je široké, jak celkové i lokální.¹⁵

Systémově se podává při léčbě artrózy periferních kloubů a páteře, při revmatoidní artritidě, u projevu revmatismu měkkých tkání nebo při pooperačních nebo pourazových bolestivých stavech.

Tolerance při systémovém podání je dobrá, vzácně se může objevit gastrointestinální intolerance, bolesti hlavy a závratě. U citlivých jedinců se může projevit dermatitida.

Lokálně je ketoprofen indikován při symptomatické léčbě bolestí svalů a kloubů revmatického nebo traumatického původu: zhmoždění, podvrtnutí, natažení svalu, při lumbágu.

Léčivých přípravků obsahujících ketoprofen jsou na našem trhu desítky. Jedná se především o perorální lékové formy jako jsou tablety či tobolky, i tablety s pozvolným uvolňováním. Alternativou tablet jsou rektální čípky, u kterých je snížení dráždivosti žaludku oproti perorálním formám. K dispozici jsou také injekční nebo infuzní roztoky. K lokální aplikaci jsou určeny gely.¹⁶

2.9.1. Metody stanovení ketoprofenu

Metody stanovení ketoprofenu jsou velmi rozmanité. Ketoprofen je stanovován ve farmaceutických přípravcích – v tabletách¹⁷, gelu¹⁸, čípkách¹⁹, ale i v krevní plazmě²⁰, nebo v odpadních vodách²¹.

Při analýze léčivých přípravků obsahujících ketoprofen byla často použita metoda RP-HPLC a to jak UV tak s MS detekcí²². Při stanovení kofeinu, ketoprofenu a dalších nesteroidních analgetik byla použita kolona 150 x 4 mm Spherisorb ODS2 5 µm. Eluce mobilní fází byla gradientová, byla tvořena dvěma roztoky, první pufr mravenčan/kyselina mravenčí a druhý methanol. UV detekce byla při 254 nm.²⁰

HPLC - MS byla použita k analýze homeopatických přípravků s možným obsahem účinné protizánětlivé látky. Separace probíhala na koloně C₁₈ (150mm×4.6mm, 5µm). Eluce byla kombinovaná z izokratické, gradientové a opět izokratické. Mobilní fáze se skládala z roztoku kyseliny octové a acetonitrilu v různém poměru. Hmotnostně spektrometrickou detekcí byla zaručena vysoká citlivost této metody.²²

Alternativou k RP-HPLC je micelární kapalinová chromatografie. Tato metoda využívá tvorby micel SDS ke stanovení ketoprofenu a dalších nesteroidních protizánětlivých látek. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,15 M SDS v 10 % 1-propanolu. Detekce byla UV při vlnové délce 250 nm. Tato metoda byla aplikována na analýzu gelu a čípků.¹⁹

K analýze topického gelu, obsahující kromě ketoprofenu také methylparaben a propylparaben byla použita také RP-HPLC. Při analýze je možné stanovit i dva degradační produkty ketoprofenu a to 3-acetylbenzophenon a 2-(3-carboxyfenyl)propionovou kyselinu. Separace probíhala v C₁₈ kapiláře (125mm × 4mm, 5 μm). Mobilní fází byla směs acetonitrilu, vody a fosfátového pufru pH 3.5 (40:58:2, v/v/v). Detekce byla spektrofotometrická při 233nm.²³

Další metodou vyvinutou pro stanovení ketoprofenu v tabletách je průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí. Vzorky byly připraveny extrakcí účinné látky z tablet ethanolem. Po alkalizaci hydroxidem sodným byly vloženy do ultrazvuku a následně centrifugovány. Supernatant byl naředěn 10% ethanolem a dávkován do systému. Roztoky byly změřeny a ketoprofen spektrofotometricky detekován při 260 nm.¹⁷

Pro stanovení ketoprofenu a dalších šesti nesteroidních protizánětlivých látek byla vypracována též metoda CZE, která používá borátový pufr o koncentraci 60 mM při pH* 8,5 a 15% methanolu. Separace probíhala v kapiláře o celkové délce 70 cm, efektivní 44,5 cm a vnitřním průměru 50 μm. Pracovní napětí je 20 kV a detekce probíhala při 200 nm.²⁴

V další práci byla porovnávána CZE a MEKC k analýze různých farmaceutických přípravků obsahujících nesteroidní protizánětlivé látky. Obsah ketoprofenu byl stanovován v kapslích. K CZE je použit fosfátový pufr 30 mM, pH 8,0, při MEKC se používá borátový pufr 50 mM, SDS 40 mM, při pH 9,0. Separace obou metod probíhá v kapiláře o celkové délce 60 cm, efektivní délce 52,5 cm a vnitřním průměru 75 μm. Separace probíhá při 15 kV. Detekce je spektrofotometrická při 214 nm. Obě metody jsou pro stanovení nesteroidních protizánětlivých látek vhodné.²⁵

2.10.METHYLPARBEN A PROPYLPARBEN

Methylparabenum (Methylparaben)

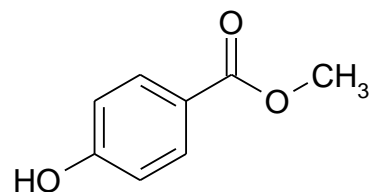
Synonymum: Methylis parahydroxybenzoas

$C_8H_8O_3$

methyl-4-hydroxybenzoat

$Mr = 152,15^{13}$

$pK_a = 8,30 \pm 0,20^{14}$



Propylparabenum (Propylparaben)

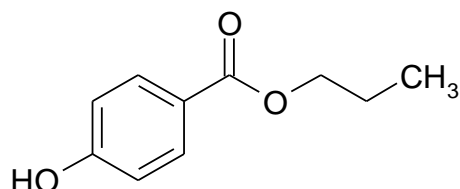
synonymum: propylis parahydroxybenzoas

$C_{10}H_{12}O_3$

propyl-4-hydroxybenzoas

$Mr = 180,20^{13}$

$pK_a = 8,23 \pm 0,20^{14}$



Methylparaben a propylparaben byly zavedeny do praxe jako konzervanty ve 30. letech 20. století.²⁶ Methylparaben působí především proti bakteriím, propylparaben proti kvasinkám.²⁷ Svou účinností se rovnají přibližně kyselině benzoové, působí však nejen v kyselém, ale i neutrálním a zásaditém prostředí a jsou méně toxické. Jejich inhibiční účinek vůči mikroorganismům roste s velikostí alkyly. Stejným směrem klesá rozpustnost ve vodě a stoupá rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech. Používají se ke konzervaci čtených farmaceutických produktů. Nehodí se ke konzervaci potravin, protože mají mírný anestetický účinek, který by se při trvalém používání mohl projevit útlumem sekrece trávicích šťáv.²⁶ Vodný roztok 0,1 % obsahující methylparaben a propylparaben v poměru 2:1, se označuje jako aqua conservans.

Jako konzervační látky jsou oba parabeny ve farmacii užívány téměř ve všech lékových formách ať už pevných, kapalných, či polotuhých a vyskytují se i v mnoha léčivých přípravcích registrovaných v České republice. Z HVLP, v nichž je účinnou látkou ketoprofen, obsahuje parabeny pouze Ketonal 5% krém od firmy Lek Pharmaceutical and Chemical Company d.d.¹⁶

2.10.1. Metody stanovení methylparabenu a propylparabenu

Metodou nejčastěji užívanou pro stanovení methylparabenu a propylparabenu je RP-HPLC, zpravidla bylo využito UV detekce. Používány jsou C_8^{29} nebo C_{18}

kolony.³⁰⁻⁴⁰ Elektrochemická detekce byla užita při stanovení obsahu parabenů v očním roztoku po separaci za eluce mobilní fáze složenou z methanolu a 0,2 M kyseliny fosforečné při pH* 2,5.²⁸

Při HPLC analýze orální suspenze obsahující domperidon, methylparaben a propylparaben byla použita kolona C₈ a jako mobilní fáze směs 0.5% w/v acetátového pufru a methanolu 40:60 (v/v). Vlnová délka detektoru byla nastavena na 280 nm.²⁹ Při stanovení parabenů ve vodných suspenzích pro orální použití pomocí HPLC s gradientovou elucí probíhala detekce při 260 nm.³⁰ V případě stanovení parabenů v sirupu byla použita jako mobilní fáze směs octanový pufr s triethylaminem-methanol-acetonitril. Detekce probíhala při 254 nm.³¹ Dále byla HPLC využita pro analýzu a stabilitní studie sirupu s obsahem haloperidolu jako účinné látky a obou parabenů jako konzervačních přísad. Mobilní fáze byla tvořená směsí methanol-fosfátový pufr (pH 2)-triethanolamin. K detekci sloužilo opět UV záření o vlnové délce 254nm.³² V mikroemulsi o/v určené pro transdermální aplikaci nortriptylinu byly parabeny stanovovány při 258 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a acetonitrilu (75:25).³³ HPLC se uplatnila též ve stabilitních studiích injekčního roztoku, kde byl stanovován současně nalbufin a oba parabeny při 280 nm. Mobilní fáze byla složená z 0,05 % trifluoroctové kyseliny, acetonitrilu a tetrahydrofuranu.³⁴

Spolu s klotrimazolem byly parabeny pomocí RP – HPLC stanoveny v krému. Použitá mobilní fáze tvořená směsí acetonitrilu s vodou (70 : 30). Vlnová délka pro detekci byla 210 nm.³⁵

Sirup obsahující methylparaben a propylparaben byl analyzován za použití mobilní fáze tvořené acetonitrilem a 6,5 mM NaH₂PO₄ o pH 5,5 (4:6 v/v). Vlnová délka detektoru byla nastavena na 250 nm. Touto metodou může být stanovena také kyselina p-hydroxybenzoová, hlavní degradační produkt parabenů.³⁶

Při analýze krému obsahujícího kortikosteroid předcházela vlastní RP-HPLC izolace léčivé látky a obou parabenů pomocí extrakční kolony. Vzorby byly chromatografovány na C₁₈ náplni. Mobilní fází byla směs methanolu a vody (60 : 40). Detekce byla opět spektrofotometrická při 240 nm.³⁷

Při RP-HPLC analýze injekčních přípravků bylo využito tvorby iontových párů s dioktylsulfosukcinátem sodným obsaženým v mobilní fázi. Použit byl detektor s nastavitelnou vlnovou délkou. Píky byly detekovány při 254 nm.³⁸

V kosmetických přípravcích byly oba parabeny stanoveny pomocí HPLC. K analýze byla použita kolona C₁₈ a mobilní fáze methanol–voda. K detekci byl využit

MS detektor. Tím bylo dosaženo vysoké citlivosti metody. Citlivost dosahovala 4.7-142 ng/g.³⁹

V jedné z prací byly parabeny v léčivém přípravku testovány jednak pomocí HPLC s UV detekcí při 230 nm a jednak mikrobiologicky. Pro mikrobiologické hodnocení byl použit agar na Petriho miskách se standardizovanými roztoky s *Bacillus subtilis*.⁴⁰

Další použitou chromatografickou metodou byla micelární kapalinová chromatografie, a to pro analýzu kosmetických přípravků s obsahem parabenů jako konzervačních látek. Mobilní fáze obsahovala 0,1 M SDS; 2,5 % (v/v) n-propanolu a 10 mM vodný roztok NaH_2PO_4 (pH 3), použita byla C_{18} kolona. Detekce probíhala při 280 nm.⁴¹

Různé kombinace parabenů byly stanovovány HPTLC s denzitometrickou detekcí. V případě methylparabenu a propylparabenu se jednalo o analýzu v masti. Separace byla provedena na deskách silikagelu s fluorescenčním indikátorem v soustavě n-pentan – bezvodá kyselina octová (88:12, v/v), detekce při vlnové délce 256nm.⁴²

Zveřejněna byla také práce zabývající se stanovením parabenů v pěnovém šamponu pomocí HPLC i CZE s UV detekcí. Při chromatografické metodě byla použita C_{18} kolona a gradientová eluce směsí methanol-1 % vodný roztok kyseliny octové v různém poměru, k detekci záření o vlnové délce 260 nm. Při aplikaci CZE byla separace provedena v 15 mM tetraborátovém pufru o pH* 9,2 s obsahem 15 % methanolu v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm , délce 70 cm a efektivní délce 63 cm. Vkládáno bylo napětí 20 kV, teplota 40°C. UV detektor byl nastaven na 295 nm.⁴³

Parabeny v různých produktech byly stanovovány také kapilární zónovou elektroforézou s UV detekcí při 294 nm. Směs methylparabenu a propylparabenu byla stanovena v pleťovém toniku. Nepotažená křemenná kapilára, ve které probíhala separace, byla dlouhá 57 cm při efektivní délce 50 cm a vnitřním průměru 75 μm . Pracovním elektrolytem byl 35 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ o pH 10, separační napětí 25 kV a teplota 20°C.⁴⁴

V další publikované práci byly parabeny v kosmetických krémech analyzovány pomocí CZE po superkritické fluidní extrakci. K CZE analýze naředěného extraktu byla použita křemenná kapilára o celkové délce 96 cm, efektivní délce 60 cm a vnitřním průměru 75 μm . Pracovním elektrolytem byl 30 mM tetraboritan sodný v 5 %

acetonitrilu. Vkládáno bylo napětí 25 kV, teplota byla 30°C. Detekce probíhala při 255 nm. Extrakty byly analyzovány také LC, výsledky byly srovnatelné.⁴⁵

