

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

VYUŽITÍ ELEKTROFORETICKÝCH METOD
V ANALÝZE FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK

Dizertační práce

Chtěl bych poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za odborné vedení, rady a podporu během celého studia. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří byli této práci jakkoli nápomocni.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	12
3.1.1. <i>Instrumentace</i>	12
3.1.2. <i>Elektroforetická pohyblivost</i>	17
3.1.3. <i>Elektroosmotický tok</i>	20
3.2. ZÁKLADNÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORETICKÉ METODY	22
3.2.1. <i>Kapilární zónová elektroforéza</i>	22
3.2.2. <i>Elektrokinetická chromatografie</i>	25
3.2.3. <i>Kapilární izotachoforéza</i>	30
3.2.4. <i>Izoelektrická fokusace</i>	32
3.2.5. <i>Kapilární elektrochromatografie</i>	32
3.2.6. <i>Kapilární gelová elektroforéza</i>	33
3.2.7. <i>Nevodná kapilární elektroforéza</i>	34
3.3. PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY	35
3.3.1. <i>Stacking</i>	36
3.3.2. <i>Izotachoforetické zakoncentrování</i>	39
3.3.3. <i>Dynamic pH junction</i>	45
3.3.4. <i>Sweeping</i>	46
3.4. ELEKTROFORÉZA NA ČIPU	47
4. PRAKTICKÁ ČÁST - KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM	50
4.1. VYUŽITÍ PREKONCENTRAČNÍCH TECHNIK V KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZE	51
4.1.1. <i>Stanovení fenolických kyselin v methanolickém extraktu drogy Epilobii herba metodou on-line kombinace kapilární izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou</i>	51
4.1.2. <i>Vývoj stacking-CZE metody pro analýzu fenolických kyselin</i>	56
4.1.3. <i>Stanovení fenolických látek v methanolickém extraktu drogy Melissa herba on-line kombinací kapilární izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou</i>	60
4.2. VYUŽITÍ ELEKTROFORETICKÝCH TECHNIK VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE	64
4.2.1. <i>Stanovení polyolů v infuzních roztocích metodou kapilární zónové elektroforézy</i>	64
4.2.2. <i>Separace a stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku micelární elektrokinetickou chromatografií</i>	67
5. PŘÍLOHY	70
5.1. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	71
5.1.1. <i>Publikované články</i>	71
5.1.2. <i>Postery uvedené ve sbornících</i>	71

5.2.	PŘÍLOHA I: J. ŠAFRA, M. POSPÍŠILOVÁ, J. SPILKOVÁ, CHROMATOGRAPHIA 64 (2006), 37-43	73
5.3.	PŘÍLOHA II: J. ŠAFRA, M. POSPÍŠILOVÁ, A. KAVALÍROVÁ, J. PHARM. BIOMED. ANAL. 41 (2006), 1022-1024	81
5.4.	PŘÍLOHA IV: J. ŠAFRA, M. POSPÍŠILOVÁ, J. HONEGR, J. SPILKOVÁ, J. CHROMATOGR. A 1171 (2007) 124–132	85
5.5.	PŘÍLOHA III: M. POSPÍŠILOVÁ, M. POLÁŠEK, J. ŠAFRA, I. PETRIŠKA, J. CHROMATOGR. A 1143 (2007), 258-263	95
5.6.	PŘÍLOHA V: J. ŠAFRA, M. POSPÍŠILOVÁ, J. PHARM. BIOMED. ANAL. (PŘIJATO K RECENZI) 102	
5.7.	PŘÍLOHA VI: REPRINTY PUBLIKOVANÝCH POSTERŮ	125
6.	ZÁVĚR.....	148
7.	SUMMARY.....	151
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	154
9.	REJSTRÍK.....	157
10.	POUŽITÁ LITERATURA	162

1. Úvod

Od třicátých let 20. století, kdy byla kapilární elektroforéza představena, se stala uznávanou analytickou technikou, umožňující separaci a kvantifikaci analytů nejrůznější povahy. Za svou oblíbenost vděčí především vysoké separační účinnosti, ekonomickému a ekologickému provozu (současná instrumentace vyžaduje minimální objemy rozpouštědel a vzorku) a snadné obsluze přístrojů (v dnešní době často plně automatizovaných).

Nejčastěji využívaná elektroforetická technika – kapilární zónová elektroforéza – prošla bouřlivým vývojem během osmdesátých až devadesátých let minulého století a stala se plnohodnotnou alternativou k HPLC. To v oblasti kontroly léčiv potvrzuje i její zařazení do světově uznávaných lékopisů jako je Americký lékopis (USP 29 [1]) či Evropský lékopis (PhEur 5 [2]).

Kapilární elektroforéza v současnosti představuje více analytických technik, které lze snadno realizovat na jednom přístroji často jen pouhou změnou pracovního elektrolytu. Tyto techniky mohou být založeny na čistě elektroforetickém principu – kromě kapilární zónové elektroforézy např. kapilární izotachoforéza, kapilární izoelektrická fokusace a kapilární gelová elektroforéza. Také však může být uplatněna kombinace elektroforetického a chromatografického principu, jako je tomu např. u micelární elektrokinetické chromatografie nebo kapilární elektrochromatografie.

Popsány jsou také způsoby tandemového spojení kapilárně elektroforetických technik s jinými technikami (např. průtokovými metodami), i různých elektroforetických metod navzájem (např. spojení izotachoforézy se zónovou elektroforézou).

Díky těmto (ne zcela triviálním a standardním postupům) může být zjednodušena manipulace se vzorkem díky on-line začlenění jeho předúpravy do vlastní analýzy, jako je tomu u ITP-CZE v dvoukolonovém uspořádání. Díky možnosti tandemového spojení s moderními typy detektorů (jako je hmotnostní spektrometr) se do značné míry eliminuje jedna z největších nevýhod běžné kapilární elektroforézy, kterou je nižší citlivost UV detekce v porovnání s HPLC.

Snaha o zvýšení citlivosti je jedním ze soudobých trendů v oblasti výzkumu v kapilární elektroforéze a existuje řada způsobů, jak tohoto dosáhnout. Již zmíněné

propojení s moderními detektory s sebou přináší zvýšené pořizovací náklady. Proti tomu existují způsoby, jak vhodnou úpravou separačních podmínek docílit mnohonásobného zakoncentrování analytů během samotné separace (např. stacking, sweeping aj.). Mezi další trendy pak patří miniaturizace (koncept lab-on-chip) a výzkum v oblasti nevodné elektroforézy.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo navázat na výzkum v oblasti elektroforetických metod na Katedře analytické chemie ve farmaceutické analýze a analýze látek přírodního původu.

V práci byly během postgraduálního studia řešeny dva hlavní okruhy. První zahrnoval vývoj metod vedoucích ke zvýšení citlivosti elektroforetických technik, konkrétně kombinaci izotachoforézy se zónovou elektroforézou metodou propojení kolon, dále přechodnou izotachoforézu a využití tzv. stacking fenoménu. Uvedené techniky byly aplikovány většinou v analýze rostlinného materiálu.

V rámci druhého okruhu byly optimalizovány metody pro rutinní analýzy v oblasti kontroly chemických léčiv (kapilární zónová elektroforéza pro analýzu polyolů, micelární elektrokinetická chromatografie pro analýzu účinných látek v topickém přípravku).

3. Teoretická část

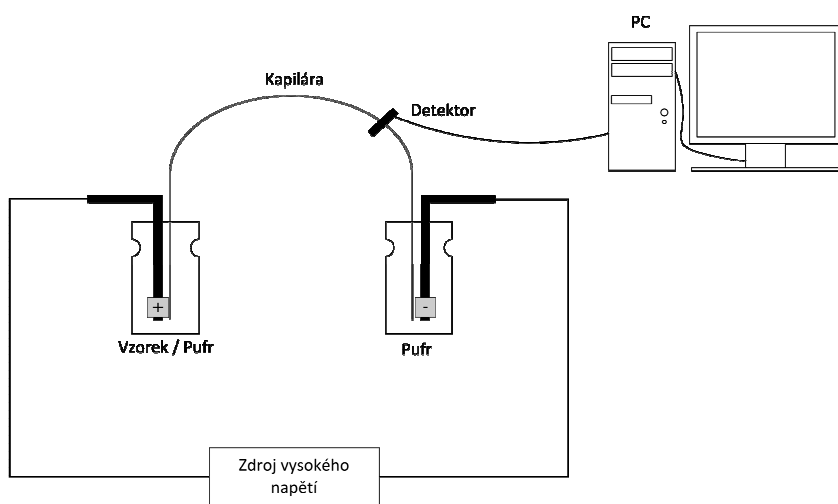
3.1. Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou separační metody založené na rozdílné pohyblivosti analyzovaných látek v elektrickém poli. Existují dvě základní provedení. První využívá jako prostředí pro migraci gel (např. z agarózy či polyakrylamidu) ve formě destičky. Toto uspořádání je široce využíváno pro separaci přírodních makromolekul (jako jsou nukleové kyseliny či proteiny), kde hraje výraznou roli jejich velikost. Přestože užití gelové elektroforézy je značné, má tento typ elektromigračních metod mnohé nedostatky, mezi které patří zejména časová náročnost analýzy a problémy s detekcí a automatizací [3].

Druhou variantou je použití kapiláry naplněné vhodným elektrolytem, v níž probíhá migrace a separace analytů. Tyto techniky se souhrnně označují jako kapilární elektroforetické metody. Jednotlivé metody jsou blíže popsány v kapitole 3.2.

3.1.1. Instrumentace

Zařízení pro kapilární elektroforézu (viz Obrázek 1) vždy obsahuje separační kapiláru, zdroj vysokého napětí, dávkovací zařízení, detektor a zařízení pro zpracování analytického signálu (v dnešní době zpravidla PC vybavené příslušným softwarem).



Obrázek 1 Schéma instrumentálního uspořádání pro kapilární elektroforézu

3.1.1.1. Zdroj vysokého napětí

Zdroj vysokého napětí zpravidla umožňuje aplikovat napětí do 30 kV (vyšší hodnoty se využívají spíše v přístrojích konstruovaných na míru). Požadavky klade-
né na zdroj vysokého napětí jsou:

- musí být konstruován tak, aby neohrozil obsluhu přístroje
- dodávané napětí musí být stabilní, aby bylo dosaženo vysoké reprodu-
kovatelnosti analýz
- pro některé pokročilejší techniky je nutné, aby umožňoval změnit bě-
hem analýzu polaritu

Elektrické pole může být vytvořeno dvojím způsobem – vložením konstantní-
ho napětí (proud se mění v závislosti na vodivosti elektrolytu) nebo vložením kon-
stantního proudu. Konstantní proud se používá tradičně v kapilární izotachoforéze,
v ostatních technikách převládá vložení konstantního napětí [4,5].

3.1.1.2. Kapilára

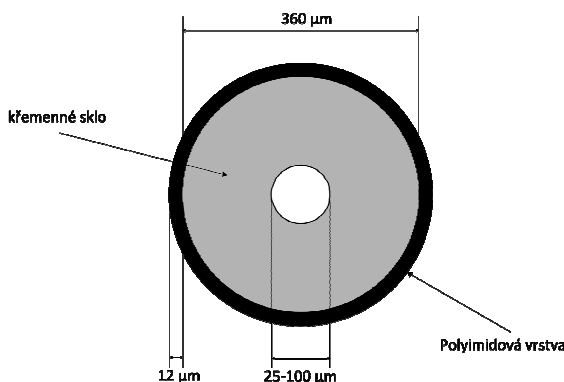
Nejčastěji používané kapiláry jsou vyrobeny z křemenného skla, které vykazuje
vysokou propustnost UV záření. Díky tomu lze kapiláry z tohoto materiálu použít
vždy, když je třeba pracovat se spektrofotometrickou detekcí.

Pro zvýšení mechanické odolnosti jsou křemenné kapiláry potaženy vrstvou
polyimidu. Ten UV záření blokuje a je třeba jej v místě průchodu paprsku odstranit.
Odstranění lze provést např. opálením pomocí zapalovače, seškrábáním ostrým
předmět nebo naleptáním pomocí kyseliny sírové. V tomto místě, které se označuje
jako detekční okno, je kapilára díky absenci polyimidového potahu křehká a náchyl-
ná k lámání. Délku kapiláry lze vyjádřit buď jako celkovou délku nebo jako tzv. efek-
tivní délku. Tou se rozumí délka od vstupního konce kapiláry po detekční okno.