Pro stanovení parabenů je možné použít i MEKC. Tato metoda byla použita pro stanovení parabenů společně s clotrimazolem. Stanovení probíhalo v kapiláře (75 μm x 60 cm). Jako pufr byl použit 15 mM fosfátový pufr o pH 7,2. Jako surfaktant byl použit SDS. Separální napětí bylo 25 kV a detektor měřil při 212 nm. Celkový čas analýzy byl menší než 12 minut.⁴⁶

Parabeny byly stanoveny MEKC V další práci popisující elektroforetickou analýzu skupiny parabenů byly tyto separovány jednak jako neutrální látky ve fosfátovém pufru o pH 7,1 s obsahem 50 mM SDS (MEKC) a jednak ionizované v borátovém pufru o pH 10 (CZE). Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o délce 55 cm a efektivní délce 50 cm a vnitřním průměru 50 μm. K detekci byla použita vlnová délka 250 nebo 260 nm. Na analýzu make-upu a mléka na ruce obsahujících methylparaben a propylparaben pak byla aplikována CZE.⁴⁷

Pro separaci skupiny konzervačních látek byla vypracována MEKC metoda používající 50 mM borátový pufr s přídatkem 20 mM SDS o pH 9,0. Analýza probíhala v 60 cm kapiláře o efektivní délce 52 cm a vnitřním průměru 50 μm při 20°C a separačním napětí 25 kV. Detekce byla spektrofotometrická při 214 nm. Protože migrační časy methylparabenu a propylparabenu byly nejdelší (do 7 minut) byla pro oba parabeny a jejich degradační produkt kyselinu p-hydroxybenzoovou vypracována CZE metoda následně použitá pro analýzu například masti či gelu. Pro CZE metodu byla použita kapilára o širším vnitřním průměru (75 μm) a jako elektrolytový systém 100 mM borátový pufr o pH 8,4.⁴⁸

Pro separaci a stanovení parabenů, haloperidolu a několika dalších látek byla vypracována MEKC metoda využívající 10 mM fosfátový elektrolytový systém (pH* 7) s obsahem SDS a ethanolu. Optimálního rozlišení a přijatelných migračních časů bylo dosaženo při použití 10 mM SDS a 15 % ethanolu v pracovním elektrolytu, vloženém napětí 30 kV a teplotě 45°C. Kapilára měla celkovou délku 72 cm, efektivní délku 50 cm a vnitřní průměr 50 μm. K detekci bylo použito záření o vlnové délce 200 nm.⁴⁹

Pro kvantifikaci v masti byla využita rovněž MEKC s UV detekcí při 200 nm, tentokrát za použití elektrolytového systému o pH 6,1 obsahujícího 10 mM Na_2HPO_4 a 40 mM SDS. Separace probíhala v křemenné kapiláře o délce 31,2 cm, efektivní délce 21 cm a průměru 50 μm při teplotě 25°C.⁵⁰

Další elektromigrační metodou použitou k analýze léčivých přípravků je mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC). Pro separaci parabenů, kyseliny 4-hydroxybenzoové a jejich nečistot byl připraven elektrolytový systém obsahující oktan, butanol, SDS a 50 mM fosfátový pufr o pH* 2,1. Kapilára byla dlouhá 32 cm, při efektivní délce 21 cm a vnitřním průměru 50 μm . K detekci bylo použito UV záření o vlnové délce 200 nm.⁵¹

V další publikované práci byly parabeny a další konzervanty stanovovány v léčivých a kosmetických přípravcích jak pomocí MEKC tak MEEKC. Byl sledován vliv složení elektrolytového systému, pH a teploty na separaci. Pro MEKC byla použita nepotažená křemenná kapilára o délce 50,2 cm, při efektivní délce 40 cm a vnitřním průměru 50 μm . Borátový pufr o pH 9 obsahoval 20 mM SDS. Separace probíhala při teplotě 20°C a vloženém napětí 25 kV. Při MEEKC byla použita kapilára o délce 31,2 cm a efektivní 21 cm. Vnitřní průměr byl opět 50 μm . Elektrolytový systém obsahoval borátový pufr o pH* 9,5, SDS, 1-butanol a oktan. Vkládáno bylo napětí 25 kV teplota udržována na 34°C. Pro obě metody byla využita UV detekce při 200 nm.⁵²

V českém lékopise se pro stanovení parabenů používá zpětná neutralizační titrace s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence.¹³

K současnému stanovení methylparabenu, propylparabenu a ketoprofenu byla použita HPLC s UV detekcí při 233 nm, která byla vypracována a validována na našem pracovišti. Byla použita kolona C₁₈ (délka 125 mm, průměr 4mm, velikost částic 5 μm) kondiciovaná mobilní fází s předkolonou (20 x 4 mm, 5 μm). K eluci byla použita mobilní fáze acetonitril-voda-fosforečnanový pufr o pH 3,5 (40:58:2). Tato metoda byla aplikována na analýzu léčivého přípravku Ketoprofen gel 2,5 %, Herbacos-bofarma, Pardubice.⁵³

Jak bylo zmíněno výše, elektromigrační metody, včetně MEKC, byly pro stanovení parabenů i ketoprofenu použity, ale v žádné z publikovaných prací nebyly tyto látky stanoveny současně.

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat metodu pro separaci a stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie a její aplikace na konkrétní léčivý přípravek (Ketoprofen gel 2,5 %, Herbacos-bofarma, Pardubice).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

4.1.1. Chemikálie

- α -Cyklodextrin p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- β -Cyklodextrin p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- ACES – N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonová kyselina, p. a., Aldrich Chemical Company,
- BES – N,N-bis[2-hydroxyethyl]2-aminoethansulfonová kyselina, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Butylparaben p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný p. a., E. Merck, Darmstadt, Německo, Mr = 136,09
- Diklofenak sodný, p. a., Amoli Organics Ltd., Bombaj, Indie
- Dodecylsírán sodný, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- Ethylparaben, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Glycyl-glycin, p. a., Sigma-Aldrich Company
- Hydrogenfosforečnan sodný bezvodý p. a., Merck KGa, Darmstadt, Německo
- Hydroxid sodný pelety p. a. ISO, E. Merck, Darmstadt, Německo
- Ibuprofen, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Ketoprofen, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Kyselina boritá, p. a., Ing. Petr Švec – Penta, Praha, Česká republika
- MES – 2-Morpholino-ethansulfonová kyselina, p. a., Fluka Chemie AG
- Methanol Cromasolv® pro HPLC, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Německo
- Methylparaben, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Propylparaben, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

- Sudan III pro mikroskopii, Balex, Ing. Jaroslav Kroupa, CSc., Pardubice-Rosice n. L., Česká republika
- TAPS – N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonová kyselina, p. a., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Tricin – N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin, p. a., Aldrich Chemical Company
- TRIS – Trisma base – tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA, Mr = 121,1

4.1.2. Příprava roztoků

Na přípravu roztoků byla použita voda připravená zařízením Millipore MilliQRG. Všechny roztoky byly před dávkováním do přístroje odplyněny 15 minut na ultrazvukové lázni.

4.1.2.1. Roztoky pracovních elektrolytů

Podle požadované koncentrace jsem navážil odpovídající množství SDS, tricinu a β -cyklodextrinu a na ultrazvukové lázni jsem je v 15% MetOH rozpustil. Poté jsem upravil pH* hydroxidem sodným na hodnotu 8,3 a v odměrné baňce doplnil po rysku.

Obdobně jsem připravoval i další roztoky elektrolytů, které jsem zkoušel při hledání vhodného druhu elektrolytu.

4.1.2.2. Hledání vnitřního standardu (IS)

Navážil jsem přesně asi 62,5 mg ketoprofenu, 2,5 mg methylparabenu a 1,25 mg propylparabenu do 50 ml odměrné baňky a rozpustil v 15% MetOH a doplnil po rysku. Dále jsem si připravil jednotlivé roztoky IS (Ethylparaben, butylparaben, ibuprofen, diklofenak). Jednotlivé látky jsem navážil do 10 ml odměrné baňky, rozpustil v 15% methanolu a doplnil po rysku. Koncentrace roztoků byla 125 mg/100ml. Roztoky jsem nechal 10 minut na ultrazvukové lázni odplynit. Před analýzou se roztoky IS mísily s roztokem zkoušených látek v poměru 1:1.

4.1.2.3. Roztok standardů pro optimalizaci metody

Do 100 ml odměrné baňky jsem navážil přesně asi 62,5 mg ketoprofenu, 2,5 mg methylparabenu, 1,25 mg propylparabenu a 62,5 mg diklofenaku sodného. Látky jsem rozpustil v 15% methanolu a doplnil po rysku.

4.1.2.4. Kalibrační roztoky

Navážil jsem do 100 ml odměrné baňky přesně asi 30 mg diklofenaku sodného (IS), rozpustil v 15% methanolu a doplnil po rysku. Roztok jsem nechal 15 minut odplynit na ultrazvukové lázni.

Dále jsem připravil roztok zkoušených látek (ZR). Do 100 ml odměrné baňky jsem navážil přesně asi 400 mg ketoprofenu, 8 mg methylparabenu a 4 mg propylparabenu. Látky jsem rozpustil v 15 % methanolu a doplnil po rysku.

Z těchto dvou roztoků jsem pak ředěním do 10 ml odměrné baňky podle schématu (Tab. 1) získal sérii pěti roztoků s koncentrací ketoprofenu od 10 do 200 mg/100ml. K ředění jsem používal 15 % methanol. Koncentrace IS byla ve všech roztocích 3 mg/100 ml.

Tab. 1 Ředění kalibračních roztoků (ml ZR + ml IS ad 10,00 ml methanol 15 %)

<i>Bod č.</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ml ZR	0,25	1,5	2,5	3,75	5,0
ml IS	1	1	1	1	1
c (ketoprofen) mg/100ml	10	60	100	150	200
c (methylparaben) mg/100ml	0,2	1,2	2	3	4
c (propylparaben) mg/100ml	0,1	0,6	1	1,5	2

4.1.2.5. Příprava vzorku gelu

Pomocí injekční stříkačky s jehlou jsem do 25 ml odměrné baňky odvážil přesně asi 2 g gelu a doplnil 30 % methanolem. 5 minut jsem třepal. Potom jsem umístil baňku na 15 minut do ultrazvukové lázně termostátované na 40 °C. Obsah baňky jsem převedl do centrifugační zkumavky a nechal rychlostí 3000 ot/min 15 minut odstředit. Ze supernatantu jsem odpipetoval 5ml do 10 ml odměrné baňky, přidal 1 ml roztoku IS a doplnil vodou po rysku.

4.2. PŘÍSTROJE

Při práci jsem používal tyto přístroje:

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

4.2.1. Kapilární elektroforetický systém Beckman

Přístroj byl vybaven UV detektorem (PDA – photo diode-array). Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm a celkové délce 60,2 cm. Efektivní délka kapiláry činila 50 cm. Komunikaci s počítačem a řízení analýzy zajišťoval software Karat 32, který zpracovává a vyhodnocuje data.

4.3. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY

4.3.1. Pracovní postup

Před začátkem analýzy jsem uvedl do chodu počítač a elektroforetický systém. Před vlastním měřením jsem každý den kapiláru proplachoval 10 minut 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou, poté 10 minut methanolem a 10 minut vodou. K docílení lepší separační účinnosti a reprodukovatelnosti jsem kapiláru před každou analýzou proplachoval 0,1 M NaOH, vodou a elektrolytem, aby se odstranily adsorbované látky. Po ukončení všech měření v daném dni jsem kapiláru proplachoval po 10 minutách HCl, methanolem, 0,1 M NaOH a vodou. Promývání probíhalo vždy pod tlakem 100 kPa.

V programu jsem nastavil parametry měření. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 48,3 mBar po dobu 5 sekund. Elektroforetická separace probíhala při vloženém napětí 30 kV, teplota kapiláry byla udržována na 25°C. Detekce probíhala při 200 nm.

Každý vzorek jsem před analýzou odplynul 15 minut v ultrazvukové lázni.

4.3.1.1. Měření kalibrační závislosti

Pro měření kalibrační závislosti jsem použil pět kalibračních roztoků o těchto koncentracích:

KP 10 mg/100ml; MP 0,2 mg/100ml; PP 0,1 mg/100ml

KP 60 mg/100ml; MP 1,2 mg/100ml; PP 0,6 mg/100ml

KP 100 mg/100ml; MP 2 mg/100ml; PP 1 mg/100ml

KP 150 mg/100ml; MP 3 mg/100ml; PP 1,5 mg/100ml

KP 200 mg/100ml; MP 4 mg/100ml; PP 2 mg/100ml

Všechny kalibrační roztoky obsahovaly 3 mg/100ml diklofenaku jako vnitřního standardu. S každým roztokem jsem provedl tři měření. Kalibrační závislost byla hodnocena pomocí programu lineární regrese na PC jako závislost poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci stanovované látky v mg/100 ml.

4.3.1.2. Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce LOD je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být zaznamenána, ale ne nezbytně kvantifikována. Limit kvantifikace LOQ je množství látky, kterému odpovídají reprodukovatelné plochy píků ekvivalentní nejmenšímu kvantifikovatelnému množství.⁵⁶ Hodnoty jsem vypočítal podle vzorců:

$$\text{LOD} = 3 \cdot \text{průměrná plocha šumu}$$
$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{průměrná plocha šumu}$$

4.3.1.3. Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem použil roztok o koncentraci MP 1,9975 mg/100ml; PP 1,0075 mg/100ml; KP 100,115 mg/100ml. Obsah diklofenaku (IS) byl 3,003 mg/100ml. Provedl jsem šest měření. Hodnoty průměru, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsem vypočítal podle následujících vztahů.

Průměr hodnot výsledků měření \bar{x} :

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

n – počet měření

x_i – jednotlivý výsledek měření

Směrodatná odchylka s:

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

Relativní směrodatná odchylka:

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

4.3.1.4. Rozlišení

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

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

t_1, t_2 - migrační časy látek [s]

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

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

4.3.1.5. Účinnost separace

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

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

t_m – migrační čas [s]

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

w – šířka píku při základní linii [s]

Výškový ekvivalent teoretického patra se počítá podle vztahu:¹

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

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

4.3.1.6. Správnost metody

Správností metody se rozumí co největší shoda výsledků měření s absolutní správnou hodnotou. Správnost vypracované metody byla ověřena dvěma způsoby. Porovnáním s výsledky HPLC metody a metodou přidavku standardů.

Ověření správnosti metodou přidavku

Stanovení jsem provedl tak, že jsem připravil roztok standardů a roztok vzorku HVLP. Roztok standardů jsem připravil do 25 ml odměrné baňky a po doplnění po značku byly koncentrace $c(\text{MP}) = 20,24 \text{ mg}/100\text{ml}$, $c(\text{KP}) = 1000,16 \text{ mg}/100\text{ml}$ a $c(\text{PP}) = 9,84 \text{ mg}/100\text{ml}$.

Do druhé 25 ml odměrné baňky jsem navážil 2,00033 g vzorku a doplnil po značku 30 % methanolem. Dále jsem postupoval stejně jako při přípravě vzorku gelu. Z centrifugací získaného supernatantu jsem odpipetoval 5 ml do 10 ml odměrné baňky, přidal 1 ml roztoku IS a doplnil vodou po rysku. Do druhé 10 ml odměrné baňky jsem také odpipetoval 5 ml supernatantu, přidal roztok IS a pak přidal 0,5 ml připraveného roztoku standardů a doplnil vodou po rysku. Dále jsem si připravil roztok standardů tak, aby odpovídal koncentraci standardů přidaných ke vzorku gelu. Do 10 ml odměrné baňky jsem napipetoval 0,5 ml připraveného roztoku, přidal roztok IS a doplnil po rysku 15 % methanolem. Koncentrace daného roztoku byla $c(\text{MP}) = 1,012 \text{ mg}/100\text{ml}$, $c(\text{KP}) = 50,008 \text{ mg}/100\text{ml}$ a $c(\text{PP}) = 0,492 \text{ mg}/100\text{ml}$.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A SOUČASNÉ STANOVENÍ KETOPROFENU, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU

5.1.1. Detekce

Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter je vybaven UV (DAD) detektorem. Pro stanovení optimální vlnové délky jsem nejprve změřil UV spektra látek v borátovém pufru, při pH* 8,5, s 20 % methanolu od 190 do 300 nm. UV spektra všech látek vykazují dvě maxima. Jedno v těsném okolí 200 nm, druhé je u tří z měřených látek v okolí 260 nm, u diklofenaku ale až při 280 nm. V této vyšší vlnové délce se předpokládá menší vliv rušivých faktorů. Protože absorpce všech měřených látek je při 200 nm zhruba dvojnásobně vyšší a s přihlédnutím, že měřená matrice není složitá a neočekává se velký vliv matrice, byla vybrána vlnová délka 200 nm. Protože methylparaben a propylparaben jsou v přípravku absaženy jako konzervancia a tedy v podstatně nižší koncentraci, bylo třeba upřednostnit měření při vlnové délce, při které je citlivost větší.

5.1.2. Volba pracovního elektrolytu

Cílem bylo najít takové složení pracovního elektrolytu a podmínky separace, při nichž by došlo k úplné separaci jednotlivých složek tak, aby mohly být stanoveny. Pro separaci byly vyzkoušeny následující elektrolytové systémy:

- Borátový pufr
- Fosfátový pufr
- Kombinace borátového a fosfátového pufru
- TRIS v kombinaci s MOPSO, HEPES, MES, BES, ACES a TAPS
- Tricin
- BICIN
- GLYCYLGLYCIN

Ve všech těchto elektrolytových systémech byl jako surfaktant použit dodecylsírán sodný o koncentraci 40 mmol/l a zvolené pH* bylo 8,5. U systémů s tricinem a TRIS+MES byl jako surfaktant zkoušen i cholát v koncentraci 30 mmol/l a u systému obsahující tricin též směsné micely SDS o koncentraci 20 mmol/l a cholát 30mmol/l.

Zkoušené látky ve většině zkoušených elektrolytových systémech migrovaly v tomto pořadí: methylparaben, ketoprofen a propylparaben.

Za použití borátového pufru docházelo k nedokonalému oddělení methylparabenu od ketoprofenu. Naopak propylparaben migroval pomaleji a pravděpodobně z tohoto důvodu byl jeho pík nesymetrický. U fosfátového pufru byla migrace propylparabenu ještě pomalejší, přibližně 25 minut a došlo ke zhoršení kvality základní linie. U kombinace borátového a fosfátového pufru se délka analýzy ještě prodloužila. Procházející proud se zvýšil na 100 μ A a to by mohlo způsobit přehřívání kapiláry.

Za použití organických pufrů se délka analýzy zkrátila asi na zhruba 15 minut. Při použití TRIS v kombinaci s dalšími látkami nedocházelo k dokonalému rozlišení methylparabenu a ketoprofenu, v některých případech (TRIS+ACES, TRIS+TABS) došlo k překrytí. Použití systémů obsahující tricin a BICIN přineslo výrazné zlepšení. Analýza trvala sice 17 minut, ale symetrie píků všech látek a kvalita základní linie byly nejlepší. V pufru s tricinem oproti pufru BICIN byla lepší separace methylparabenu a ketoprofenu. Zkoušel jsem také systém tricin a surfaktant cholát, což se ukázalo jako nevhodné, protože propylparaben migroval rychleji, velmi těsně za methylparabenem. Testoval jsem také přídavek acetonitrilu v koncentraci 20% k pufru obsahující tricin a SDS. Došlo ke zkrácení migračních časů methylparabenu a ketoprofenu, ale nebyl získán pík propylparabenu. Procházející proud se blížil 100 μ A, což se projevilo zhoršením základní linie.

Pro další práci jsem zvolil elektrolytový systém tricin se surfaktantem SDS a rozpouštědlo methanol. Symetrie byla velmi dobrá, rozlišení úplné.

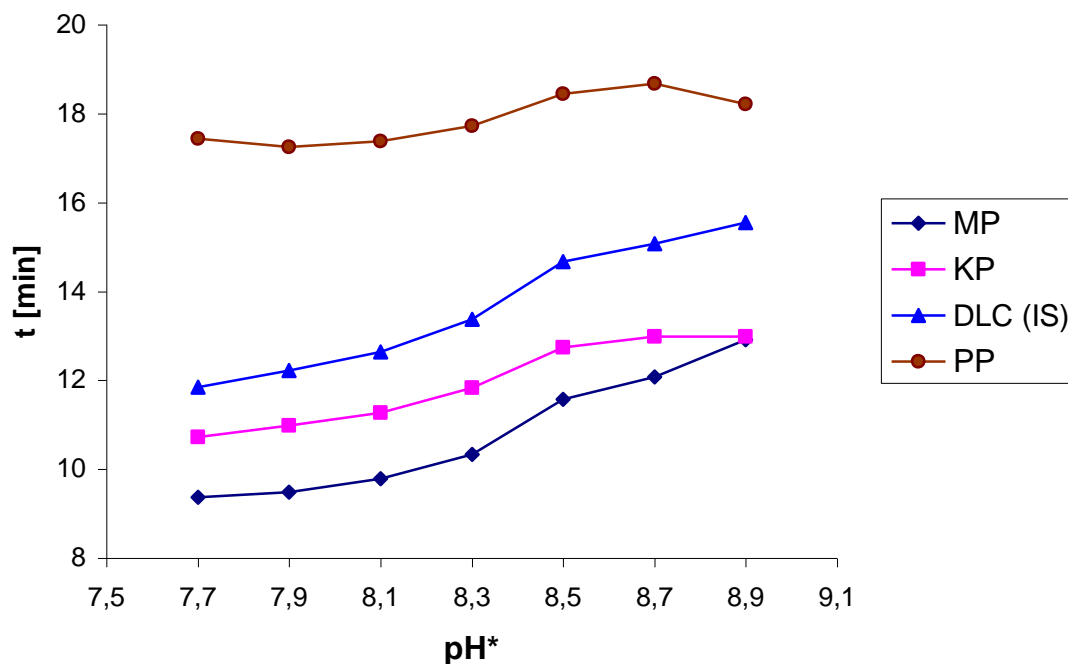
Dále byly zkoušené různé koncentrace tricinu, SDS, methanolu, α -cyklodextrinu a β -cyklodextrinu. Zjišťoval jsem také vliv pH pracovního elektrolytu, teploty a vloženého napětí na separaci. Kromě kvality separace (tvar, symetrie, oddělení píků) jsem hodnotil citlivost analýzy (plochy píků) a její trvání. Identifikace píků byla provedena pomocí přídavek standardů.

5.1.3. Vnitřní standard

Jako vnitřní standard jsem zkoušel ethylparaben, butylparaben, diklofenak a ibuprofen. Pík ethylparabenu a ibuprofenu nebyl dostatečně rozlišen od ketoprofenu. Migrační čas propylparabenu byl oproti ostatním analytům výrazně delší. Zkoušené IS migrovali mezi ketoprofenem a propylparabenem. Jako optimální vnitřní standard jsem zvolil diklofenak. Migroval sice jako třetí, tedy mezi ketoprofenem a propylparabenem, ale jeho pík byl symetrický, dobře oddělený (zhruba 2 minuty) od okolních látek.

5.1.4. Vliv pH*

Při sledování vlivu pH* pracovního elektrolytu jsem zkoušel pH* od 7,7 do 8,9. (Tricin pufruje v rozmezí pH 7.4 – 9,0.) Při různém pH dochází ke změnám disociace molekul a tím k různým interakcím látek s micelami. Podle velikosti interakce látek s micelami se mění jejich elektroforetická pohyblivost. Při pH* nižším se zkrátila doba analýzy methylparabenu, ketoprofenu a diklofenaku, se zvyšujícím se prodlužovala a při pH* 8,9 došlo k přiblížení methylparabenu a ketoprofenu. Vliv pH* na propylparaben nebyl velký (Obr. 5). Při studiu vlivu pH* na velikost ploch píků, jsem zjistil, že se zvyšujícím se pH*, zvyšuje se plocha jednotlivých píků. Při porovnání relativní plochy píků, tj. poměr analyt/IS, byla téměř konstantní. Pro další analýzy jsem zvolil pH* 8,3, protože kvalita separace látek byla nejlepší, baseline odrážela nejméně rušivých vlivů, symetrie píků byla velmi dobrá. Pro pH* 8,3 ukazovalo i to, že pH* 8,3 je bližší hodnotě pKa tricinu (8,15) než pH* 8,5.



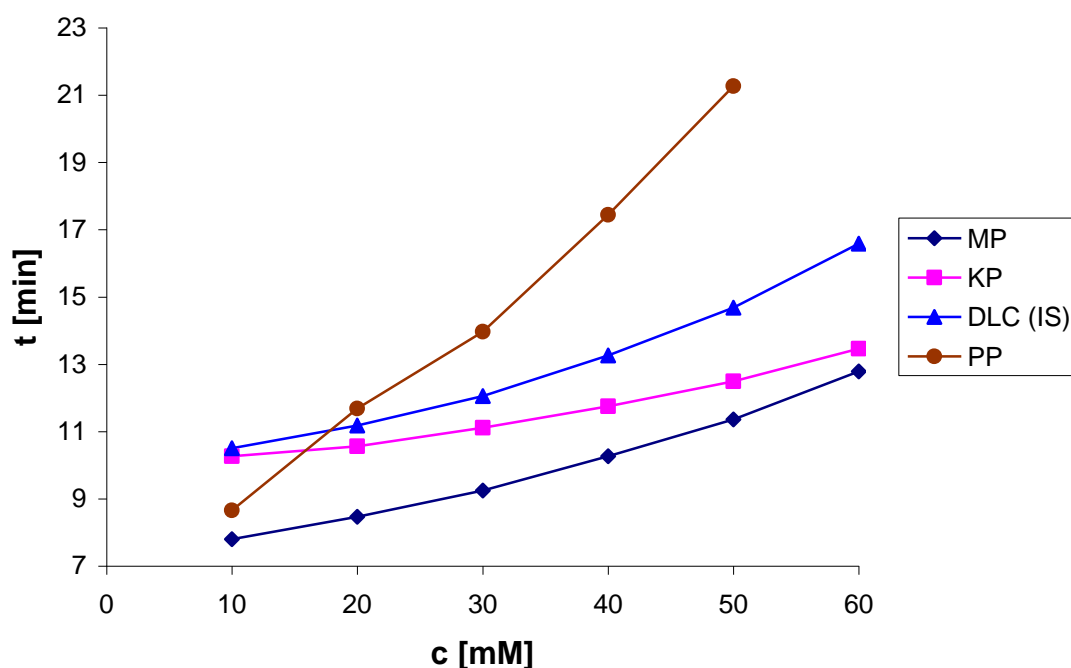
Obr. 5 Vliv pH* na migrační čas analytů; BGE: 50mM tricin, 30 mM SDS, 20 % methanol