Vnitřní průměr kapilár se pohybuje nejčastěji v rozmezí 25-100 μm , ale jsou vy-
ráběny i kapiláry od 2 do 700 μm .

Většina komerčních výrobců elektroforetických systémů používá speciální ka-
zety (tzv. cartridge) pro umístění kapiláry do systému. Díky tomu je usnadněna ma-

nipulace s různými kapilárami a umožněno efektivnější termostatování kapiláry [4,5]



Obrázek 2 Průřez křemennou kapilárou (překresleno podle Weinbergera [5])

Vnitřní povrch kapiláry obsahuje volné silanolové skupiny, které se ve vysokém pH ionizují a jsou původcem jevu zvaného elektroosmotický tok (viz kapitola 3.1.3). Nepokrytý vnitřní povrch kapiláry může být také příčinou adsorpce analytů (např. proteinů). Tomu lze předejít chemickou modifikací vnitřního povrchu kapiláry a takto upravené kapiláry se označují jako pokryté. Komerčně lze pořídit řadu pokrytých kapilár, lišících se použitým materiálem (např. polyvinylalkohol, polyakrylamid...) a z něj vyplývajícími vlastnostmi (použitelné rozmezí pH , inkompatibilita s některými pufrů apod.). Tyto kapiláry jsou většinou dodávány na míru, včetně již zhotoveného detekčního okna. Pokud by bylo nutné detekční okno vytvořit, nesmí být k odstranění polyimidu použitý plamen, protože by mohlo dojít k narušení vnitřního potažení kapiláry [5].

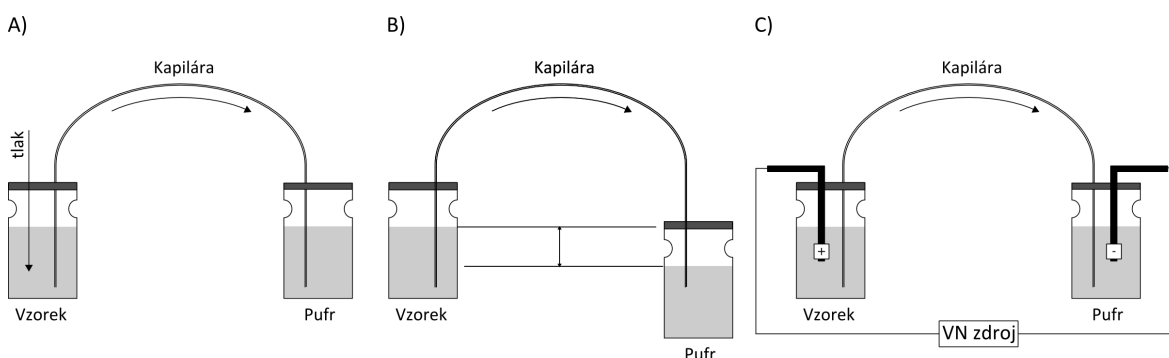
3.1.1.3. Dávkování

Pro dávkování vzorku do kapiláry (objem vzorku se pohybuje řádově v nL a neměl by překročit 1-2 % celkové délky kapiláry [6]) jsou používány dva základní způsoby.

Hydrodynamické dávkování je založeno na aplikaci tlaku na roztok vzorku, do kterého je ponořený vstupní konec kapiláry. Alternativně lze použít vakuum na výstupním konci kapiláry. Nejčastěji se používá tlak 50 mBar (odpovídá tlaku 5 kPa, většina přístrojů však vyjadřuje tlak v mBar) po dobu 5-6 sekund. Místo externího

tlaku lze využít tzv. sifonového efektu: vialka se vzorkem je zvednutá do určité výšky tak, že hladina vzorku ve vialce na vstupním konci kapiláry je výše, než hladina pufru ve vialce na konci výstupním. Tento rozdíl mezi hladinami kapalin na obou koncích kapiláry vyvolá hydrostatický tlak, který způsobí vstup vzorku do kapiláry [7].

Při elektrokinetickém dávkování se aplikuje napětí, které bývá zpravidla 3-5x nižší, než napětí použité pro separaci. Analyt do kapiláry vstoupí vlivem elektroosmotického toku a vlastní pohyblivosti. U tohoto způsobu dávkování hrozí diskriminace méně pohyblivějších iontů (nejmobilnější analyty jsou dávkovány ve větším množství, než méně pohyblivé). Výhodou jsou nižší nároky na doplňkové vybavení přístroje, použitelnost při dávkování viskózních roztoků, kde hydrodynamické dávkování selhává [4] a možnost dávkovat mnohem menší objem vzorku, než při použití hydrodynamického dávkování [7].



Obrázek 3 Způsoby dávkování v kapilární elektroforéze: A) hydrodynamické B) využití sifonového efektu C) elektrokinetické

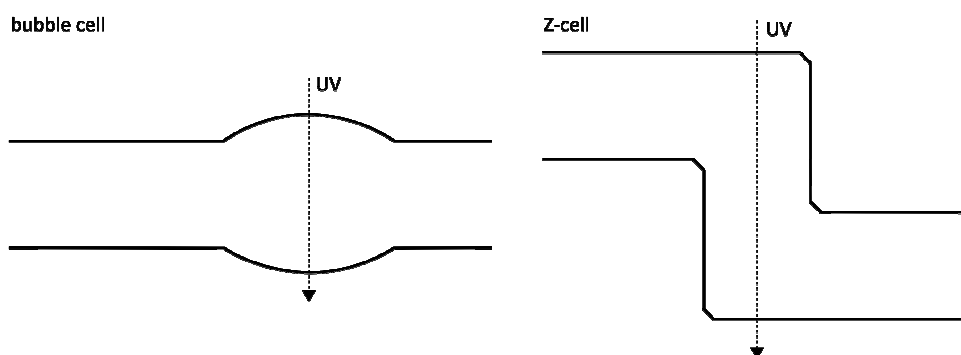
3.1.1.4. Detekce

Optická detekce

Mezi často používané detekční systémy v kapilární elektroforéze patří ty, které jsou založené na optické detekci. Tyto jsou s úspěchem využívány díky zmiňované transparentnosti křemenné kapiláry a také díky cenové dostupnosti. Největší nedostatek představuje omezená citlivost způsobená malými rozměry kapiláry (řádově μm) a malými objemy vzorku, které se dávkuje (řádově nL).

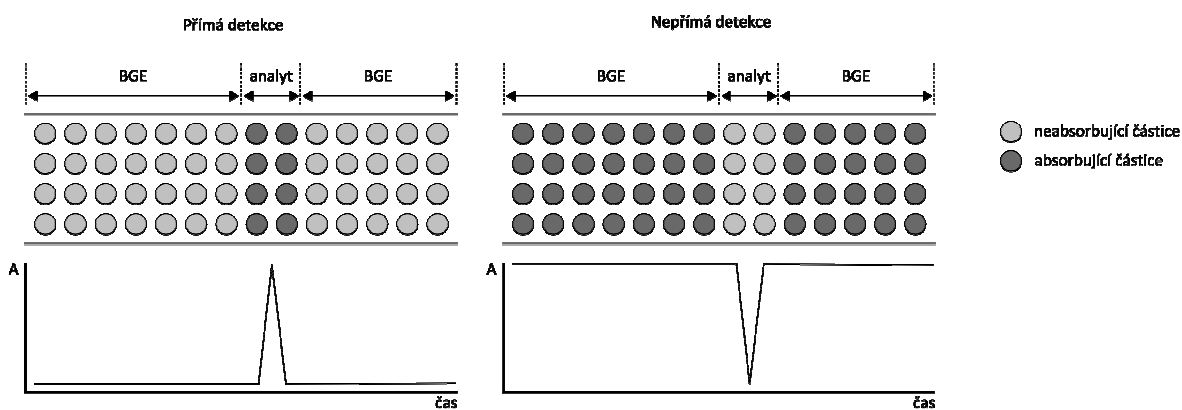
Optická detekce je nejčastěji realizovaná pomocí UV/VIS detektorů, v dnešní době často v provedení DAD. Dále se využívají detektory založené na měření konvenční či laserem indukované fluorescence. Ty jsou v porovnání s UV detekcí citlivější, ale na druhé straně vyžadují derivatizaci látek, které samy o sobě fluorescenci nevykazují.

Pro zvýšení citlivosti optické detekce lze použít kapiláry o širším vnitřním průměru (za cenu ztráty separační účinnosti) nebo úpravu kapiláry v místě detekce (detekční cely typu *bubble cell* či *Z-cell*) [4].



Obrázek 4 Typy modifikací kapiláry v místě detekce

Pro látky, které v dané oblasti neabsorbují, lze použít nepřímou detekci. Ta využívá absorbujícího iontu, který je přidán do pracovního elektrolytu a který zajišťuje absorpční pozadí. Tento ion je v místě zóny analytu nahrazen neabsorbujícími ionty analytu. To vyvolá pokles absorpce, což se na elektroforeogramu projeví jako negativní pík. Pro dosažení dostatečné citlivosti je nutné zvolit vhodně absorbující spoluion, který má současně efektivní pohyblivost srovnatelnou s pohyblivostí stanovovaného iontu. Nejvyšších citlivostí bylo dosaženo za použití nízkých koncentrací spoluiontu s vysokou absorpcí při zvolené vlnové délce [8-11].



Obrázek 5 Princip přímé a nepřímé UV detekce

Elektrochemická detekce

Elektrochemické detektory mají oproti optickým tu výhodu, že nejsou limitovány vnitřním průměrem kapiláry, lze tedy použít i velmi tenké kapiláry.

Pro univerzální detekci neabsorbujících iontů se velmi často využívají konduktometrické detektory (kontaktní či bezkontaktní) [4].

Další detekční technikou, která umožňuje překonat nižší citlivost kapilární elektroforézy, je hmotnostní spektrometrie. V současnosti se jedná o velice atraktivní techniku, jejíž stinnou stránkou je zatím stále vysoká cena a komplikované rozhraní pro připojení k elektroforetickému systému.

Z dalších detekčních technik, využívaných ve spojení s kapilární elektroforézou lze zmínit např. NMR [4].

3.1.2. Elektroforetická pohyblivost

Nabitě částice v elektrickém poli podléhají elektrostatické síle F , která je dána součinem náboje iontu q a intenzity elektrického pole E (poměr napětí a celkové délky kapiláry)

$$F = q \cdot E$$

Proti této elektrostatické síle působí třetí F' , které se dá podle Stokesova zákona vyjádřit jako

$$F' = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u_i$$

kde η je viskozita elektrolytu, r představuje poloměr iontu a u_i rychlost migrace. V okamžiku, kdy je dosaženo konstantní rychlosti se elektrostatická síla F a frikční síla F' rovnají.

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u_i$$

Migrační rychlost iontu lze vyjádřit jako

$$u_i = \mu_i \cdot E$$

Migrační rychlost (u_i) je tedy přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Konstanta úměrnosti je označovaná jako elektroforetická mobilita (μ_i). Elektroforetická mobilita v sobě zahrnuje náboj iontu, jeho poloměr a viskozitu okolního prostředí.

$$\mu_i = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Jednotkou elektroforetické mobility je $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$. Je závislá na řadě zevních faktorů, jako je teplota, použité rozpouštědlo nebo iontová síla elektrolytu. Dále závisí i na ostatních vlastnostech iontu, jako je velikost částice, její tvar a náboj [12]. Pro daný ion v daném prostředí jde o charakteristickou konstantu [13].

Pohyblivost lze vyjadřovat různými způsoby, např. jako iontovou pohyblivost, skutečnou pohyblivost nebo efektivní pohyblivost.

3.1.2.1. Iontová pohyblivost

Iontovou pohyblivostí μ_o se rozumí průměrná rychlost nabitě částice na jednotku napětí při nulové iontové síle. Tato veličina nemůže být pochopitelně měřitelná přímo a získává se extrapolací závislosti elektroforetické pohyblivosti na různých iontových silách [4,12].

3.1.2.2. Skutečná pohyblivost

Skutečná pohyblivost je pohyblivost plně nabitého iontu v roztoku s konečnou iontovou silou [12]. Je zpravidla nižší než μ_o díky vzájemným interakcím iontů v konečně zředěných roztocích.

3.1.2.3. Efektivní pohyblivost

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

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

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. 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 $(pH - pK_a)$.

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.

Efektivní mobilita bývá zpravidla nižší než teoretická elektroforetická mobilita, odráží vliv pH a iontové síly elektrolytového roztoku, jiný než přísně kulovitý tvar částice atd. [4,12,14,15].

Elektroforetickou pohyblivost nelze experimentálně přímo zjistit. Lze ji však vypočítat z migračního času t_m , což je čas potřebný pro migraci látky z místa nástřiku do detekční cely. Pokud je elektromigrace provázena hydrodynamickým tokem

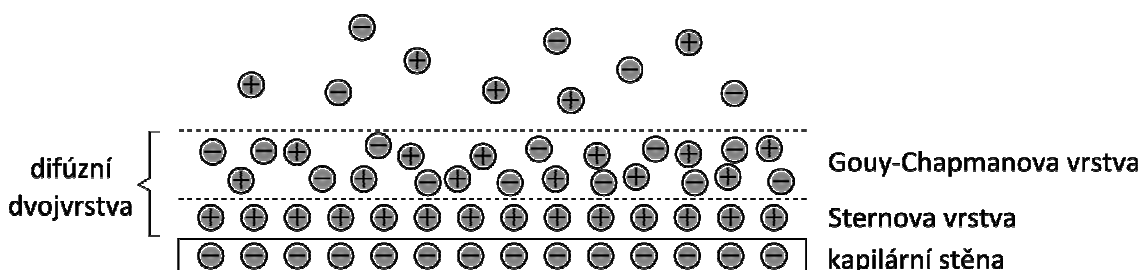
(např. důsledkem elektroosmózy), je třeba znát i migrační čas nenabitých částic t_{eof} . Elektroforetická pohyblivost se vypočte podle vztahu [13]:

$$\bar{u} = \frac{l_{tot} l_{ef}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eof}} \right)$$

l_{tot} – celková délka kapiláry [m]; l_{ef} – efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku po detektor) [m]; U – pracovní napětí [V]; t_m – migrační čas látky [s]; t_{eof} – migrační čas nenabitých částic [s].

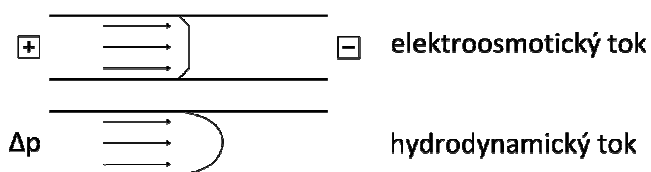
3.1.3. Elektroosmotický tok

Druhou hybnou silou v elektroforéze je elektroosmotický tok (EOF). Je vyvolán přítomností nabitých silanolových skupin na vnitřním povrchu nepokryté křemenné kapiláry. Negativní náboje těchto skupin přitahují kationy použitého elektrolytu. U stěny kapiláry tak vzniká přilehlá elektrická dvojvrstva (skládající se z nepohyblivé Sternovy vrstvy přiléhající ke kapilární stěně a Gouy-Chapmanovy difúzní vrstvy, která je mobilní) [4]. Hydratované kationy migrují směrem ke katodě a strhávají s sebou roztok v kapiláře [16].



Obrázek 6 Formování elektrické dvojvrstvy a vznik EOF

Extrémně malá šířka elektrické dvojvrstvy je příčinou plochého profilu EOF (oproti toku vzniklému např. při hydrodynamickém dávkování) [4].



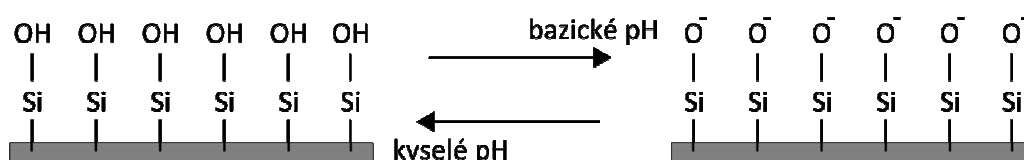
Obrázek 7 Rozdílný profil elektroosmotického a hydrodynamického toku

Velikost EOF je závislá na velikosti zeta potenciálu ζ elektrické dvojvrstvy vytvořené na rozhraní proudící kapaliny a stěny kapiláry. Rychlost EOF je dána vztahem [4]:

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4\pi\eta}$$

kde ε je dielektrická konstanta roztoku, ζ je zeta potenciál a η je viskozita. Protože ε , ζ i η závisí na mnoha vlastnostech pevných i kapalných látek, je i elektroosmotický tok ovlivněn četnými experimentálními proměnnými [4].

Mezi tyto parametry patří např. druh a koncentrace pufru (rostoucí iontová síla způsobuje kompresi dvojvrstvy, pokles zeta potenciálu a redukci EOF [3]), přídavek organického rozpouštědla a především pH (při vysokém pH , kdy jsou silanolové skupiny převážně deprotonované, je EOF značně větší než při nízkém pH , kdy jsou tyto skupiny protonizované [3]). Při $pH \sim 2$ je tok téměř nulový. Se zvyšujícím se pH se zvyšuje (díky výraznější ionizaci silanolových skupin kapilárního povrchu).



Obrázek 8 Vliv pH na ionizaci vnitřního povrchu kapiláry

Elektroosmotický tok směřuje od anody ke katodě. Již při neutrálním pH nabývá rychlosti, která převyšuje elektromigraci většiny anionů, které tak paradoxně putují ke katodě. Výsledná rychlost pohybu anionů a kationů je dána vektorovým součtem jejich migrační rychlosti a rychlosti pohybu EOF.

Neutrální částice migrují rychlostí odpovídající rychlosti EOF (tohoto se často využívá pro měření rychlosti elektroosmotického toku, např. pomocí neutrálního dimethylsulfoxidu). Anionty migrují v závislosti na velikosti náboje jako poslední. Kationty pohybující se ve směru EOF migrují nejrychleji. Tuto skutečnost vyjadřuje

koncept zdánlivé mobility, která je definovaná jako algebraický součet elektroforetické mobility a mobility elektroosmotického toku [16,4]:

$$\mu_{app} = \mu_i \pm \mu_{eof}$$

3.2. Základní kapilární elektroforetické metody

Jednou ze základních charakteristik kapilární elektroforézy je její použitelnost pro řešení celé řady analytických problémů. K tomu jí předurčuje její přizpůsobivost, která vyplývá z velkého množství různých technik založených na elektroforetických principech. Tyto techniky jsou snadno realizovatelné jednoduchou změnou složení základního elektrolytu (background electrolyte, BGE).

Jednotlivé elektroforetické metody lze rozdělit na základě separačního média (vodné a nevodné) a principu separace (čistě elektroforetické techniky a techniky kombinující elektroforetické a chromatografické principy) [4].

V teoretické části je důraz kladen především na metody, které byly využity při řešení problematiky (kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie a izotachoforéza), ostatní jsou zmíněny spíše informativně.

3.2.1. Kapilární zónová elektroforéza

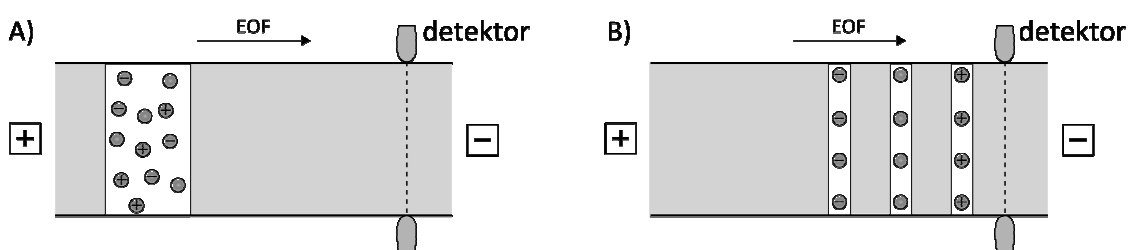
Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejpoužívanější elektroforetickou technikou, především díky své univerzálnosti, jednoduchosti a separační účinnosti. Jako určitou limitaci lze spatřovat použitelnost pouze pro nabitě analyty, neutrální nemohou být separovány [4].

Separace v CZE probíhá v homogenním elektrolytovém prostředí (BGE) – elektrolyty v rezervoárech na obou koncích kapiláry jsou stejné. Iontové sloučeniny jsou separovány do úzkých, oddělených zón (za předpokladu, že jsou jejich mobility a z nich vyplývající migrační rychlosti dostatečně odlišné) [5]. Pokud je v systému dostatečně silný EOF, lze současně stanovit kationy i aniony [4].

Elektroforetické pohyblivosti analytů mohou být snadno ovlivňovány změnou parametrů základního elektrolytu, zejména *pH*, iontové síly a složení (ve smyslu

přídavku různých aditiv). Tyto změny ale zároveň ovlivňují i EOF a optimalizace tak může být ztížena [4].

Rozdělené zóny si nezachovávají původní šířku a ostré ohraničení. Vlivem difúze se s časem rozšiřují a jejich konce ztrácí na ostroty. Tak se koncentrace v zónách snižuje a stává se nerovnoměrnou (uprostřed zóny je maximální, směrem ke krajům klesá), což je pro separaci jev nepříznivý [15].



Obrázek 9 Princip separace v CZE; A) začátek analýzy B) konec analýzy a prostorově oddělené analyty

3.2.1.1. Děje ovlivňující separaci

Separace v CZE je ovlivněna řadou dějů. Jeden z nejvýznamnějších dějů, EOF, byl podrobně rozebrán v kapitole 3.1.3. Mezi další patří elektromigrační disperze, Jouleův ohřev a sorpce.

Elektromigrační disperze

Rozdíl v pohyblivostech analytu a iontu pracovního elektrolytu způsobuje asymetrii elektroforetického píku. Má-li analyt větší pohyblivost, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Pokud ionty na jeho čelním rozhraní opouští difúzní zónu, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší, než by odpovídalo pouhému vlivu prosté difúze. Pokud ionty ze zadního rozhraní opustí zónu, jsou urychleny a vráceny zpět. Zadní rozhraní se tak zaostřuje.

Podobným způsobem vzniká asymetrie při migraci analytu pomalejšího než ion pracovního elektrolytu. Zóna iontu o stejné pohyblivosti jako ion pracovního elektrolytu, není elektromigrační disperzí ovlivněna [13].

Elektrodisperzi lze omezit [5]:

1. naředěním vzorku (z důvodu snížení citlivosti nelze vždy v praxi využít)
2. zvýšením koncentrace BGE (nelze použít u nepřímé detekce; určitá limitace spočívá také ve vysokém Jouleově teple, které je generováno)
3. volbou elektrolytu, jehož mobilita je blízká mobilitě analyzovaných látek (jde o efektivní způsob postrádající nedostatky předchozích dvou; v praxi však nelze sladit mobilitu spoluiontu s mobilitou *všech* analytů ve vzorku, která se musí z principu lišit)

Vedle rozdílných pohyblivostí lze pozorovat vliv dalších dějů na disperzi. Patří se např. Jouleův ohřev, sorpce na stěnu kapiláry, různé migrační vzdálenosti způsobené ohybem kapiláry [7].

Jouleův ohřev

Průchod elektrického proudu má za následek tvorbu Jouleova tepla [13]. Toto teplo vzniká jako důsledek tření mezi migrujícími ionty a molekulami pufru [5].

Zvýšení teploty vede ke zvýšené pohyblivosti. Případným chlazením vzniká v kapiláře teplotní gradient (střed vykazuje nejvyšší teplotu). Tento jev se projeví rozšířením zóny [13]. Vlivem zahřívání obsahu kapiláry může dojít až k varu elektrolytu a narušení elektrického okruhu vlivem vznikajících bublinek [5]. To může vyústit v předčasné ukončení analýzy nebo výskytu falešných píků na elektroforeogramu.

Moderní přístroje se snaží vliv Jouleova ohřevu minimalizovat různě provedeným aktivním chlazením (větráčkem [17], umístěním kapiláry do uzavřeného okruhu s chladicí kapalinou [18] atd.).

Sorpce

Interakce pozitivně nabitých iontů se stěnou kapiláry má negativní dopad na separační účinnost. Může tak dojít k absenci píku (v případě úplné sorpce), asymetrii a chvostování píků. Sorpci lze předejít tvorbou ochranného filmu na stěně kapiláry [13]. Ochranná vrstva může být realizována přidávkem vhodného aditiva do BGE nebo chemickou modifikací kapilární stěny [4].

Difúze

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré ohraničení.

3.2.1.2. Využití CZE

CZE je obecně využívána pro separaci látek iontové povahy, s malou molekulovou hmotností a dostatečnou rozpustností ve vodě. Do základního elektrolytu mohou být začleněna různá aditiva, jako jsou organická rozpouštědla, povrchově aktivní látky o koncentraci nižší, než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC), komplexující a další látky, které umožňují modifikovat selektivitu a dále rozšiřují aplikační možnosti této techniky.