5.1.5. Vliv koncentrace SDS

Typ a koncentrace tenzidu ovlivňuje rozdělovací koeficient micelární fáze / vodná fáze, rozlišení a selektivitu separace. Pro SDS je v literatuře uváděna CMC = 8,1 mM³ a používané koncentrace jsou řádově desítky mM. Při zjišťování vlivu koncentrace SDS na analýzu jsem použil elektrolytový systém obsahující SDS v koncentraci 10 mmol/l, 20 mmol/l, 30 mmol/l, 40 mmol/l, 50 mmol/l a 60 mmol/l. Koncentrace SDS měla vliv hlavně na rychlost migrace jednotlivých analytů. Se zvyšující koncentrací SDS se prodlužoval migrační čas jednotlivých analytů, a tím se měnila kvalita separace jednotlivých látek. Největší vliv na rychlost migrace byla u propylparabenu, u kterého v systému s 10 mmol SDS došlo k předběhnutí diklofenaku a ketoprofenu. Tím se dostal diklofenak, jako vnitřní standard na poslední místo v analýze. Toto pořadí látek je pro výsledek analýzy výhodné. Migrační časy ketoprofenu a diklofenaku se se zvyšující koncentrací také prodlužovaly, u diklofenaku více než u ketoprofenu. V systému s SDS o c = 10 mmol/l se diklofenak velice přiblížil ke ketoprofenu a tím se zhoršilo rozlišení jednotlivých látek. Proto jsem usoudil, že pufr s 10 mmol/l SDS není vhodný. U systému s 20 mmol/l SDS bylo rozlišení ketoprofenu,

diklofenaku a propylparabenu velice špatné. V systému s 30 mmol/l SDS došlo k mírnému oddálení diklofenaku od ketoprofenu a také propylparabenu od diklofenaku. S dalším zvýšením koncentrace SDS v systému došlo k výraznému zpomalení rychlosti migrace diklofenaku a hlavně propylparabenu a zbytečnému prodlužování analýzy. V systému s 60 mmol/ SDS dokonce nebylo možné detegovat propylparaben do 45 minut analýzy (Obr. 6).

S ohledem na kvalitu separace, symetrii píků a trvání analýzy jsem pro další měření zvolil tricinový pufr s 30 mM SDS (Obr. 6).

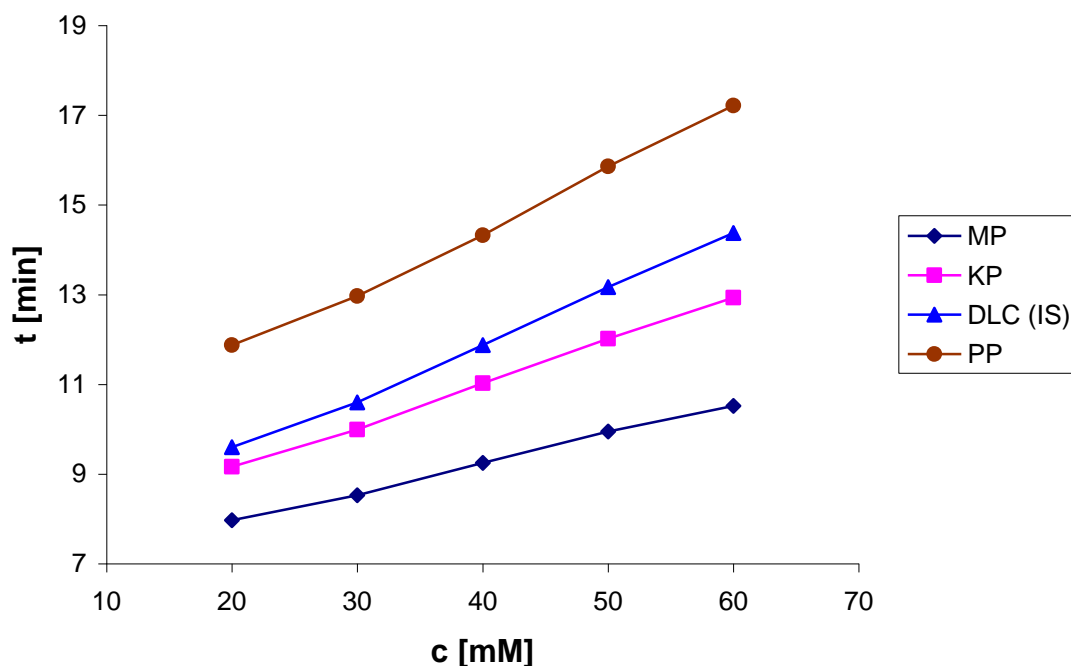


Obr. 6 Závislost migračních časů na koncentraci SDS. BGE: 50mM tricin, 20 % methanol, pH* = 8,3

5.1.6. Vliv koncentrace základního elektrolytu

Zjišťoval jsem vliv koncentrace tricinu v pracovním elektrolytu na délku a citlivost analýzy. Použil jsem elektrolytové systémy o koncentracích tricin 20, 30, 40, 50 a 60 mmol/l. Se zvyšující se koncentrací elektrolytu dochází ke zpomalování EOF a podle předpokladu se prodlužovala doba analýzy a tím i kvalita separace jednotlivých látek. Koncentrace tricinuu neměla velký vliv na poměry ploch píků analytu k ploše vnitřního standardu. Pro další analýzy jsem zvolil systém tricin 50 mmol/l. Analýza

trvala sice déle, než u pufrů s nižší koncentrací tricinu, byla zde již ale dokonalá separace jednotlivých látek (Obr. 7).



Obr. 7 Vliv koncentrace tricinu na migrační čas analytů; BGE: 30 mM SDS, 20 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

5.1.7. Vliv přídavku methanolu

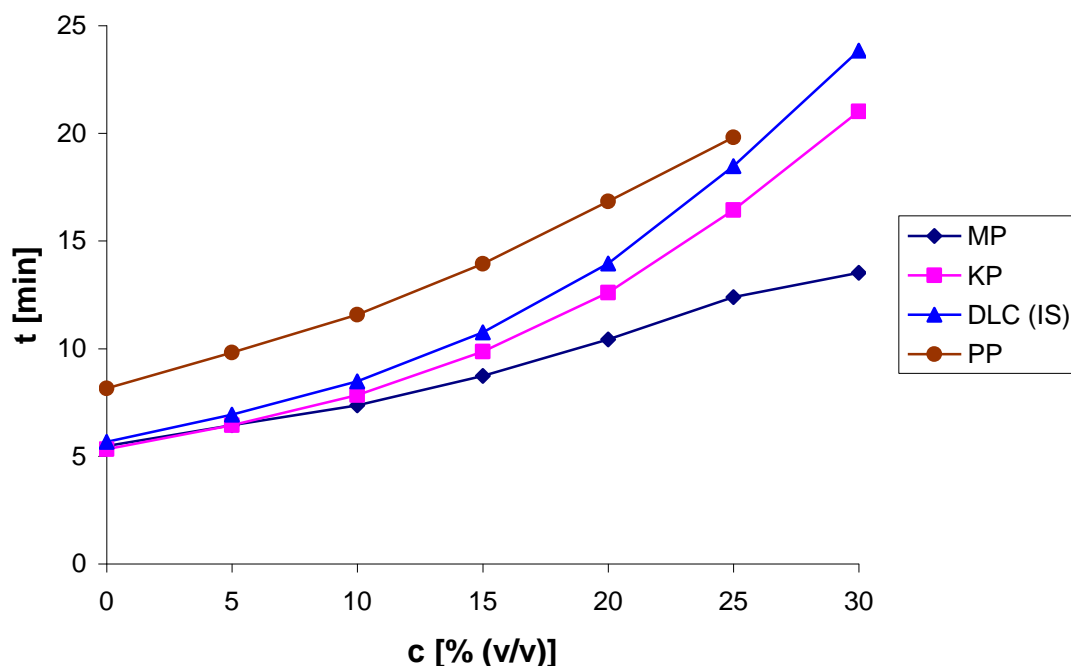
Přídavek organického rozpouštědla je nástrojem k řízení separace v MEKC. Většinou se jako modifikátory používají organické hydroxysloučeniny (např. 1-hexanol, cyklohexanol), jejichž přídavek k micelární fázi specificky snižuje kapacitní faktor (tj. molární poměr analytu v micelární fázi a vodné fázi) některých aromatických analytů s hydrofilními funkčními skupinami. Vliv těchto modifikátorů je většinou vysvětlován jako důsledek nasycení micelární palisádové vrstvy modifikátorem a analytem v micelární fázi. Tyto zásahy zlepšují separace v MEKC.

Dále jsou MEKC procedury modifikovány přídavkem aditiv jako jsou hydrofilní organická rozpouštědla – methanol, dimethylformamid nebo hydrofilní soluty (močovina). Tato aditiva většinou zvyšují solubilizaci hydrofilních analytů ve vodné fázi a obvykle neselektivně snižují rozdělovací koeficienty analytů.³

Přídavek organického rozpouštědla též způsobuje změny viskozity i EOF.¹ Ovlivňuje též kritickou micelární koncentraci. Při vysokém obsahu organického rozpouštědla může dojít k rozpadu micel. Dochází ke změnám selektivity i migračního času.

Kromě vodného pracovního elektrolytu jsem použil i systém s obsahem 5, 10, 15, 20, 25 a 30% (V/V) methanolu. Podobně jako koncentrace SDS měl přídavek methanolu vliv na rychlost migrace analytů. S rostoucí koncentrací methanolu se prodlužoval migrační čas jednotlivých analytů (viz také vliv organického rozpouštědla na zpomalení EOT), u parabenů méně, než u ketoprofenu a diklofenaku. V systému s 30% methanolem došlo pravděpodobně ke společné migraci diklofenaku a propylparabenu (Obr. 8).

Poměry ploch pík analytu k ploše píku vnitřního standardu se se zvyšujícím se obsahem methanolu snižovaly. Jako optimální jsem zvolil systém s 15 % (V/V) methanolu. Bylo zde docíleno dostatečné separace pík, poměry ploch se zvýšily, v porovnání s 20 % (V/V) methanolu a zkrátila se doby analýzy na 14 minut.



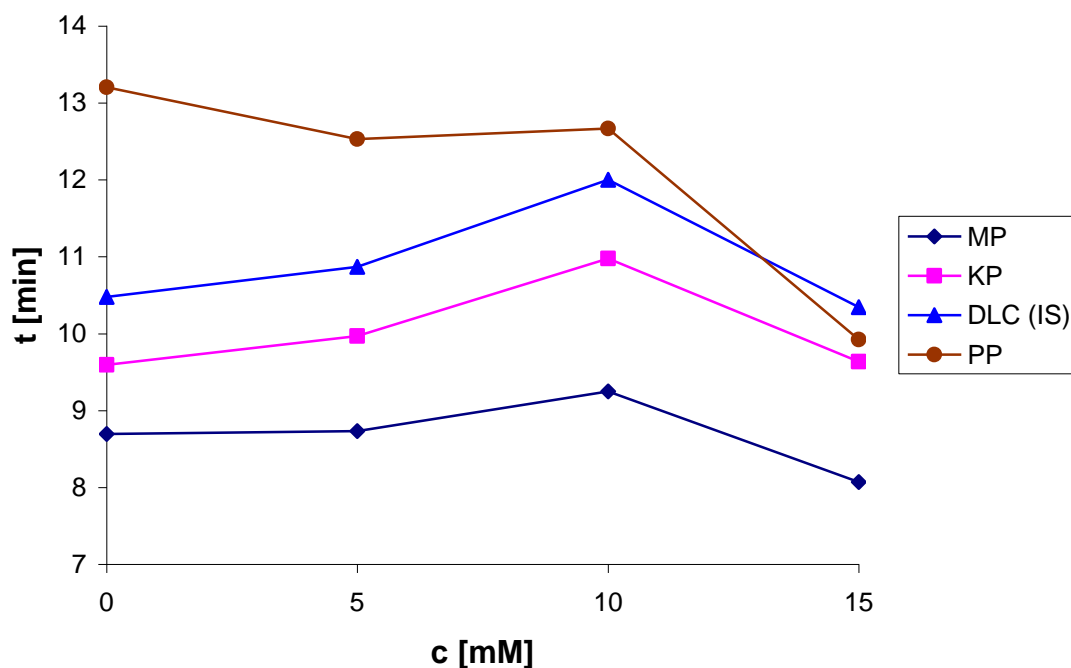
Obr. 8 Vliv koncentrace methanolu na migrační čas analytů; BGE: 50 mM triclin, 30 mM SDS, pH* = 8,3

5.1.8. Vliv cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou látky, které mají speciální tvar. Jsou cyklické a do své kavity mohou vázat molekuly jiných látek a tím selektivně ovlivnit rychlost migrace dané látky. Zkoušel jsem použití α -cyklodextrinů a β -cyklodextrinů. Použití α -cyklodextrinu nepřineslo žádné zlepšení. Systém s β -cyklodextrinem vykazoval některé změny. Připravil jsem sérii pufrů obsahující β -cyklodextrin v koncentraci 0, 5, 10 a 15 mmol/l. U systému s 5 mmol/l β -cyklodextrinu se výrazněji projevil vliv na propylparaben, jehož migrační čas se zkrátil o jednu minutu a mírně se prodloužily migrační časy ostatních analytů (Tab. 2, Obr. 9). U systému, který obsahoval 15 mmol/l β -cyklodextrinu, došlo k výraznému zrychlení migrace propylparabenu tak, že migroval mezi ketoprofenem a diklofenakem, který se tím dostal na poslední místo v analýze. Toto pořadí je výhodné. Reprodukovatelnost tohoto systému byla ale velmi malá a velmi se zhoršila symetrie diklofenaku. Pro další práci jsem zvolil systém, který obsahoval 5 mmol/ β -cyklodextrinu.