CZE má značné využití v oblasti biochemických analýz, zejména pro separaci peptidů a proteinů. Dále je tato technika úspěšně využívána v oblasti životního prostředí ke stanovení nejrůznějších polutantů (herbicidy, fungicidy, insekticidy...).

Kapilární zónovou elektroforézu lze úspěšně využít v oblasti léčiv a jejich metabolitů (včetně chirálních separací). Je třeba také zmínit analýzu anorganických iontů v nejrůznějších matricích [4].

3.2.2. Elektrokinetická chromatografie

Elektrokinetická chromatografie (EKC) představuje techniku kombinující elektroforetické a chromatografické principy. Je charakteristická tím, že do separačního elektrolytu vnáší pseudostacionární fázi. Přestože byla původně vyvinutá pro analýzu neutrálních látek, je v dnešní době používána i pro analýzu látek nabitých, kde významně ovlivňuje selektivitu separace.

V EKC mohou nenabitě analyty migrovat buď rychlostí EOF nebo rychlostí pseudostacionární fáze. Skutečná rychlost vyplývá z rozdělování analytu mezi dvě fáze – vodnou a pseudostacionární. Protože pseudostacionární fáze je také pohyblivá (není stacionární v pravém slova smyslu), analyty se pohybují i v případě, že jsou plně inkorporovány do této fáze.

Poměr migrační rychlosti mobilní fáze k pozorované migrační rychlosti pseudostacionární fáze hraje důležitou roli v rozlišení píků a kapacitě systému. Tento poměr je označován jako eluční okno.

Existují dvě techniky uplatňující principy EKC – MEKC a MEEKC. Liší se typem pseudostacionární fáze, která je použita [4].

3.2.2.1. Micelární elektrokinetická chromatografie

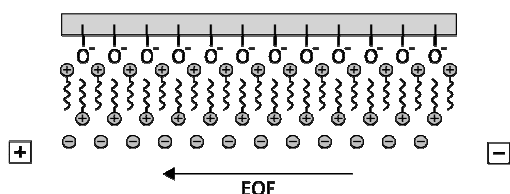
Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) využívá stejné instrumentace jako CZE. Pseudostacionární fáze může tvořena surfaktanty nebo tzv. polymerními fázemi [16].

Surfaktanty

Surfaktanty jsou molekuly obsahující dlouhé hydrofobní řetězce a polární skupiny. Při překročení tzv. kritické micelární koncentrace (CMC), která je pro každý surfaktant charakteristická, začnou vznikat útvary označované jako micely. Kromě CMC je pro každý surfaktant charakteristické také tzv. agregační číslo, které vyjadřuje, kolik molekul surfaktantu se na tvorbě micely účastní. Surfaktanty lze rozdělit na kationické, anionické, neionogenní a amfoterní [5].

Kationické surfaktanty

Tento typ surfaktantů většinou interaguje s negativně nabitými silanolovými skupinami na vnitřním povrchu kapiláry. To vede k obrácení EOF a separace tak musí probíhat při reverzní polaritě (nástřik se realizuje na katodickém konci kapiláry). K obrácení toku dochází již při nižších koncentracích, než je CMC.



Obrázek 10 EOF otočený pomocí kationického surfaktantu.

Změna velikosti alkylového řetězce neovlivňuje změnu EOF, ale modifikuje mobilitu micel. Delší alkylové řetězce vedou k užšímu elučnímu oknu [19].

Typickým příkladem může být CTAB.

Anionické surfaktanty

Délka řetězce surfaktantu ovlivňuje hydrofobicitu vznikajících (záporně nabitých) micel. Ty migrují proti EOF k anodě. Surfaktanty s alkylovým řetězcem kratším než osm uhlíků nejsou příliš využívány kvůli vysoké hodnotě CMC. Jejich použití jako ion-párových aditiv ale často vede ke změně selektivity [20]. Surfaktanty s alkylovým řetězcem delším než 14 uhlíků vykazují omezenou rozpustnost [21].

Nejpoužívanějším surfaktantem v MEKC je dodecylsírán sodný (SDS; délka alkylového řetězce – 12 uhlíků) [22]. Jeho značná použitelnost je dána jeho vysokou rozpustností ve vodě, nízkou CMC, nízkou absorpcí v UV oblasti a příznivou cenou.

K anionickým surfaktantům dále patří např. soli žlučových kyselin (kyselina cholová, deoxycholová, taurocholová...). V porovnání s SDS mají rozdílné agregační vlastnosti i strukturu micel.

Aniontové micely jsou přitahovány směrem k anodě, v nepotažené kapiláře tedy proti směru EOF. EOF je v neutrálním nebo bazickém prostředí silnější než migrační rychlost micel a ve výsledku proto migrují ke katodě [7].

Neionogenní a amfoterní surfaktanty

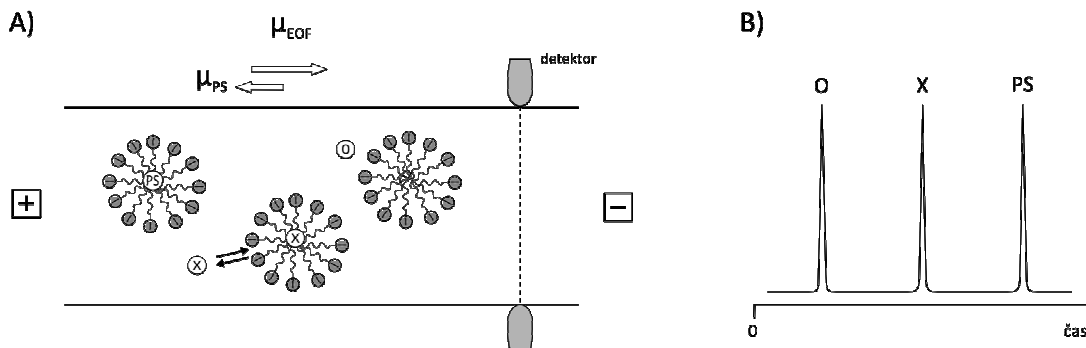
Tyto surfaktanty vytváří elektroforeticky nepohyblivé micely. Nelze je proto použít pro separaci neutrálních analytů [4]. Jejich použití spočívá v tvorbě tzv. směsných micel s nabitými surfaktanty. Mezi neionogenní surfaktanty patří např. Triton X-100, Tween 20, Tween 80 nebo Brij 35.

Iontové surfaktanty tvoří nabité micely, které migrují buď s EOF nebo proti němu v závislosti na náboji. Rychlost migrace nabitých micel v elektrickém poli je úměrná hustotě jejich náboje. Separace neutrálních analytů je dána distribucí mezi vodnou a micelární fází.

Tzv. „eluční okno“ v MEKC je definováno hraničním chováním analytů. Neutrální 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 migrují při t_{eof} .

Druhý případ je charakterizován migrací 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} .

Selektivita může být zvýšena užitím organických modifikátorů, smíšených micel nebo modifikací stěn kapiláry [7,23].



Obrázek 11 A) schématické znázornění MEKC: PS ... plně zadržovaný analyt, X ... částečně zadržovaný analyt, O ... nezadržovaný analyt B) eluční pořadí analytů (překresleno podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

Polymerní pseudostacionární fáze

Společným rysem této skupiny látek je, že obsahují kovalentní vazby. Jejich výhodou je stabilita v přítomnosti vyšších koncentrací organických modifikátorů. To je užitečné např. u separace vysoce hydrofobních analytů, které silně interagují s micelami.

Patří sem polymerní micely (monomerní surfaktanty, které jsou kovalentně svázány), kaskádovité makromolekuly (s dendritickou strukturou) nebo iontové blokové kopolymery.

Popsáno bylo např. použití polymerních micel 10-undecenylátu sodného (SUS) pro separaci derivátů benzenu a naftalenu [7,24], dendrimerů alkylovaného polyamidoaminu (PAMAM-SBDs) [7,25] nebo iontových blokových kopolymerů butylakrylátu a methakrylátu kyseliny metakrylové pro analýzu derivátů benzenu a naftalenu [7,26].

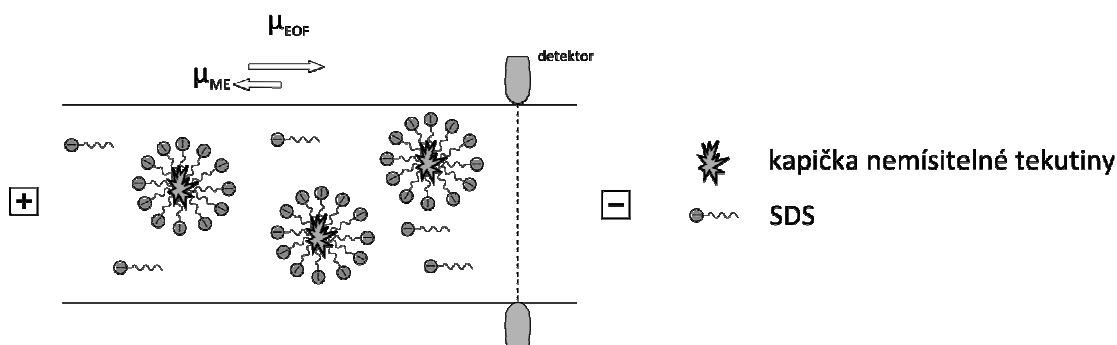
3.2.2.2. Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie

Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) je elektromigrační technika, která umožňuje separaci nabitých i nenabitých analytů. Analyty jsou separovány v tzv. mikroemulzních pufrech.

Mikroemulze jsou roztoky obsahující dispergované nanometrové kapičky nemísitelné kapaliny. Typicky jsou používány mikroemulze typu olej ve vodě. Olej a voda jsou zcela nemísitelné díky vysokému povrchovému napětí mezi oběma fázemi. Pro stabilizaci systému musí být toto napětí sníženo. V MEEKC se k tomuto účelu používá různých surfaktantů a co-surfaktantů [4]. Mikroemulze jsou průhledné a termodynamicky stabilní (díky stabilizujícímu vlivu co-surfaktantu).

Použité surfaktanty mohou být anionické (SDS, soli žlučových kyselin), kationické (CTAB), popř. neutrální (Triton X-100) – samostatně i v kombinaci s jinými tenzidy.

Jako co-surfaktant se lze použít např. n-hexan, n-heptan, n-oktan, diethylether, cyklohexan, chloroform a další [4,27,28,29].



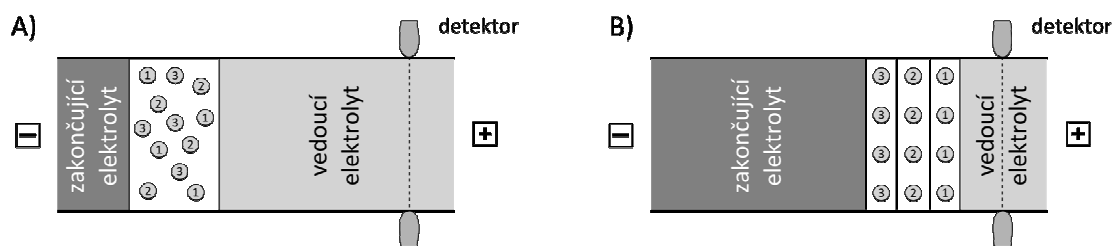
Obrázek 12 Schématické znázornění MEEKC; μ_{EOF} ... mobilita toku, μ_{ME} ... mobilita mikroemulze (překresleno podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

3.2.3. Kapilární izotachoforéza

Kapilární izotachoforéza (ITP) je technika, při které se vytváří pohyblivé rozhraní mezi dvěma elektrolyty. Kombinací dvou elektrolytových systémů vzniká diskontinuální systém bez elektroosmotického toku, ve kterém se všechny oddělené zóny pohybují stejnou rychlostí. Tyto zóny jsou sevřeny tzv. vedoucím (leading electrolyte, LE) a koncovým elektrolytem (terminating electrolyte, TE) [3,30].

Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí ion a protiion. Vedoucí ion má větší efektivní pohyblivost než všechny analyzované složky vzorku. Koncový elektrolyt pak obsahuje tzv. koncový ion, který musí mít efektivní pohyblivost menší než kterákoli ze sledovaných složek vzorku.