Tab. 2 Vliv koncentrace β -cyklodextrinu na migrační čas elektrolytů; BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 15 % methanol, pH* = 8,3

c(β-CD)	t_m MP	t_m KP	t_m DF (IS)	t_m PP
0	8,70	9,60	10,48	13,20
5	8,73	9,97	10,87	12,53
10	9,25	10,98	12,00	12,67
15	8,07	9,64	10,34	9,92



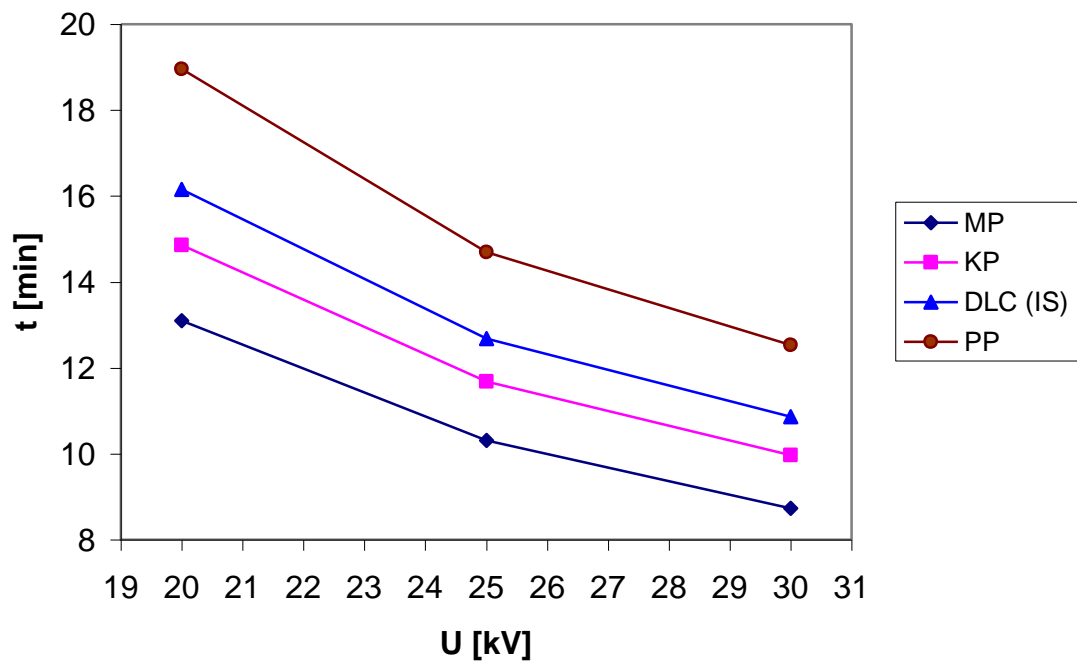
Obr. 9 Vliv koncentrace β -cyklodextrinu na migrační čas elektrolytů; BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

5.1.9. Vliv napětí

Analýzu jsem postupně prováděl s napětím 20 kV, 25 kV a 30 kV a sledoval jsem vzhled píků, plochu píků a migrační čas. Vliv byl naprosto podle očekávání. S rostoucím napětím se doba analýzy zkracovala (Tab. 3, Obr. 10), poměry ploch píků analytu k ploše píku vnitřního standardu se neměnily. Pořadí píků napětím ovlivněno nebylo. Z důvodu rychlosti jsem pro další práci zvolil napětí 30 kV.

Tab. 3 Vliv napětí na migrační čas analytů; BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

napětí [kV]	t_m MP [min]	t_m KP [min]	t_m DCL [min]	t_m PP [min]
20	8,73	9,97	10,87	12,53
25	10,31	11,68	12,69	14,69
30	13,10	14,85	16,15	18,96



Obr. 10 Vliv napětí na migrační čas analytů; BGE: 50 mM tricín, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

5.1.10. Vliv teploty

S rostoucí teplotou se zvyšuje pohyblivost iontů a analýza bývá rychlejší. Změna teploty také ovlivňuje rozdělovací koeficient látky mezi tlumivým roztokem a micelami, kritickou micelární koncentraci a viskozitu. Systém Beckman Coulter obsahuje kapalinové chlazení kapiláry a umožňuje tak průběh analýzy za dané konstantní teploty. Zkoušel jsem teplotu 20 a 25 °C. Při 25 °C se projevil některé rušivé vlivy a zhoršila se kvalita analýzy. Pro další práci jsem zvolil teplotu 20 °C.

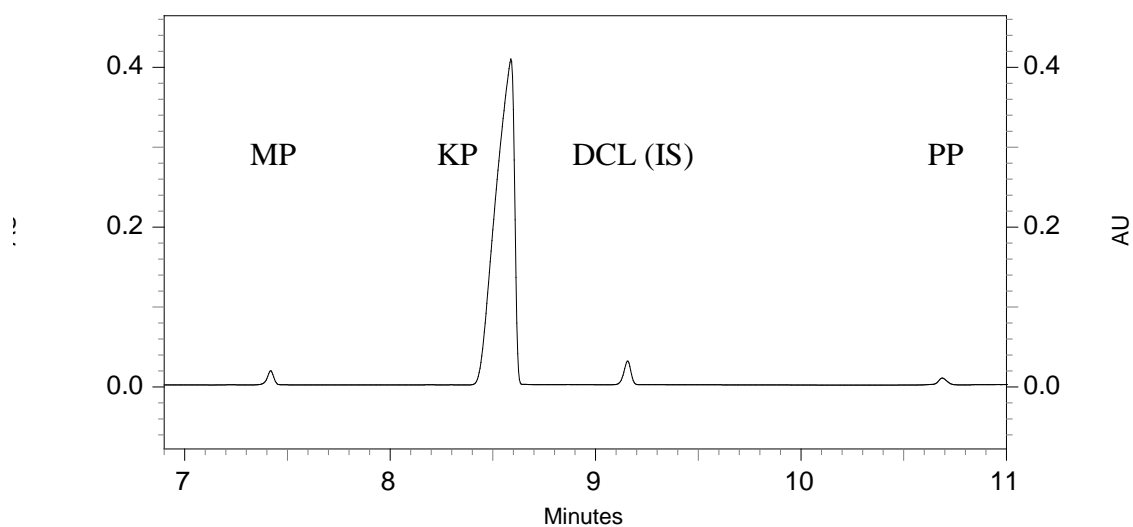
5.1.11. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření jsou shrnuty v Tab. 4.

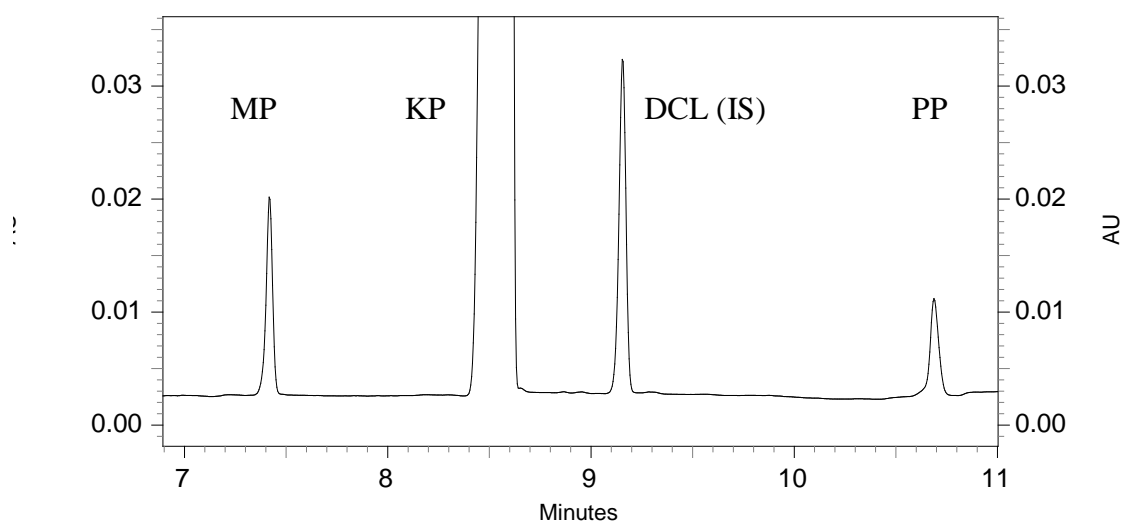
Tab. 4 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Rozpouštědlo	15 % methanol
Složky pufru, c	Tricin, 50 mM
Surfaktant, c	SDS, 30 mM
pH*	8,3
Teplota	20 °C
Napětí	30 kV
Detekce	200 nm
Dávkování	hydrodynamickým tlakem 48,3 mbar, 5s

Elektroforeogram standardů získaný při měření s použitím optimálního elektrolytu za uvedených podmínek je na Obr. 11 a Obr. 12.



Obr. 11 Elektroforeogram standardů methylparabenu, ketoprofenu, diklofenaku (IS), propylparabenu. BGE: 50 mM tricín, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, pH* = 8,3; teplota 20 °C, λ = 200 nm



Obr. 12 Elektroforeogram standardů methylparabenu, ketoprofenu, diklofenaku (IS), propylparabenu. BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$; teplota 20 °C, $\lambda = 200$ nm

5.1.12. Rozlišení

Pro výpočet rozlišení jsem použil vzorec uvedený na str. 38 a použil jsem průměrné hodnoty kalibračního měření s roztokem obsahujícím ketoprofen 100 mg/100ml, methylparaben 2 mg/100ml a propylparaben 1 mg/100ml. Výsledky výpočtu jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5 Rozlišení mezi jednotlivými píky

Dvojice analytů	Rozlišení R_s
Methylparaben – ketoprofen	4,84
Ketoprofen – diklofenak sodný	2,28
Diklofenak sodný - propylparaben	9,89

5.1.13. Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje pomocí počtu dosažených teoretických pater N , případně ekvivalentem teoretického patra H . Výpočty jsem provedl pomocí vzorců

uvedených na str. 38. Hodnoty počtu teoretických pater a hodnoty H jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Parametry charakterizující účinnost elektroforetické separace (v závorce uvedeny hodnoty H vzhledem k efektivní délce kapiláry)

Analyt	N	H [μm]
Methylparaben	48971	12,66 (10,21)
Propylparaben	49064	12,64 (10,19)
Ketoprofen	8772	70,68 (56,99)

Hodnoty počtu teoretických pater se pohybují od 8772 (ketoprofen) až 49064 (propylparaben). Hodnota H je pro celkovou délku kapiláry pro analyty 12,64 μm (PP), resp. 70,68 (KP), pro efektivní délku kapiláry jsou hodnoty H ještě příznivější.

5.2. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Kalibrační závislost jsem proměřil za použití optimálního pracovního elektrolytu. Jako kvantitativní parametr jsem použil poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu. Velikosti ploch píků jsem získal ze záznamu automaticky vyhodnoceného počítačovým programem. Pro každou koncentraci jsem provedl tři měření. Kalibrační závislost jsem zpracoval metodou lineární regrese.

Obecný tvar rovnice přímky:

$$y = kx + q$$

x – koncentrace látky (v g/100ml)

y – plocha píku analytu / plocha píku vnitřního standardu

k – směrnice přímky

q – absolutní člen

5.2.1. Kalibrační závislost pro methylparaben

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,2 mg/100ml, 1,2 mg/100ml, 2,0 mg/100ml, 3,0 mg/100ml, 4,0 mg/100ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$$k = 0,2712$$

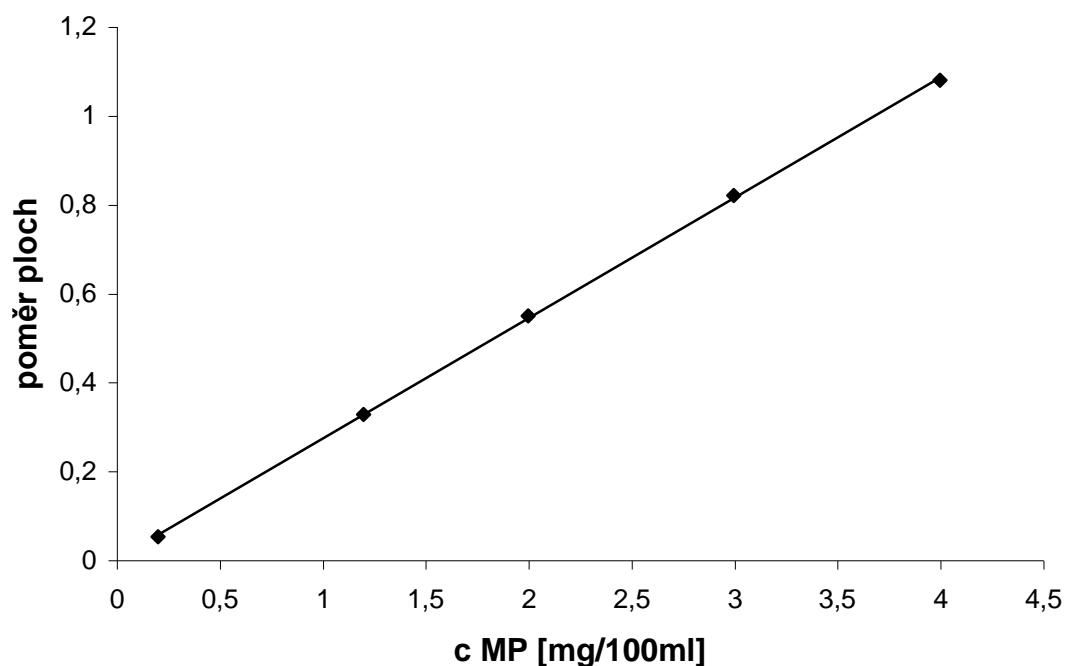
$$q = 0,0032$$

Koeficient korelace: 0,9999

Reziduální odchylka: 0,00642

Hodnota F-statistiky: $1,57 \cdot 10^4$

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



Obr. 13 Kalibrační závislost pro methylparaben; BGE: 50 mM triclin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

V sledovaném rozmezí koncentrací methylparabenu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9999) (Obr. 13)

5.2.2. Kalibrační závislost pro propylparaben

Měření byla prováděna pro následující koncentrace: 0,1 mg/100ml, 0,6 mg/100ml, 1,0 mg/100ml, 1,5 mg/100ml, 2,0 mg/100ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$$k = 0,330$$

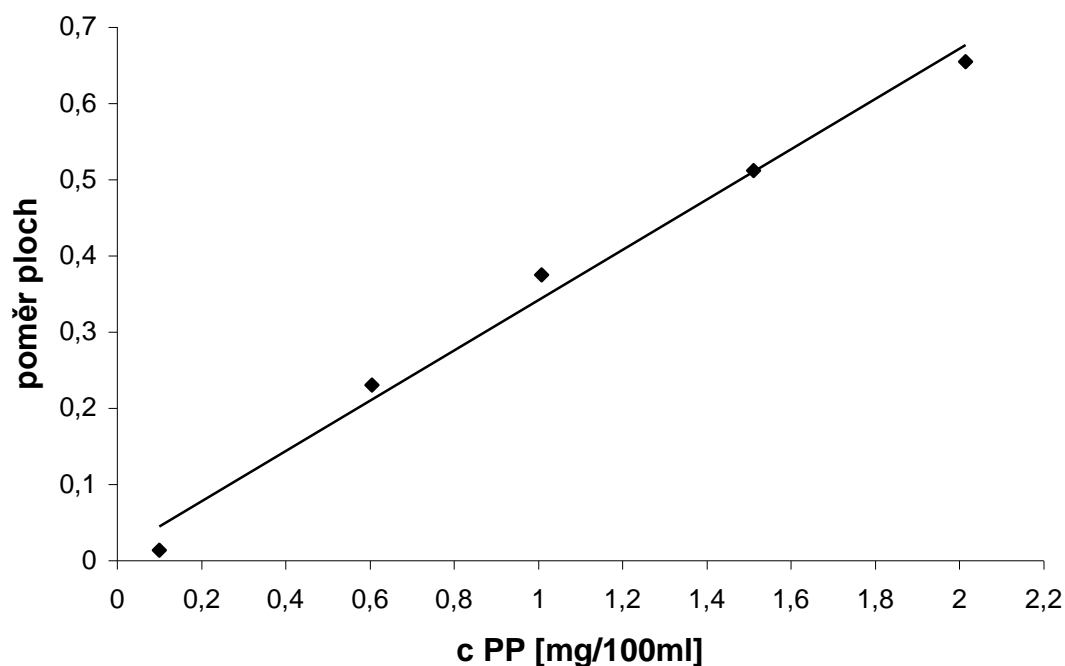
$$q = 0,011$$

Koeficient korelace: 0,9944

Reziduální odchylka: 0,0302

Hodnota F-statistiky: 267

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



Obr. 14 Kalibrační závislost pro propylparaben; BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$

V sledovaném rozmezí koncentrací propylparabenu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9944) (Obr. 14)

5.2.3. Kalibrační závislost pro ketoprofen

Měření byla prováděna pro následující koncentrace: 10 mg/100ml, 60 mg/100ml, 100 mg/100ml, 150 mg/100ml, 200 mg/100ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$$k = 0,309$$

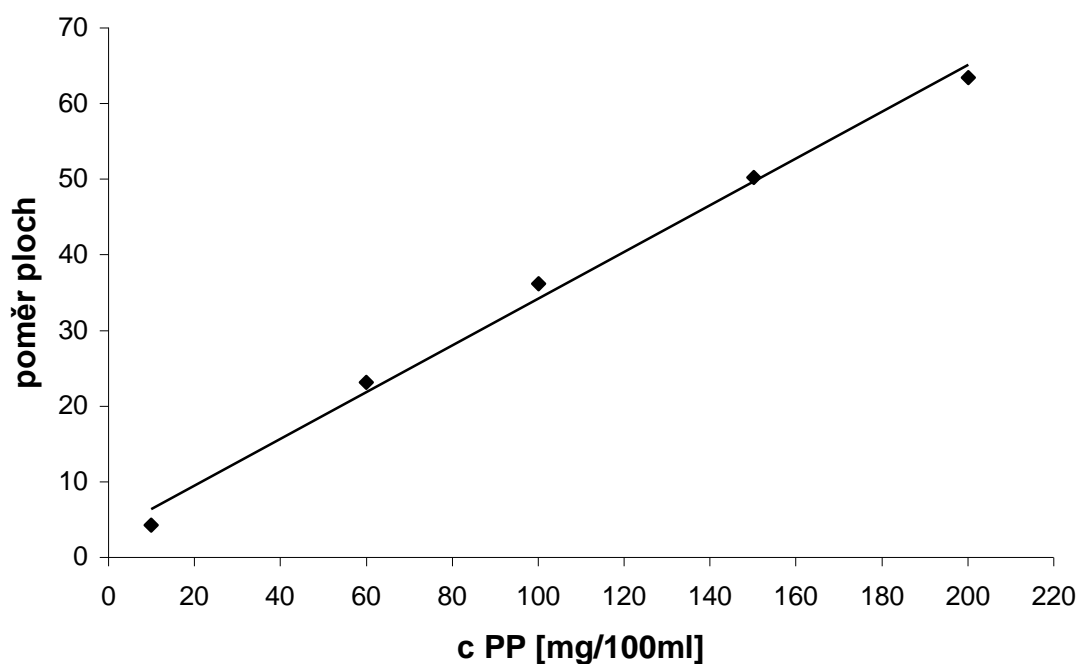
$$q = 3,3$$

Koeficient korelace: 0,9969

Reziduální odchylka: 2,08

Hodnota F-statistiky: 487

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



Obr. 15 Kalibrační závislost pro ketoprofen; BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, pH* = 8,3

V sledovaném rozmezí koncentrací ketoprofenu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9969) (Obr. 15)

5.2.4. Limit Detekce a limit kvantifikace

Limit detekce a limit kvantifikace jsou parametry, jejichž doložení vyžaduje Státní ústav pro kontrolu léčiv u metod pro stanovení nečistot.⁵⁴ Všechny tři stanovované látky nejsou nečistotami, ale látkami účinnými či konzervačními. Přesto jsem u všech tří látek tyto hodnoty zjistil využitím vztahu ze str. 37. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 Limit detekce a limit kvantifikace

Analyt	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
Methylparaben	0,38	1,28
Propylparaben	0,53	1,78
Ketoprofen	0,82	2,74

U propylparabenu vyšel limit kvantifikace 1,78 $\mu\text{g/ml}$ a při kalibrační závislosti jsem měřil nejnižší koncentraci 0,1 mg/100ml, což je 1 $\mu\text{g/ml}$. Tato hodnota se nachází pod vypočteným limitem kvantifikace. Přesto vyšla kalibrační závislost lineární.

5.3. OPAKOVATELNOST METODY

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů jsem provedl šest měření pro danou koncentraci. Směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku jsem vypočítal podle vztahů na straně 37.

Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 8 a Tab. 9.

Tab. 8 Opakovatelnost poměru plochy píku analytu k ploše vnitřního standardu (n=6)

Analyt	c [mg /100ml]	Plocha píku/ plocha píku DF	s	s _r [%]
Methylparaben	1,9975	0,54857	0,00419	0,76
Propylparaben	1,0075	0,35918	0,00774	2,15
Ketoprofen	100,115	35,9228	0,27863	0,77

Relativní směrodatná odchylka velikosti poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu se pohybuje v rozmezí 0,76 – 2,15. Největší hodnota byla zjištěna pro propylparaben.

Tab. 9 Opakovatelnost migračních časů (n = 6)

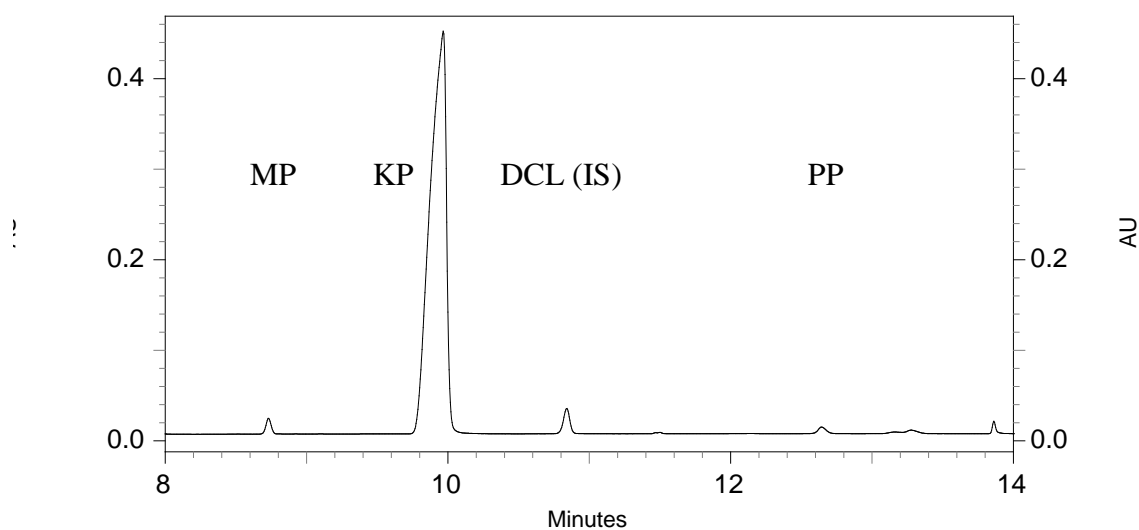
Analyt	c [mg /100ml]	t _m [min]	s [min]	s _r [%]
Methylparaben	1,9975	7,38	0,05369	0,73
Propylparaben	1,0075	10,80	0,07816	0,72
Ketoprofen	100,115	8,59	0,04431	0,52

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybuje v rozmezí 0,52 - 0,73 % a prakticky u všech analytů je podobná a velmi dobrá.

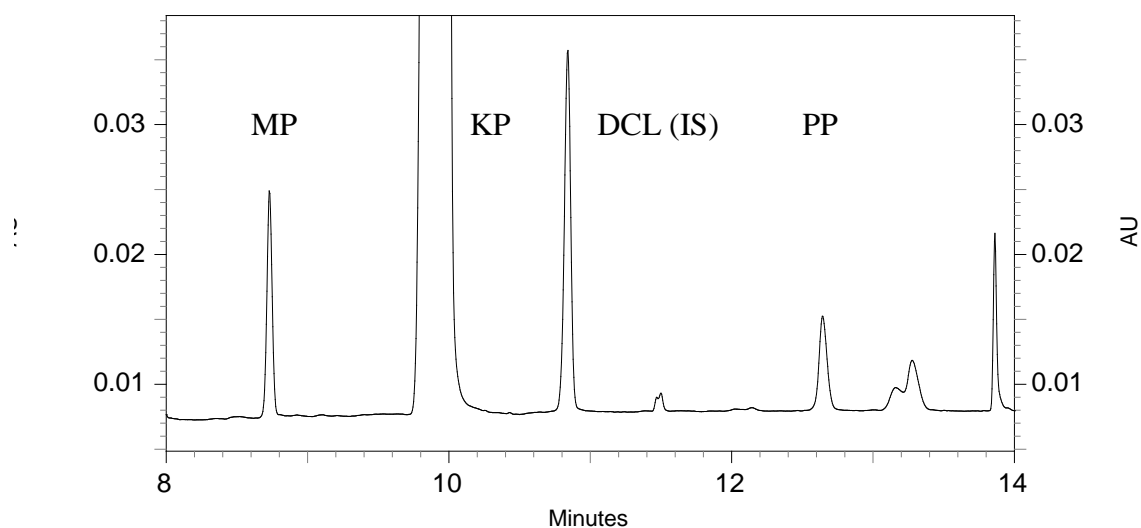
5.4. ANALÝZA HVLP

Vypracovanou metodu jsem použil pro analýzu léčivého přípravku Ketoprofen gel 2,5% metodou vnitřního standardu. Elektroforeogram je zachycen na Obr. 16 a

Obr. 17.