Zónami prochází stejný proud, proto od vedoucího iontu ke koncovému vzrůstá intenzita elektrického pole. S tím souvisí tzv. samozaostřující efekt ITP. Ten způsobuje, že jednotlivé zóny se navzájem dotýkají svými rozhraními, která zůstávají ostrá. Pokud například vedoucí iont vstoupí do zóny pomalejšího analytu, vzroste díky vyšší intenzitě elektrického pole jeho migrační rychlost a v důsledku toho se tento ion navrátí do své zóny. Obdobně pak bude pomalejší ion po průniku do rychlejší zóny zpomalen. Izotachoforetická rozhraní proto nejsou rozmývána vlivem difúze [13].



Obrázek 13 Princip aniontové izotachoforézy; A) začátek analýzy B) konec analýzy

Rozdílná intenzita pole se projevuje také na koncentračních poměrech. Všemi zónami protéká proud stejné intenzity. Podle Ohmova zákona odpor v zónách narůstá úměrně narůstajícímu spádu napětí:

$$I = konst = \frac{E}{R}$$

Aby tato podmínka mohla být splněna, upravují se v systému samovolně koncentrace v zónách tak, že vyhovují tzv. regulační funkci (Kohlrausch, 1897).

$$\omega(x) = \sum_{i=1}^s \frac{c_i Z_i}{\mu_i}$$

Podle ní je součet podílů koncentrace a pohyblivosti v ustáleném stavu ve všech zónách konstantní. Každá zóna adaptuje svou koncentraci stejným mechanismem na předcházející zónu. Koncentrace je v každé zóně konstantní a nezávisí na dávkovaném množství [7,15].

Minoritní komponenty vzorku mohou být tedy izotachoforézou zakoncentrovány až o několik řádu. Z důvodu zakoncentrování vzorků je vhodné užití izotachoforézy v kombinaci s CZE [13].

Výstup z izotachoforézy se nazývá izotachoforeogram a poskytuje jak kvalitativní, tak kvantitativní informaci o vzorku.

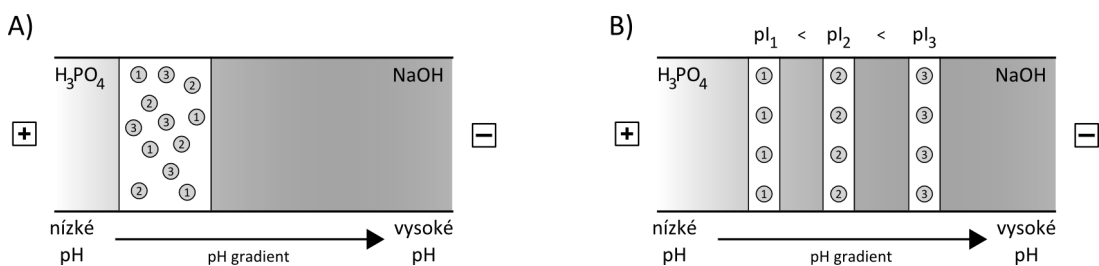
V současnosti se již samostatná ITP příliš nevyužívá. Velmi rozšířená byla především před osmdesátými léty dvacátého století [4]. Dnes je často součástí kombinovaných technik, které využívají jejich zaostřujících a zakoncentrujících schopností (viz kapitola 3.3.2).

3.2.4. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) je metoda používaná k separaci peptidů, proteinů, aminokyselin a dalších látek amfoterního charakteru. Separace není založená na rozdílných pohyblivostech jednotlivých analytů, ale na rozdílných hodnotách izoelektrického bodu pI .

Pro realizaci IEF je nutné vytvořit v kapiláře pH gradient. Toho se dosahuje použitím roztoků amfolytů. Po vložení elektrického pole je pH gradient ustanoven od anody (nízké pH) ke katodě (vysoké pH). Jednotlivé analyty se pohybují v systému až do okamžiku, kdy dosáhnou místa s hodnotou pH ekvivalentní jejich pI . Zde ztratí svůj náboj, jejich pohyb se zastaví a analyty vytvoří úzkou ostrou zónu. Pokud by molekula analytu difúzí z této zóny vymigrovala, získala by náboj a z něj vyplývající pohyblivost, která by molekulu vrátila zpátky do zóny.

Po ukončení separace je nutné analyty mobilizovat směrem k detektoru. Toho lze dosáhnout různými způsoby, např. hydrodynamickým tlakem, elektroforetickou mobilizací aj. [4].



Obrázek 14 Schematické znázornění IEF; A) začátek analýzy B) konec analýzy

3.2.5. Kapilární elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je další technikou (vedle EKC), která kombinuje elektroforetické a chromatografické principy. Analýza probíhá v křemenné kapiláře naplněné stacionární fází, pohyb mobilní fáze je zajištěn EOF. Velikost elektroosmotického toku nesouvisí s velikostí částic stacionární fáze a lze tedy použít menší částice sorbentu. Díky plochému profilu EOF se také snižuje disperze.

Separace je založena na rozdílných interakcích molekul se stacionární fází. Jsou-li analyty nabité, podílí se na jejich separaci také jejich elektroforetická pohyblivost.

Jako mobilní fáze se nejčastěji používá směs rozpouštědla (methanol, acetonitril...) v pufru. Kapiláry jsou obvykle plněny oktadecylsilanovou fází, méně často C8 fází. Nemodifikované silanolové skupiny těchto fází se také mohou ionizovat a podílet na tvorbě EOF.

Dále se používají tzv. monolitické kolony. Jako stacionární fáze se v tomto případě nejčastěji používá polybutylmethakrylát sesíťovaný ethylendimethakrylátem nebo polystyrén sesíťovaný divinylbenzenem [7,31-33].

3.2.6. Kapilární gelová elektroforéza

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) kombinuje klasickou gelovou elektroforézu s kapilární zónovou elektroforézou. V CGE je kapilára naplněná gelem (s definovanou velikostí pórů), který hraje roli molekulárního síta. Separace je založena na rozdílných mobilitách i velikostech analytů (malé, mobilnější analyty projdou sítím rychleji a velké, pomalejší analyty projdou pomaleji).

Díky použití gelu lze omezit difúzi analytů, jejich adsorpci na kapilární stěnu a také může dojít k omezení EOF, což může být v případě neutrálních analytů nevýhoda.

Používané gely lze rozdělit do dvou skupin. „Chemické gely“ jsou vysoce stabilní a jsou chemicky navázané na kapilární stěnu. Tyto gely mají dobře definovanou velikost pórů, která se po polymeraci již nemění, nejsou vyměnitelné, obvykle vykazují vysokou viskozitu. Jejich efektivita je vyšší oproti druhé skupině gelů.

„Fyzikální gely“ vykazují relativně nízkou viskozitu, nejsou navázané na kapilární stěnu a díky tomu mohou být v rámci jedné kapiláry vyměnitelné. Jsou tvořeny přidávkem hydrofilního polymeru do základního elektrolytu v určité koncentraci. Obvykle vykazují nižší účinnost, ale jsou odolné vůči vyšším teplotám.

Příkladem chemického gelu může být akrylamid síťovaný bisakrylamidem. Jako fyzikální gely se používají např. lineární polyakrylamid, polyethylenglykol, polyvinylalkohol a další [4].

3.2.7. Nevodná kapilární elektroforéza

Nevodná kapilární elektroforéza (NACE), která využívá nevodných elektrolytových systémů, je technika, která má velký potenciál v analýze látek nerozpustných nebo nestabilních ve vodě.

Organická rozpouštědla používaná v NACE ovlivňují vlastnosti analytů i složek pracovního elektrolytu. Výběrem vhodného rozpouštědla lze dosáhnout selektivity, která by ve vodném prostředí byla obtížně dosažitelná. Je to dáno rozdílnými hodnotami pK_a kyselin a bazí ve vodném a nevodném prostředí. Změny pK_a analytů vedou ke změně jejich elektroforetických mobilit (např. nahrazení vody methanolem nebo acetonitrilem zvyšuje jejich pK_a).

NACE využívá velmi odlišných fyzikálních vlastností nevodných rozpouštědel pro kontrolu EOF a migraci analytů. Rozpouštědla v NACE musí splňovat některé předpoklady:

- musí rozpouštět analyty a také jednotlivé konstituenty pracovního elektrolytu
- měla by být netoxická a nepříliš reaktivní
- měla by být ekonomicky dostupná v potřebné čistotě
- při laboratorní teplotě by měla být v kapalném stavu
- měla by mít vysokou relativní permitivitu (dielektrickou konstantu, ϵ), nízkou viskozitu (η) a nízký tlak par (ρ)

Relativní permitivita je zásadní vlastností rozpouštědla pro NACE, protože popisuje sílu interakcí mezi ionty a rozpouštědlem. Většina nevodných rozpouštědel má ϵ větší než 30, která zajišťuje plnou nebo dostatečnou disociaci iontů elektrolytů. Rozpouštědla, která mají ϵ menší než 10, lze použít pouze ve směsi s rozpouštědlem s vyšší permitivitou.

Dalším důležitým parametrem použitého rozpouštědla je jeho dynamická viskozita, která ovlivňuje mj. laminární tok v kapiláře. Rozpouštědlo s nízkou dynamickou viskozitou vede k vyšším mobilitám solvatovaných iontů a tím se zkracuje čas analýzy. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla v NACE patří methanol a acetonitril, jako příklad elektrolytu lze zmínit pufr tvořený kyselinou octovou a octanem amonným [4,34].

3.3. Prekoncentrační techniky

Značnou nevýhodou kapilární elektroforézy je malá citlivost, zejména v případě UV detekce. Ta je dána úzkým vnitřním průměrem kapiláry, který je nutný pro omezení elektromigrační disperze, a malými dávkovanými objemy (v klasické kapilární elektroforéze se dávkuje přibližně 1 % celkového objemu kapiláry). Vývoj postupů zvyšujících citlivost kapilární elektroforézy patří mezi hlavní výzkumné priority.

Citlivost lze zvýšit různými způsoby. Patří sem například použití vysoce citlivých detekčních technik (např. laserem indukované fluorescence, elektrochemických detektorů nebo hmotnostní spektrometrie), použití chemické derivatizace nebo kapiláry se speciálně upravenou detekční celou (Z cela, bublinová cela). Dalším způsobem je zakoncentrování vzorku pomocí off-line technik jako je SPE apod. Tyto techniky jsou však obtížně automatizovatelné, časově náročné a vnášejí do analýzy větší míru variability [4].

Účinnějším způsobem zvýšení citlivosti je on-line zvýšení hmoty analytu v jeho zóně během elektromigrace. Tento způsob spočívá v nadávkování většího objemu naředěného vzorku a jeho následném zakoncentrování přímo v kapiláře použitím vhodné techniky.

Je-li prekoncentrace zapříčiněna elektromigračním chováním analytů, označuje se tento způsob zakoncentrování jako *stacking*. Zakoncentrování umožněné chromatografickým chováním analytů v MEKC se označuje jako *sweeping*. Dále se využívá zakoncentrujících vlastností izotachoforézy, kterou lze spojit např. se zónovou elektroforézou.

3.3.1. Stacking

Základní podmínkou pro realizaci stackingu je nízká vodivost matrice analyzovaného vzorku, která způsobuje, že intenzita elektrického pole je v zóně vzorku vyšší, než ve zbytku kapiláry a ionty v ní migrují rychleji. Jakmile ionty překročí rozhraní mezi vzorkem a separačním elektrolytem, jejich migrace se zpomalí vlivem nižší intenzity elektrického pole. Takto se analyty zakoncentrují do úzké zóny. Tento mechanismus se uplatňuje jak pro pozitivně, tak negativně nabitě částice [35].

Podle způsobu realizace lze rozdělit stacking do několika podskupin.

3.3.1.1. Zakoncentrování vzorku zesílením pole

Zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS) je jedna z často používaných technik prekoncentrace. Její podstata spočívá v hydrodynamickém nadávkování delší zóny vzorku rozpuštěného v málo koncentrovaném elektrolytu. Kapilára je naplněna BGE o vyšší koncentraci. Při vložení napětí dochází díky odlišným vodivostem na rozhraní zón BGE a vzorku k zakoncentrování.

Délka zakoncentrované zóny (l_{stack}) je určena vztahem

$$l_{stack} = l_{inj} \frac{1}{\gamma},$$

kde l_{inj} představuje délku původní zóny vzorku. Faktor zkrácení zóny γ je určen vztahem

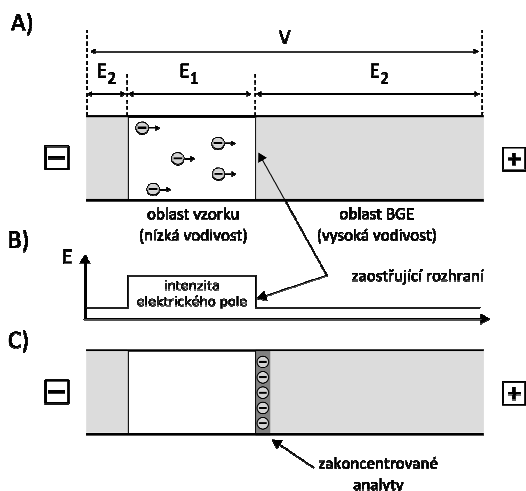
$$\gamma = \frac{E_s}{E_{BGE}} = \frac{v_{BGE}}{v_s},$$

kde E_s a E_{BGE} představují intenzitu elektrického pole v zóně vzorku, resp. základního elektrolytu.

Vlastní separace po zakoncentrování probíhá jako klasická CZE. Tento přístup umožňuje dávkování zóny vzorku optimální délky, tj. max. 1-2 % celkového objemu kapiláry. V opačném případě dochází ke ztrátě separační účinnosti.

Obvykle je touto technikou dosahováno přibližně desetinásobného zakoncentrování.

Tento způsob zakoncentrování se někdy označuje také jako NSM (normal stacking mode) [4,7,36,37].

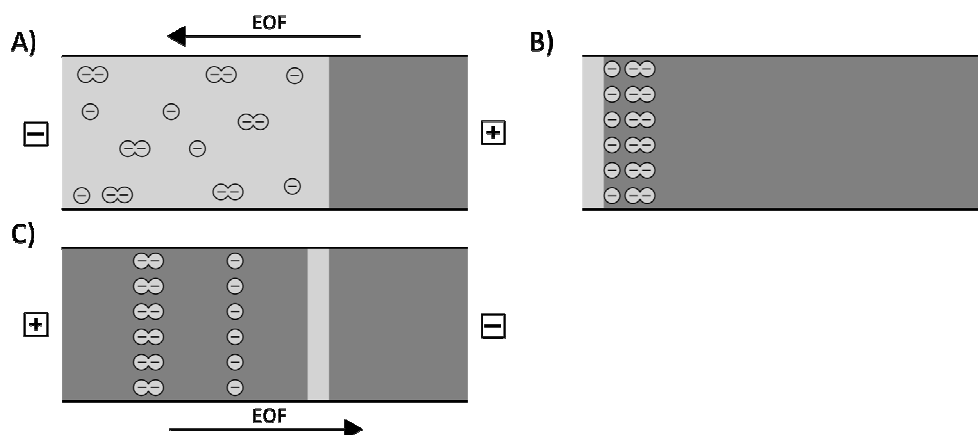


Obrázek 15 Obecný princip FASS: A) zóna vzorku o nízké koncentraci a vysokém odporu nadávko-
 vaná do kapiláry naplněné BGE s velkou iontovou silou a vysokou vodivostí; B) profil intenzity elek-
 trického pole v kapiláře; C) po aplikaci vysokého napětí jsou analyty zakoncentrovány na zaostřují-
 cím rozhraní (překresleno podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

3.3.1.2. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu

V této technice (LVSS) je dávkované množství vzorku větší, než optimální dél-
 ka zóny vzorku v FASS (tj. více než 1-2 % celkového objemu). Přebytečná matrice
 musí být odvedena z kapiláry. Toho lze dosáhnout např. aplikací reverzní polarity
 bezprostředně po nástřiku vzorku. Matrice se tak odstraňuje z kapiláry a analyty se
 koncentrují ve formě úzké zóny na počátku kapiláry.

Během prekoncentrační fáze je nutné pečlivě sledovat proud, aby se předešlo
 ztrátě vzorku. Postupný nárůst elektrického proudu je způsoben nahrazováním ma-
 trice vzorku pracovním elektrolytem. Když hodnota proudu dosáhne hodnoty blízké
 hodnotě pozorované u měření s kapilárou naplněnou separačním elektrolytem, je
 polarita změněna a dále již separace probíhá klasickým způsobem [4,7].



Obrázek 16 Schéma LVSS s přepnutím polarity; A) na začátku analýzy je aplikována reverzní polarita na kapiláru naplněnou z velké části zředěným vzorkem B) po dosažení 90-95% původní hodnoty proudu je vysoké napětí vypnuto C) po aplikaci vysokého napětí v normální polaritě probíhá separace (překresleno podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

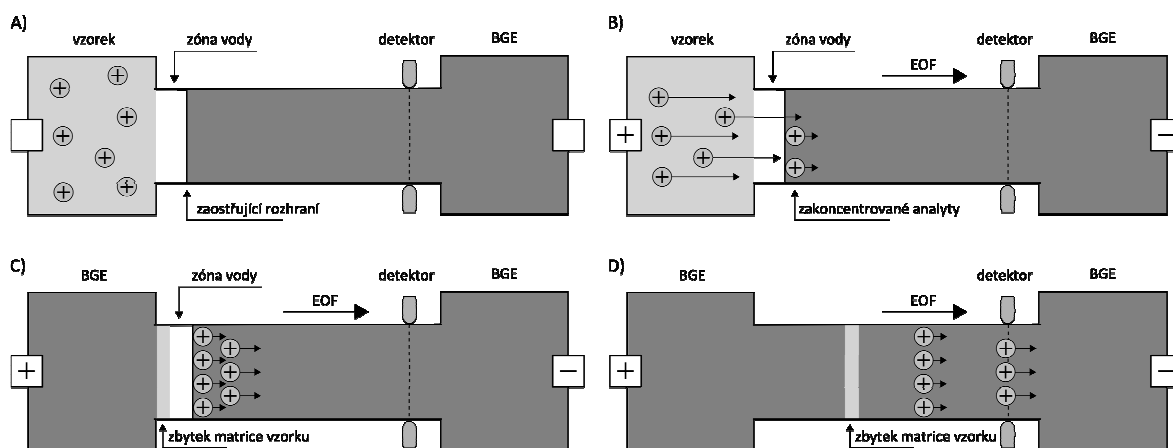
3.3.1.3. Zakoncentrování vzorku s využitím elektrokinetického dávkování

Zakoncentrování vzorku s využitím elektrokinetického dávkování (FASI) je založeno na nadávkování úzké zóny vody následované elektrokinetickým dávkováním vzorku o nízké vodivosti. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při analýze kladně nabitých hydrofobních látek.

Vysoká intenzita elektrického pole v zóně vody urychluje migraci kationtů směrem k rozhraní voda-BGE. Po překročení tohoto rozhraní se analyty zpomalují a zakoncentrovávají. Pro zakoncentrování aniontů musí být použita reverzní polarita.

Pokud je EOF v opačném směru k migraci analyzovaných iontů, je nutné, aby byla jeho rychlost menší, než rychlost migrace analytů.

Zakoncentrování pomocí FASI vede k vyšší citlivosti detekce než u hydrodynamického dávkování, u kterého je velikost nástřiku limitována délkou kapiláry. Dosažená citlivost je srovnatelná s LIF detekcí (tzn. že lze pracovat s nanomolárními koncentracemi) [4,7].



Obrázek 17 Princip FASI kladně nabitých částic A) nadávkování úzké zóny vody na inlet kapiláry B) vložení vysokého napětí na elektrody a elektrokinetické dávkování C) záměna vzorku na inletu za separační pufr D) separace zakoncentrovaných analytů

3.3.1.4. Zakoncentrování zprostředkované pH

U FASS, LVSS a FASI je nutné dávkovat analyty rozpuštěné ve vodě nebo zředěném BGE, aby měl dávkovaný vzorek nízkou vodivost. Reálné (např. biologické) vzorky musí být proto silně naředěné, aby je bylo možné dávkovat a následně zakoncentrovat. Toto omezení lze obejít pomocí techniky on-line „titrace“ nadávkovaného vzorku a tím vytváření nízkovodivostní zóny přímo v kapiláře. Tato technika se označuje jako zakoncentrování zprostředkované *pH* [4].

Nejprve je elektrokineticky nadávkován biologický vzorek s velkou iontovou silou a poté zóna silné kyseliny, např. HCl. Protony z této zóny rychle migrují do zóny vzorku, dochází k jeho neutralizaci a tím ke vzniku zóny s neutrálním *pH*. V dané zóně vznikne elektrické pole o vysoké intenzitě, analyty jsou urychleny směrem k rozhraní mezi vzorkem a elektrolytem a dochází k jejich zakoncentrování.

Uvedená metoda může být použita také pro analýzu aniontů, kdy je nutný přídavek modifikátoru EOF do základního elektrolytu, jako je např. CTAB a aplikace reverzní polarity [38].

3.3.2. Izotachoforetické zakoncentrování

Spojení ITP s CZE lze provést dvěma způsoby: indukci přechodné izotachofórey nebo on-line kombinací realizovanou spojením kolon.

3.3.2.1. On-line kombinace kapilární elektroforézy se zónovou elektroforézou realizovaná technikou spojení kolon

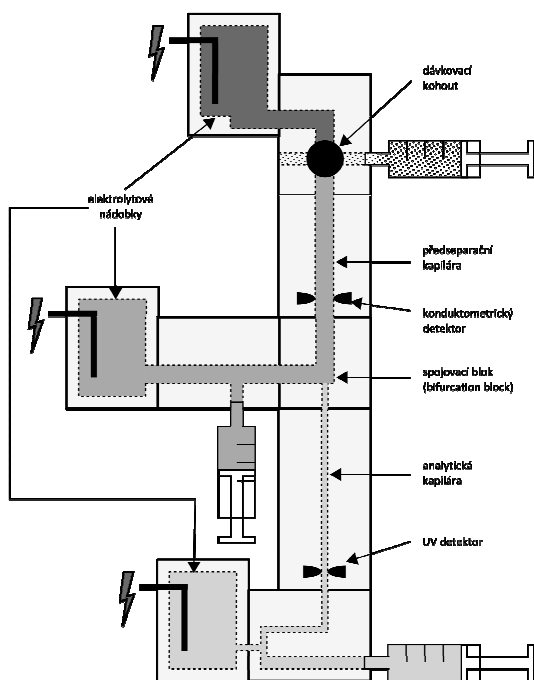
On-line kombinace ITP-CZE je velmi efektivním nástrojem ke zvýšení separační schopnosti a citlivosti CZE. Nejuspokojivějších výsledků je dosahováno při dvoukolonovém uspořádání, kdy v první kapiláře probíhá ITP, která je následovaná on-line přechodem vzorku přes spojovací blok do druhé kapiláry. V ní pak analýza pokračuje jako CZE [39].

Během ITP dochází k separaci složek vzorku v závislosti na jejich migračních vlastnostech. Poměry v ITP kapiláře lze charakterizovat následovně:

- a) elektroneutrální a opačně migrující složky nemohou dosáhnout CZE kolony
- b) analyzované složky migrující izotachoforeticky
- c) složky migrující elektroforeticky v LE a TE
- d) nežádoucí složky nacházející se v izotachoforetických zónách

c) a d) jsou považovány za hlavní interferující složky při CZE analýze vzorku a jejich oddělení má zásadní význam pro získání „čistého“ vzorku pro CZE analýzu. Způsob eliminace interferujících analytů spočívá v optimálním časovém přepínání proudu při průchodu spojovacím blokem preseparační a analytické kapiláry [40].

V okamžiku, kdy jsou nežádoucí složky odvedeny k pomocné elektrodě, dochází k přepnutí proudu a tím převedení požadovaných složek do CZE kapiláry [39]. Zde dochází k elektroforetické separaci analytů, kdy jejich jednotlivé zóny migrují každá svou vlastní rychlostí a prostorově rozdělené zóny jsou posléze detekovány [41].