Obr. 16 Elektroforeogram přípravku Ketoprofen gel 2,5%, BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$; napětí 30 kV, teplota 20 °C, $\lambda = 200 \text{ nm}$



Obr. 17 Elektroforeogram přípravku Ketoprofen gel 2,5%, BGE: 50 mM tricin, 30 mM SDS, 5 mM β -cyklodextrin, 15 % methanol, $\text{pH}^* = 8,3$; napětí 30 kV, teplota 20 °C, $\lambda = 200 \text{ nm}$

Oproti analýze standardů se na záznamu vyskytují navíc 3 píky. Píky patří některé ze složek levandulové silice, která je též v gelu obsažena. V analyzovaném gelu jsou obsaženy ještě další pomocné látky (Carbopol 980NF, Propylenglykol a Triethanolamin), které UV záření neabsorbují.

Měření HVLP gelu jsem provedl pro dvě navážky po šesti měřeních. Pro navážku standardů tři měření. Množství stanovovaných látek jsem vypočítal podle vzorce:

$$\% = \frac{c_{st} \cdot P_{vz} \cdot 100}{P_{st} \cdot 2000 \cdot n}$$

% – obsah látky v gelu v procentech

c_{st} – koncentrace standardu [mg/100ml]

P_{vz} – poměr plochy píky analytu k ploše píku vnitřního standardu ve vzorku gelu

P_{st} – poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu ve vzorku standardů

n – navážka gelu [g]

Výsledky jsou uvedeny v (Tab. 10).

Tab. 10 Analýza přípravku Ketoprofen gel 2,5% metodou MEKC (n=6)

Analyt	Obsah [%]	s	s _R [%]	Deklarovaný obsah [%]
Methylparaben	0,049	0,008847947	1,70	0,05
Propylparaben	0,027	0,006227507	1,87	0,025
Ketoprofen	2,49	0,200651928	0,52	2,5

5.5. OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY

5.5.1. Srovnání s validovanou metodou, tj. HPLC

Správnost metody byla ověřena s využitím srovnávací metody. Tou byla vysokoúčinná chromatografie s UV detekcí.⁵³ V roce 2002 byla v kontrolní laboratoři katedry analytické chemie vypracována a validována metoda pro stanovení obsahu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5%. Já jsem vyvíjel metodu MEKC pro stejnou šarži gelu, který byl v době konání diplomové práce analyzován HPLC v rámci výstupní kontroly přípravku. Výsledky získané HPLC, uvedené v (Tab. 11) jsem převzal a použil pro statistické hodnocení shodnosti výsledků získaných dvěma různými analytickými metodami.

Tab. 11 Analýza přípravku Ketoprofen gel 2,5% srovnávací metodou (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) (n = 6) (převzaté výsledky)

Analyt	Obsah [%]	s	s _R [%]	Deklarovaný obsah [%]
Methylparaben	0,0495	0,00095	1,92	0,05
Propylparaben	0,026	0,0005	1,92	0,025
Ketoprofen	2,452	0,0463	1,90	2,5

Pro zjištění, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi výsledky obou metod, jsem zvolil Studentův test pro stejný počet výsledků získaných metodami, které chci porovnávat.

Důležitým parametrem je studentovo kritérium t, které se vypočítá podle vzorce:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B| \cdot \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(S_A^2 + S_B^2)}}$$

\bar{x}_A, \bar{x}_B – průměrné hodnoty získané jednotlivými metodami

s_A, s_B – směrodatné odchylky průměrů

$n = n_A = n_B$ – počet stanovení jednotlivými metodami

Pro výpočet jsem použil hodnoty uvedené v Tab. 10 a Tab. 11. Výsledné hodnoty Studentova kritéria jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12 Studentovo kritérium pro srovnávané metody

Analyt	t
Methylparaben	0,1235
Propylparaben	0,3900
Ketoprofen	0,4126

Následně se porovná studentovo kritérium s kritickou hodnotou t_α . Pro počet stupňů volnosti $\nu = 2(n-1)$ a zvolenou hladinu významnosti $\alpha = 0,050$ je $t_\alpha = 2,571$. Rozdíl mezi metodami je statisticky významný, pokud je $t > t_\alpha$.

Z výsledků Tab. 12 Studentovo kritérium pro srovnávané metody vyplývá, že při stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu je rozdíl mezi metodami nevýznamný. t stanovovaných látek se pohybuje od 0,12 do 0,41 a to je menší než 2,571.

5.5.2. Analýza vzorku s přidavkem standardních látek

Správnost metody byla ověřena ještě metodou analýzy vzorku přidavkem standardních látek (Experimentální část str. 39). Výsledky jsou v Tab. 13.

Tab. 13 Recovery zjištěné metodou přidavku standardů k HVL P

Analyt	Vložená (mg/100ml)	Nalezená MEKC (mg/100ml)	Recovery (%)
Methylparaben	1,012	1,051	103,86
Propylparaben	0,492	0,504	102,35
Ketoprofen	50,01	48,29	96,56

$$\text{Recovery se vypočítá podle vzorce } R (\%) = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložená}} \cdot 100.^{54}$$

Jestliže bylo testování správnosti provedeno bez IS, hodnoty recovery byly podstatně horší (R (MP) = 116,83 R(PP) = 115,23 a R(KP) = 106,49.

Na základě dosažených výsledků lze tedy říci, že byla vypracována metoda vhodná pro separaci a současné stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu, která je dostatečně citlivá a selektivní. Použitý elektrolyt obsahuje pouze 15% methanolu. Při přípravě vzorku je použit též pouze roztok methanolu, žádná další rozpouštědla nejsou potřeba. V MEKC je spotřeba vzorku i pufrů velmi malá, to činí metodu ekonomicky i ekologicky šetrnou. To je výhoda proti HPLC.

Metoda byla aplikována na analýzu průmyslově vyráběného gelu, přičemž citlivost metody umožnila v tomto gelu současně stanovit vedle ketoprofenu též oba parabeny, které jsou jako konzervační látky obsaženy v léčivém přípravku v mnohem nižší koncentraci než léčivá látka.

Doba samotné analýzy byla kratší než 13 minut, celková doba práce se však prodlužuje o promývání kapiláry, které je u MEKC zvláště důležité, protože absorpce na stěny kapiláry je častá.

V případě HPLC metodiky použité pro stanovení methylparabenu, propylparabenu a ketoprofenu v gelu trvala vlastní analýza méně než 7 minut. To je kratší než v MEKC. Při srovnání citlivostí obou metod vychází příznivější hodnoty pro HPLC. Autoři stanovili limity LOD a LOQ pouze pro účinnou látku ketoprofen, které jsou: LOD = 0,014 µg/ml a LOQ = 0,046 µg/ml. Hodnoty těchto limitů metodou MEKC jsou asi 60krát vyšší.²³ Metoda HPLC umožňuje též stanovení degradačních produktů a nečistot. Naopak opakovatelnost při MEKC je lepší. s_r (KP) o 72,6 %, (MP) o 11,5 %, (PP) o 1,6 %.

6. ZÁVĚRY

Z výsledků této práce vyplývají následující závěry:

- Pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie byly současně analyzovány ketoprofen, methylparaben a propylparaben.
- Bylo vyzkoušeno několik elektrolytových systémů, jako nejvhodnější se ukázal tricín. Použitým surfaktantem byl dodecylsírán sodný.
- Byly hledány optimální podmínky pro analýzu – pH, koncentrace tricínu, SDS a přídavek methanolu, velikost pracovního napětí a teplota.
- Jako optimální elektrolyt byl zvolen 50 mM tricín s obsahem 30 mM SDS v 15 % methanolu. pH* elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 8,3 pomocí roztoku hydroxidu sodného.
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 60,2 cm a efektivní délce 50 cm. Bylo vkládáno napětí o velikosti 30 kV, teplota kapiláry byla udržována na 25°C. Detekce probíhala při vlnové délce 200 nm.
- Jako vnitřní standard pro kvantitativní analýzu byl použit diklofenak sodný.
- Byly měřeny kalibrační závislosti analytů metodou s vnitřním standardem. Kalibrační závislosti byly měřeny pro koncentrace $c(\text{MP})$ 0,2 – 4 mg/100ml, $c(\text{PP})$ 0,1 – 2 mg/100ml a $c(\text{KP})$ 10 – 200 mg/100ml. Korelační koeficient vyšel pro MP 0,9999, PP 0,9944 a pro KP 0,9969.
- Byla ověřena opakovatelnost metody. Pro ověření bylo provedeno šest po sobě jdoucích měření pro koncentraci MP 1,9975 mg/100ml; PP 1,0075 mg/100ml; KP 100,115 mg/100ml. Obsah diklofenaku (IS) byl 3,003 mg/100ml. Relativní směrodatná odchylka A_X/A_{IS} se pohybovala v rozmezí 0,77 - 2,15 %, relativní směrodatná odchylka migračních časů byla 0,52 - 0,73 %.
- Migrační čas methylparabenu byl 7,41 minut, ketoprofenu 8,55 minut a propylparabenu 11,68 minut. IS migroval jako třetí v čase 9,1 minut.
- Byly stanoveny limity detekce a kvantifikace. Limit detekce je v rozmezí 0,38 $\mu\text{g/ml}$ (MP) - 0,82 $\mu\text{g/ml}$ (KP) a kvantifikace 1,28 $\mu\text{g/ml}$ (MP) - 2,74 $\mu\text{g/ml}$ (KP).

- Bylo vypočítáno rozlišení mezi jednotlivými píky. Hodnoty R_s byly v rozmezí 2,28 – 9,89. Je zřejmé, že analyty jsou dokonale separovány až na základní linii.
- Bylo vypočítáno množství teoretických pater N a výškový ekvivalent teoretického patra H . Hodnota N se pohybuje v rozmezí 8872 – 49064 a hodnota H pro celkovou délku kapiláry 12,64 až 70,68, pro efektivní 10,19 až 56,99.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v průmyslově vyráběném přípravku Ketoprofen gel 2,5 %, v němž jsou všechny tyto tři látky obsaženy. Zjištěný obsah látek v tomto gelu odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem.⁵³
- Správnost metody byla ověřena statistickým porovnáním výsledků MEKC a srovnávací HPLC metody a metodou analýzy vzorku s přidavkem standardních látek.

7. LITERATURA

1. Dolník, V.: Úvod do kapilární elektroforézy. 1.vyd.Brno: Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky; Chromspec, 1994
2. Heiger, D. N.: High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction. Waldbronn : Hewlett-Packard Company, 1992
3. Khaledi, M. G.: High-Performance Capillary Electrophoresis : Theory, Techniques, and Applications. New York : John Wiley & Sons, 1998
4. Majer, J.: Analytická chemia. 1. vyd. Martin : Osveta, 1989
5. Altria, K. D.: Application of Microemulsion Elektrokinetic Chromatography to the Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients. J. Chromatogr. A, 1999, 844(1-2), 371-386
6. Foret, F., Křivánková, L., Boček, P.: Capillary Zone Elektrophoresis, Edice Elektrophoresis library. Weinheim : VCH, 1993
7. Marina, M. L.: Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, Elsevier B. V., 2005
8. Lunte, S. M., Radzik, D. M.: Pharmaceutical and Biomedical Application of Capillary Elektrophoresis. Oxford : Pergamon, 1996
9. Grossman, P- D., Colburn, J. C.: Capillary elektrophoresis : Theory and Practice. London : Academic Press, 1992
10. Boček, P., Deml, M., Gebauer, P., Dolník, V.: Analytická kapilární izotachoforéza. Praha : Academia, 1987
11. Bartle, K. D., Myers, P.: Theory of Capillary Electrochromatography. J. Chromatogr. A, 2001, 916, 3-23
12. http://www.microsolvtch.com/hplc/cec_col.html, 2. 4. 2007
13. Český lékopis 2005. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a. s., 2005, str. 1836
14. Chemical Abstract, Sci Finder Scholar, version 2006
15. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. 1. vyd. Praha : Galén, 2002
16. Mikro-verze Automatizovaného informačního systému léčivých přípravků (AISLP) 2006.1 pro MS Windows

17. Aboul-Enein, H. Y., Dal, A. G., Tuncel, M.: A Validated Method Development for Ketoprofen by a Flow-Injection Analysis with UV-Detection and its Application to Pharmaceutical Formulations, *Il Farmaco* 2003, 58(6), 419-422
18. Bempong, D. K., Bhattacharyya, L.: Development and Validation of a Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Ketoprofen Topical Penetrating Gel, *J. Chromatogr A.*, 2005, 1073(1-2), 341-346
19. Martinez-Algaba, C., Escuder-Gilabert, L., Sagrado, S., Villanueva-Camanas, R. M., Medina-Hernandez, M. J.: Comparison Between Sodium Dodecylsulphate and Cetyltrimethylammonium Bromide as Mobile Phases in the Micellar Liquid Chromatography Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 36(2), 393-399
20. Martin, M. J., Pablos, F., Gonzalez, A. G.: Simultaneous Determination of Caffeine and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Pharmaceutical Formulations and Blood Plasma by Reversed-Phase HPLC from Linear Gradient Elution, *Talanta*, 1999, 49(2), 453-459
21. Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D.: Development of a Multi-Residue Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for Screening and Trace Level Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewaters, *Talanta*, 2006, 70(4), 678-690
22. Panusa, A., Multari, G., Incarnato, G., Gagliardi, L.: High-performance Liquid Chromatography Analysis of Anti-Inflammatory Pharmaceuticals with Ultraviolet and Electrospray-Mass Spectrometry Detection in Suspected Counterfeit Homeopathic Medicinal Products, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 43(4), 1221-1227
23. Dvořák, J., Hájková, R., Matysová L., Nováková, L., Koupparis, M.A., Solich, P.: Simultaneous HPLC Determination of Ketoprofen and its Degradation Products in the Presence of Preservatives in Pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 36(3), 625-629
24. Chen, Y.-L., Wu, S.-M.: Capillary Zone Electrophoresis for Simultaneous Determination of Seven Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug in Pharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 907-912
25. Donato, M. G., Baeyens, W., Van Den Bossche, W., Sandra, P.: The Determination of Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs in Pharmaceuticals by

- Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, 12(1), 21-26
26. Melichar, B.: *Chemická léčiva. 3., přeprac. Vyd. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1987*
27. Chalabala, M.: *Technologie léků. 2., přepr. a dopl. Vyd. Praha : Galén, 2001*
28. Kang, S. H., Kim, H.: Simultaneous Determination of Methylparaben, Propylparaben and Thimerosal by High-Performance Liquid Chromatography and Electrochemical Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 15(9-10), 1359-1364
29. Ali, M. S., Ghorri, M., Khatri, A. R.: Stability Indicating Simultaneous Determination of Domperidone (DP), Methylparaben (MP) and Propylparaben by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41(2), 358-365
30. Kreuz, D. M., Howard, A. L., Ip, D.: Determination of Indinavir, Potassium Sorbate, Methylparaben, and Propylparaben in Aqueous Paediatric Suspensions. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 19(5), 725-735
31. Kollmorgen, D., Kraut, B.: Determination of Methylparaben, Propylparaben and Chlorpromazine in Chlorpromazine Hydrochloride Oral Solution by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 1998, 707(1-2), 181-187
32. Driouich, R., Trabelsi, H., Bouzouita, K. A.: Stability-Indicating Assay for Haloperidol Syrup by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 2001, 53(11-12), 629-634
33. Moreno, M. A., Castro, D., Frutos, P., Ballasteros, M. P., Lastres, J. L.: Liquid-Chromatographic Determination of Methylparaben and Propylparaben in Nortriptyline Hydrochloride Oil-Water Microemulsions. *Chromatographia*, 2000, 52(9-10), 589-592
34. Quarry, M. A., Sebastian, D. S., Williams, R. C.: Determination of Nalbuphine Hydrochloride, Methylparaben, and Propylparaben in Nalbuphine Hydrochloride Injection by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 1998, 47(9-10), 515-522
35. Solich, P., Hájková, R., Pospíšilová, M., Šícha, J.: Determination of Methylparaben, Propylparaben, Clotrimazol and its Degradation Products in Topical Cream by RP – HPLC. *Chromatographia*, 2002, 55, 181-184

36. Dhaliwal, K., Theobald, A. E.: The Determination of Paraben Preservatives in Syrup Formulations. *Pharm. Sci.*, 1995, 1(2), 99-101
37. Nguyen, T.T., Kringstad, R., Rasmussen, K.E.: Use of Extraction Columns for the Isolation of Desonide and Parabens from Creams and Ointment for High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr.*, 1986, 336, 445-450
38. Martin, C. J., Saxena, S. J.: High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Mettaraminol Bitrate in the Presence of Parabens [Hydroxybenzoates]. *J. Pharm. Sci.*, 1980, 69(12), 1459-1461
39. Maw-Rong Lee, Chueh-Yu Lin, Zu-Guang Li and Tzu-Feng Tsai, Simultaneous Analysis of Antioxidants and Preservatives in Cosmetics by Supercritical Fluid Extraction Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1120(1-2), 244-251
40. Abuirjeie, M. A., Abdel-Hamid, M. E., Abdel-Aziz, A. A., Ibrahim, E. A.: Comparative Study on HPLC and Microbiological Determination of p-Hydroxybenzoate Esters (Parabens) in Pharmaceutical Formulation. *Anal. Lett.*, 1990, 23(1), 67-82
41. Noguera-Ortí, J. F., Villanueva-Camanas, R. M., Ramis-Ramos, G.: Determination of Parabens in Cosmetics without Previous Extraction by Micellar Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1999, 37(3), 83-87
42. Tománková, H., Pinkasová, M.: TLC (HPTLC) – spektrodenzitometrie ve farmaceutické analýze. III. HPTLC-spektrodenzitometrické simultánní stanovení parabenů ve farmaceutických přípravcích. *Ceskoslov. Farm.*, 1989, 38(7), 299-303
43. Labat, L., Kummer, E., Dallet, P., Dubost, J. P.: Comparison of High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis for the Determination of Parabens in a Cosmetic Product. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 23(4), 763-769
44. Cruces Blanco, C., Segura Carretero, A Gálvez Mata, L., Fernández Gutierrez, A.: Simultaneous Determination, by Capillary Zone Electrophoresis, of Multiple Compoments of Different Industrial Products. *Chromatographia*, 2001, 53(7-8), 414-418

45. Wang, S. P., Chang, C. L.: Determination of Parabens in Cosmetic Products by Supercritical Fluid Extraction and Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chim. Acta.*, 1998, 377(1), 85-93
46. Hamoudová, R., Pospíšilová, M., Kavalířová, A., Solich, P., Šícha, J.: Separation and Determination of Clotrimazole, Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical Preparation by Micellar Electrokinetic Chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40(1), 215-219
47. Geise, R. J., Machnicki, N. I.: A Study of Parabens as Model Hydrophobic Compounds by Capillary Electrophoresis and Their Determination in Cosmetic Formulations. *J. Capillary Electrophor.*, 1995, 2(2), 69-75
48. Jaworska, M., Szulińska, Z., Wilk, M.: Application of Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Determination of Preservatives in Pharmaceutical Formulations. *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 137-143
49. Driouich, R., Takayanagi, T., Oshima, M., S.: Separation and Determination of Haloperidol, Parabens and some of their Degradation Products by Micellar Elektrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 2000, 903(1-2), 271-278
50. Baalbaki, B., Blanchin, M. D., Fabre, H.: Validation of Micellar Elektrokinetic Capillary Chromatography Method for the Determination of Imidurea, Methyl and Propylparabens in a Pharmaceutical Ointment. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 463(1), 15-20
51. Mahuzier, P. E., Atria, K. D., Clark, B. J.: Selective and Quantitative Analysis of 4-hydroxybenzoate Preservatives by Microemulsion Elektrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 2001, 924(1-2), 465-470
52. Huang, H.-Y., Lai, Y.-Ch., Chiu, Ch.- W., Yeh, J.-M.: Comparing Micellar Elektrokinetic Chromatography and Microemulsion Elektrokinetic Chromatography for the Analysis of Preservatives in Pharmaceutical and Cosmetic Products. *J. Chromatogr. A*, 2003, 993, 153-164
53. Podniková norma, Validace metody pro stanovení obsahu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v přípravku Ketoprofen gel 2,5 %, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Kontrolní laboratoř 506, 2002
54. Šabartová, J.: Věstník SÚKL 1/1994, Validace analytických metod, str. 6; Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha 1993

55. Huber, L.: Good Laboratory Practice : A Primer for High-Performance Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis, and UV-Visible Spectroscopy. Hewlett-Packard Company, 1993
56. International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Validation of Analytical methods: methodology. ICH Q2B

8. SEZNAM ZKRATEK

ACES – N-(acetamido)-2-aminoethan sulfonová kyselina
CMC – kritická micelární koncentrace
CZE – kapilární zónová elektroforéza
DLC – diklofenak sodný
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EP – ethylparaben
EOF – elektroosmotický tok
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPCE – vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVLP – hromadně vyráběný léčivý přípravek
IS – vnitřní standard
KP – ketoprofen
LOD – limit detekce
LOQ – limit kvantifikace
MEEKC – mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie
MES – 2-morpholinoethansulfonová kyselina
MOPSO – 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropansulfonová kyselina
MP – methylparaben
MS – hmotnostní spektrometrie
NSAID – nesteroidní protizánětlivá látka
PP – propylparaben
RP-LC – kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SDS – dodecylsírán sodný
TAPS – N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonová kyselina
TRIS – tris(hydroxymethyl)-aminomethan

9. ABSTRACT

9.1. ANALYSIS OF KETOPROFEN, METHYLPARABEN AND PROPYLPARABEN BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Josef Balcar

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Analytical Chemistry, Heyrovského 1203, Hradec Králové

In this study, a new micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been developed for the simultaneous analysis of ketoprofen, methylparaben and propylparaben. Separations were carried out in a fused silica capillary (50 cm × 75 μm i.d.) at 30 kV with UV detection at 200 nm. The optimal background electrolyte was 50 mM tricine buffer (pH* 8.3) containing 30 mM sodium dodecyl sulfate as a surfactant and 15 % (V/V) methanol. Rectilinear calibration ranges were 10.0 – 200 mg/100ml for ketoprofen, 0.2 – 4.0 mg/100ml for methylparaben and 0.1 – 2.0 mg/100ml for propylparaben. The MEKC method was applied to the determination of the analytes in pharmaceutical preparation. The total analysis time was <13 min.

10. ABSTRAKT

10.1. ANALÝZA KETOPROFENU, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU POMOCÍ MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRAFIE

Josef Balcar

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, Hradec Králové

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat metodu pro separaci a stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie a její aplikace na konkrétní léčivý přípravek. Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (50 cm × 75 μm i.d.) při 30 kV s UV detekcí při 200 nm. Základním elektrolytem byl 50 mM tricin (pH* 8,3), který obsahoval 30 mM dodecylsírán sodný jako surfaktant a 15 % (V/V) methanolu. Kalibrační závislost byla měřena v rozmezí koncentrací 10,0 – 200 mg/100ml pro ketoprofen, 0,2 - 4,0 mg/100ml pro methylparaben a 0,1 – 2,0 mg/100ml pro propylparaben. Celkový čas analýzy byl přibližně 13 min.

11. OBSAH

1. ÚVOD	3
2. TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	4
2.1.1. <i>Elektroforetická pohyblivost</i>	5
2.1.2. <i>Iontová pohyblivost</i>	5
2.1.3. <i>Skutečná pohyblivost</i>	5
2.1.4. <i>Efektivní pohyblivost</i>	6
2.1.5. <i>Migrační čas</i>	6
2.1.6. <i>Elektroosmotický tok (EOF)</i>	7
2.1.7. <i>Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti</i>	9
2.1.8. <i>Děje ovlivňující separaci</i>	11
2.1.9. <i>Instrumentální uspořádání</i>	13
2.1.10. <i>Aplikace kapilární elektroforézy</i>	16
2.2. MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE	16
2.2.1. <i>Pseudostacionární fáze</i>	17
2.2.2. <i>Migrace v MEKC</i>	18
2.2.3. <i>Kapacitní faktor</i>	19
2.2.4. <i>Rozlišení</i>	19
2.2.5. <i>Faktory ovlivňující separaci</i>	20
2.3. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE).....	22
2.4. KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (ITP).....	23
2.5. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE	23
2.6. KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRRAFIE (CEC)	23
2.7. MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE (MEEKC)	24
2.8. KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	24
2.9. KETOPROFEN	24
2.9.1. <i>Metody stanovení ketoprofenu</i>	25
2.10. METHYLPARBEN A PROPYLPARBEN.....	26
2.10.1. <i>Metody stanovení methylparabenu a propylparabenu</i>	27
3. CÍL PRÁCE	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	33
4.1.1. <i>Chemikálie</i>	33
4.1.2. <i>Příprava roztoků</i>	34
4.2. PŘÍSTROJE	36
4.2.1. <i>Kapilární elektroforetický systém Beckman</i>	36
4.3. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY	36
4.3.1. <i>Pracovní postup</i>	36
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	40
5.1. OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A SOUČASNÉ STANOVENÍ KETOPROFENU, METHYLPARBENU A PROPYLPARBENU	40
5.1.1. <i>Detekce</i>	40
5.1.2. <i>Volba pracovního elektrolytu</i>	40
5.1.3. <i>Vnitřní standard</i>	42
5.1.4. <i>Vliv pH*</i>	42
5.1.5. <i>Vliv koncentrace SDS</i>	43
5.1.6. <i>Vliv koncentrace základního elektrolytu</i>	44
5.1.7. <i>Vliv přídavku methanolu</i>	45
5.1.8. <i>Vliv cyklodextrinů</i>	47
5.1.9. <i>Vliv napětí</i>	48
5.1.10. <i>Vliv teploty</i>	49

5.1.11.	<i>Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření</i>	49
5.1.12.	<i>Rozlišení</i>	51
5.1.13.	<i>Účinnost separace</i>	51
5.2.	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	52
5.2.1.	<i>Kalibrační závislost pro methylparaben</i>	52
5.2.2.	<i>Kalibrační závislost pro propylparaben</i>	53
5.2.3.	<i>Kalibrační závislost pro ketoprofen</i>	54
5.2.4.	<i>Limit Detekce a limit kvantifikace</i>	55
5.3.	OPAKOVATELNOST METODY	56
5.4.	ANALÝZA HVLP	57
5.5.	OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY	59
5.5.1.	<i>Srovnání s validovanou metodou, tj. HPLC</i>	59
5.5.2.	<i>Analýza vzorku s přídavkem standardních látek</i>	60
6.	ZÁVĚRY	62
7.	LITERATURA	64
8.	SEZNAM ZKRATEK	70
9.	ABSTRACT	71
9.1.	ANALYSIS OF KETOPROFEN, METHYLPARABEN AND PROPYLPARABEN BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY	71
10.	ABSTRAKT	72
10.1.	ANALÝZA KETOPROFENU, METHYLPARABENU A PROPYLPARABENU POMOCÍ MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRAFIE.....	72
11.	OBSAH	73