Obrázek 18 Schéma aparatury pro ITP-CZE v dvoukolonovém uspořádání

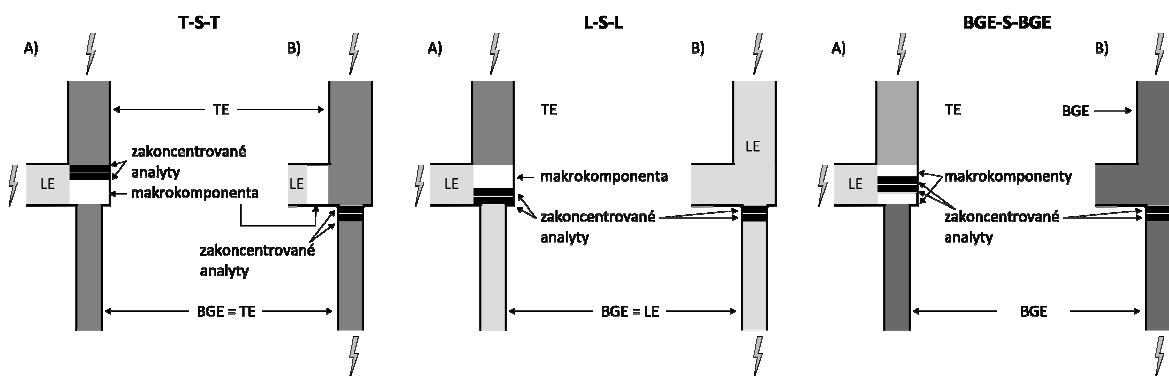
Elektrolytové systémy používané v ITP-CZE

V první fázi je nutné zvolit systém vhodný pro ITP. Mobilita iontu L musí být větší než mobilita všech ostatních složek. Mobilita iontu T musí být naopak nejnižší ze všech. pH LE musí zaručovat dostatečnou disociaci slabých kyselin nebo ionizaci bazí v jejich zónách. Úplná ionizace všech složek analytu není vhodná, protože dochází ke snížení selektivity při separaci [41].

Ve druhé fázi se využívá systém vhodný pro CZE: pro kombinaci ITP-CZE jsou uváděny tři typy uspořádání, jejichž klasifikace je založena na typu elektrolytu použitým při CZE:

- a) Systém T-S-T: nejjednodušší systém, kdy je TE stejný jako BGE v CZE fázi. Preseparační kapilára je naplněná LE a TE, zatímco analytická kapilára je naplněná TE. V prvním kroku je vzorek (S) nadávkován mezi TE a LE a na elektrody v ITP kapiláře vloženo vysoké napětí. Jednotlivé složky vzorku tvoří ostře ohraničené izotachoforetické zóny. V okamžiku, kdy T-S-L zóna přechází do rozdělovacího raménka a L k pomocné elektrodě, se vysoké napětí přepíná na analytickou kapiláru tak, aby přešly požadované zóny, ale (v ideálním případě) žádný L. V tento okamžik se stávají zóny zakoncentrované v ITP fázi vzorkem pro CZE.

- b) Systém L-S-L: LE je zároveň použit jako BGE pro CZE. Vzorek je nadávkován mezi TE a LE a na elektrody v ITP je vloženo vysoké napětí. Opět dochází k vytvoření ostře ohraničených zón. V okamžiku, kdy zóny analytu dosáhnou rozdělovacího raménka, se vysoké napětí přepne na analytickou kapiláru a vzorek plynule přechází do analytické kapiláry. Ve chvíli, kdy poslední zóna (ale již ne T) přejde do analytické kapiláry, se napětí přeruší a TE se zamění za LE. Napětí se obnoví a analýza pokračuje.
- c) Systém BGE-S-BGE: třetí možnost spočívá v použití BGE odlišného od LE a TE. Po nadávkování a zapojení zdroje vysokého napětí opět vznikají ostře ohraničené zóny, které spolu putují směrem k analytické kapiláře. K přepnutí napětí na analytickou kapiláru dojde opět v okamžiku, kdy zóny doputují k rozdělovacímu raménku. K přepnutí nesmí dojít příliš brzy, aby do analytické kapiláry spolu s analyty nemigroval i L. Jakmile do analytické kapiláry přejde poslední zóna, je napětí přerušeno a TE nahrazen BGE. K výměně elektrolytů nesmí dojít později, protože hrozí přestup T do analytické kapiláry [42].



Obrázek 19 Možné elektrolytová uspořádání v ITP-CZE v dvoukolonovém uspořádání (A – konec ITP fáze; B – začátek CZE fáze)

Systém T-S-T je používán, jsou-li předmětem zájmu pomalejší složky vzorku. Zajímají-li nás spíše rychleji migrující složky, jejichž pohyblivost je podobná pohyblivosti vedoucího iontu, je výhodnější použití L-S-L systému. BGE-S-BGE systém se používá (pro svou složitost) ve speciálních případech [39].

Přechod ITP do CZE

Důležitou fází analýzy prováděné pomocí kombinace ITP-CZE je okamžik, kdy jsou izotachoforeticky zakoncentrované zóny vzorku převedeny do rozdílného elektrolytového systému, ve kterém by měly migrovat elektroforeticky. S analyty se do CZE kapiláry dostává určité množství LE a TE, což vede k přetrvávání ITP migrace v CZE fázi a dochází k negativnímu ovlivnění kvalitativních i kvantitativních parametrů detekovaných zón. Z tohoto důvodu je nutné zajistit, aby množství převedeného LE a TE bylo co nejmenší [41], a pečlivě monitorovat časový přechod analytů z ITP do CZE systému.

Přístrojové uspořádání on-line ITP-CZE

Kapilára používaná pro ITP musí mít dostatečnou separační kapacitu, proto se nejčastěji používají kapiláry s větším průměrem, pro CZE se naopak používají kapiláry s menším průměrem, které jsou opatřené citlivým detektorem. Obě kapiláry jsou vzájemně propojené prostřednictvím spojovacího bloku, který zajišťuje odvedení nežádoucích zón k pomocné elektrodě a přechod těch ITP zón do CZE fáze, které jsou předmětem zájmu. K detekci v ITP kroku se nejčastěji používá konduktometrická, v CZE fázi pak spektrofotometrická detekce [37,41]. Dávkování se provádí pomocí dávkovacího kohoutu o objemu řádově v desítkách μl .

3.3.2.2. Přechodná izotachoforéza

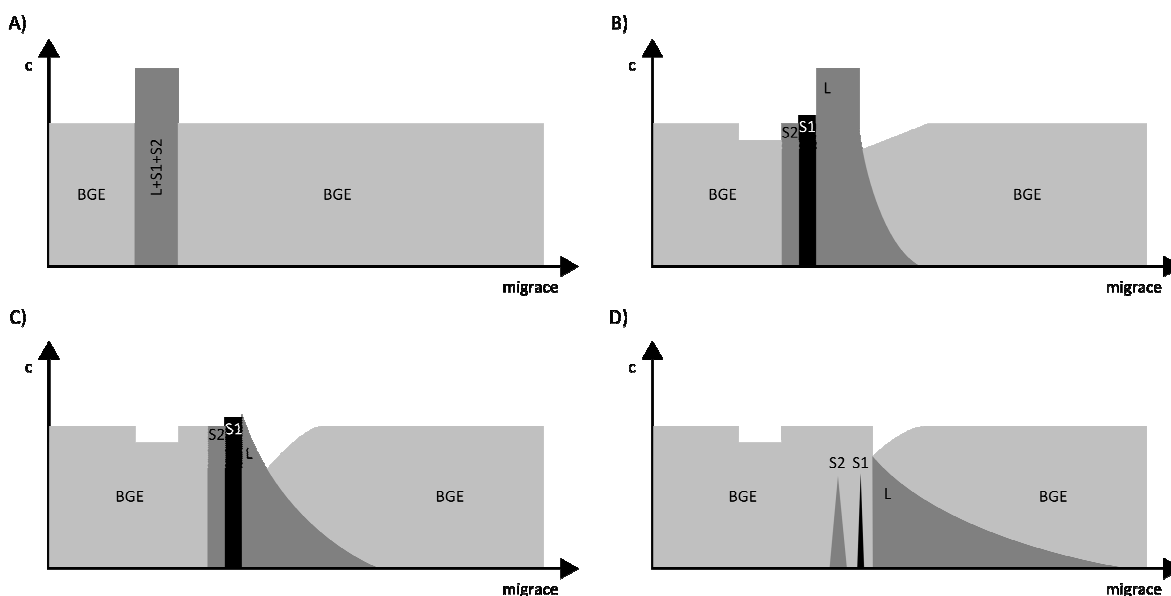
Přechodná izotachoforéza (tITP) je založena na výběru BGE s vhodným spoluiontem, kdy makrokomponentní složka vzorku působí jako „stacker“. Při přechodné izotachoforéze lze použít dva přístupy:

- a) Základní elektrolyt je zvolen tak, že spoluiont má vyšší efektivní mobilitu než analyty. Spoluiont přebírá úlohu vedoucího iontu, makrokomponenta přítomná ve vzorku hraje roli terminátoru. Vzorek je dávkován hydrodynamicky a po vložení elektrického pole dojde k vytvoření přechodného ITP stavu. Po zakoncentrování analytů a rozmytí makrokomponenty nastává separace pomocí CZE.

- b) Základní elektrolyt je zvolen tak, že spoluiont má nižší efektivní mobilitu než analyty. V tomto případě přebírá spoluiont funkci koncového iontu, roli vedoucího iontu přebírá makrokomponenta ve vzorku. Tento přístup je výhodný především pro biologické matrice, které často obsahují velké množství iontů s vysokou mobilitou (K^+ , Cl^-). Schéma tohoto přístupu znázorňuje Obrázek 20.
- c) Vzorek je upraven tak, aby obsahoval makrokomponentu, která hraje roli LE, a makrokomponentu, která hraje roli TE.

Sledované analyty musí mít mobility v rozmezí mezi mobilitami spoluiontu a makrokomponenty. Pokud mají pohyblivost mimo toto rozmezí, migrují v normálním CZE módu a z důvodu vysoké vodivosti vzorku jsou enormně rozmyté.

Analyty zakoncentrované mezi spoluiontem a makrokomponentou opouští ITP region postupně, a to podle míry, v jaké se liší jejich mobilita od mobility makrokomponenty. Pro optimální separaci všech analytů je nutné zajistit dostatečně dlouhou migrační dráhu [37].



Obrázek 20 Schéma přechodné ITP indukované přidávkou vedoucího iontu (překresleno podle Urbánka [37]). A) Vzorek (analyty S_1 a S_2) doplněný o makrokomponentu L, která hraje roli LE, je nadávkován do základního elektrolytu; B) Po vložení vysokého napětí na elektrody opouští komponenty vzorku původní zónu vzorku a jejich koncentrace se mění podle Kohlrauschovy regulační

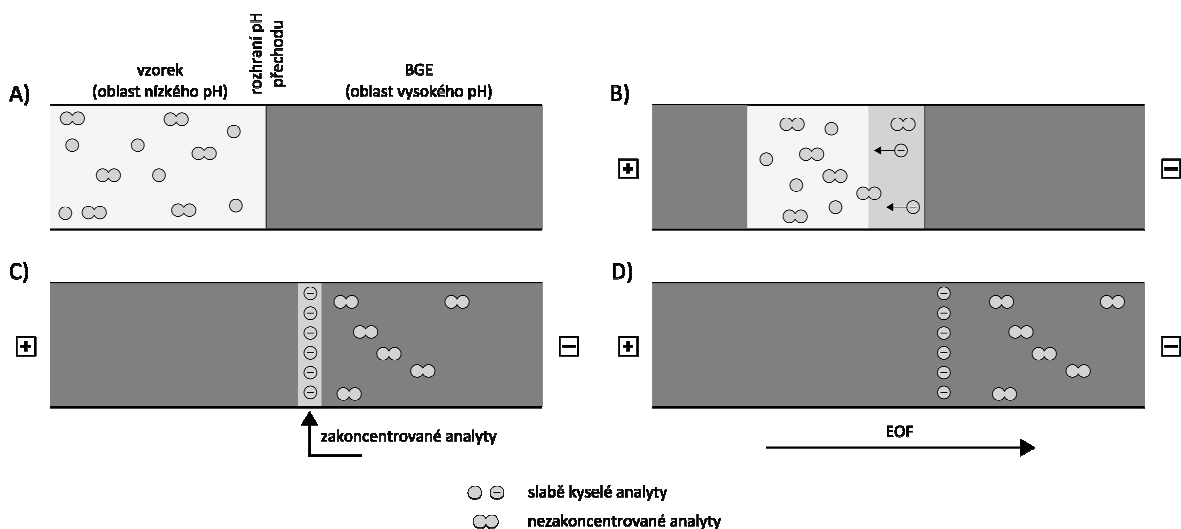
funkce; C) Makrokomponenta L se vlivem vysoké migrační rychlosti silně rozmývá a v okamžiku, kdy zanikne samostatná zóna L, zanikají i podmínky pro tITP; D) Všechny složky vzorku migrují v CZE módu.

3.3.3. Dynamic pH junction

Jsou-li ionizovatelné funkční skupiny analytů slabě kyselé nebo slabě zásadité, závisí náboj analytu na stupni ionizace vyplývajícím z pK_a hodnot těchto funkčních skupin a z pH roztoku. Na tomto principu je založena další prekoncentrační technika označovaná jako „dynamic pH junction“. Jedná se o postupnou změnu pH v systému s rozhraním oddělujícím elektrolyty různé acidity.

Princip lze popsat na analýze slabě kyselých analytů. Analyty jsou rozpuštěny v matrici o pH asi o dvě o jednotky nižším, než je pK_a analytů, kdy slabě kyselé analyty nejsou prakticky disociovány.

Po nadávkování velkého objemu zředěného vzorku do kapiláry obsahující BGE o vysokém pH , se vytvoří v kapiláře acidobazické rozhraní mezi základním elektrolytem a vzorkem (Obrázek 21-A). Po aplikaci vysokého napětí toto rozhraní postupně zaniká „titrací“ vzorku hydroxidovými ionty z BGE (Obrázek 21-B). Pohybem zóny vzorku s EOF, dochází k postupnému zakoncentrování až do okamžiku, kdy rozdíl pH zcela vymizí a analýza pokračuje v klasickém CZE módu (Obrázek 21-C,D).



Obrázek 21 Dynamic pH junction (překresleno podle podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

3.3.4. Sweeping

Jako sweeping se označuje jev, kdy jsou analyty vychytávány a zakoncentrovány micelami, které pronikají do zóny vzorku. Zóna vzorku micely neobsahuje, ale má podobnou vodivost jako základní elektrolyt. Jde o metodu nezávislou na EOF a využitelnou pro nabitě i nenabitě analyty. Výsledkem je zakoncentrování analytu do úzkého pásu, kdy míra prekoncentrace závisí na afinitě analytu k micelám.

Délka zóny vzorku po sweepingu (l_{sweep}) je dána vztahem

$$l_{sweep} = l_{inj} \frac{1}{1+k}$$

kde l_{inj} vyjadřuje původní délku zóny vzorku a k vyjadřuje retenční faktor analytu. Sweeping je tedy vhodný pro analyty s vysokou afinitou k pseudostacionární fázi [43].

Průběh samotného zakoncentrování záleží na typu použitého surfaktantu (kationický, anionický, neutrální...), na typu analytu (kationy, aniony, neutrální látky) a také na přítomnosti či absenci EOF.

Tato metoda byla poprvé poprvé popsána v systému s potlačeným EOF v pufru s nízkým pH s použitím anionických micel. Po aplikaci negativní polarity anionické micely, přítomné v pufru na katodickém konci kapiláry, vstupují do zóny vzorku, „vychytávají“ neutrální a slabě bazické analyty, které se díky potlačenému EOF pomalu pohybují proti micelám.

Později byly popsány další způsoby realizace metody, např. sweeping za použití anionických micel v systému s normální polaritou a velkým EOF. Základní princip separace zůstává zachován [37].

Sweeping v CZE, tj. v nepřítomnosti micel, popsali autoři Quirino a Terabe [44]. Použili borátový pufr, který vstupoval do zón vybraných neutrálních monosacharidů a dvojsytných fenolů za tvorby negativně nabitých komplexů. Zaostrující efekt zde nesouvisel s retenčním faktorem jako v MEKC, ale byl přímo úměrný asociační konstantě komplexu a pH pufru [37,44].

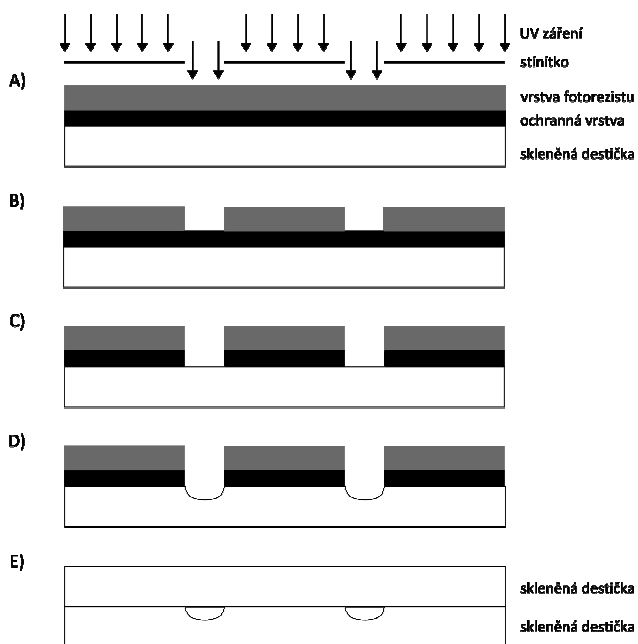
3.4. Elektroforéza na čipu

Zajímavý vývojový směr, a to nejen v elektroforetických metodách, představuje miniaturizace zařízení. Výhody miniaturních systémů spočívají v rychlosti analýzy, přenosnosti analýz, nízkých pořizovacích a provozních nákladech, možnosti paralelních analýz a redukci objemu rozpouštědel, vzorku (řádově až pl) a odpadu (jsou environmentálně šetrné). Tato zařízení jsou dobře komerčně dostupná, ale je zvládnutá i technologie jejich přípravy na míru v laboratorních podmínkách.

Základem těchto zařízení jsou tzv. čipy – ploché destičky s kanálky. Jako materiál pro výrobu těchto destiček se nejprve používalo křemenné sklo, jehož výhodou byla v optické transparentnosti a vlastnostech EOF blízkých klasickým kapilárním systémům. V současnosti se jako progresivnější materiály jeví nejrůznější polymery, typickým příkladem může být polymethylmethakrylát nebo polydimethylsiloxan.

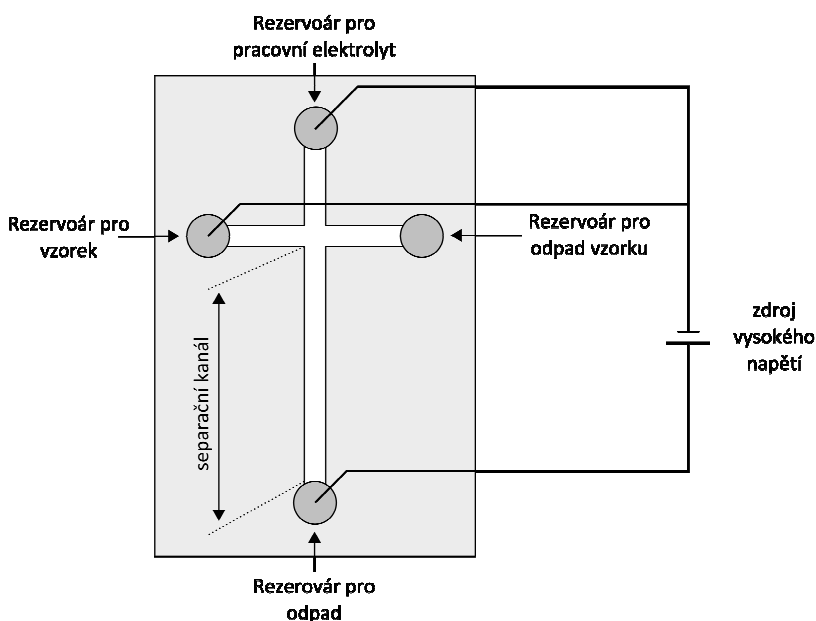
V těchto destičkách jsou různými technikami vytvořeny kanálky a rezervoáry pro elektrolyty a vzorek. Mezi používané postupy patří např. fotolitografie:

1. Na skleněné destičce je umístěna ochranná vrstva (Cr/Al). Na ní je rovnoměrně rozprostřena vrstva fotorezistu. Fotorezist je polymer, jehož struktura se vlivem světla mění – buď rozrušuje (pozitivní fotorezist) nebo naopak síťuje (negativní fotorezist).
2. V dalším kroku je vrstva fotorezistu exponována UV zářením. To prochází přes stínítko, ve kterém je vytvořen vzor budoucí struktury čipu (Obrázek 22-A).
3. Fotochemická reakce během expozice rozruší polymerní strukturu fotorezistu a jeho zbytky jsou vymyté. Prostřednictvím kanálků vzniklých ve fotorezistu je vhodným činidlem naleptána ochranná vrstva (Cr/Al). Ochranná vrstva pod neosvíceným fotorezistem zůstane netknutá (Obrázek 22-B).
4. Poté je přes kanálky v ochranné vrstvě aplikována vhodná kyselina (např. HF), která naleptá vlastní skleněnou destičku (Obrázek 22-C).
5. Nakonec je odstraněna ochranná vrstva s vrstvou fotorezistu a destička s vytvořenými kanálky je překryta další destičkou (Obrázek 22-D,E).



Obrázek 22 Schematické znázornění procesu fotolitografie (překresleno podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4]).

Existuje mnoho typů rozvržení kanálků na čipu. Jednotlivé typy jsou často vytvořeny na míru pro specifické potřeby jednotlivých technik (například spojování kolon atd.). Jedno z typických rozvržení znázorňuje Obrázek 23.



Obrázek 23 Jednoduché křížové rozložení čipu (překresleno volně podle Mariny, Ríose a Valcárcela [4])

Jako jednu z nejpoužívanějších detekčních technik lze jmenovat laserem indukovanou fluorescenci. Její výhoda spočívá v tom, že laser může být zaměřen na přesné místo v miniaturním kanálku, na druhou stranu zdaleka ne všechny analyty mají schopnost fluorescence. Často se proto využívá elektrochemické detekce (konduktometrické, amperometrické...), která je dostatečně univerzální a s miniaturizací neztrácí citlivost, jako je tomu u spektrofotometrie. V literatuře je uvedeno také napojení na MS a další pokročilé detekční techniky. [4,45-47]

4. Praktická část - komentář k publikovaným pracím

4.1. Využití prekoncentračních technik v kapilární zónové elektroforéze

4.1.1. Stanovení fenolických kyselin v methanolickém extraktu drogy *Epilobii herba* metodou on-line kombinace kapilární izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou

Cílem této práce bylo vypracování ITP-CZE metody v dvoukolonovém uspořádání (princip je rozebrán v kapitole 3.3.2.1) pro analýzu vybraných fenolických kyselin v droze *Epilobii herba*. Výhodou této metody je možnost separace a stanovení látek bez nutnosti předcházející, často velmi náročné off-line předúpravy vzorku.

4.1.1.1. *Epilobii herba* a analyzované látky

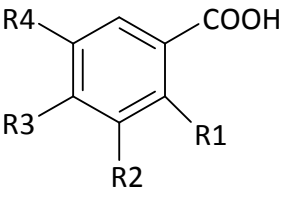
Drogu *Epilobii herba* poskytuje nadzemní část druhů *Epilobium parviflorum*, *E. montanum*, *E. roseum* a *E. collinum* (Oenotheraceae). Je pokládána především za tříslovinnou drogu. V lidovém léčitelství je doporučována při onemocnění prostaty a jako dezinficiens močových cest [48].

V droze lze identifikovat komplex sterolů, nejvýznamnější z nich je β -sitosterol a sitosterol-3- β -D-glukosid a dále pak estery β -sitosterolu s některými kyselinami. Nadzemní část dále obsahuje mastné kyseliny (palmitovou, palmitoolejovou, stearovou, olejovou, arachidonovou, linolovou, linolenovou a další). Z *E. parviflorum* i dalších druhů byly izolovány flavonoidy, zejména myricitrin, izomyricitrin kvercitrin aj.

V rostlině lze nalézt i aromatické kyseliny, jako například kyselinu ferulovou, protokatechovou, skořicovou, kávovou, gentisovou a chlorogenovou [48-50], které byly předmětem této práce.

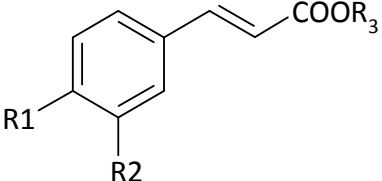
Analyzované látky lze rozdělit do dvou základních skupin na základě chemické struktury, od které se odvozují. Jsou to deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Jednotlivé látky absorbují v UV oblasti.

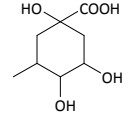
Tab. 1 Deriváty kyseliny benzoové



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	pK _a [51]
k. protocatechová	H	OH	OH	H	4,45
k. syringová	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	4,33
k. vanilová	H	OCH ₃	OH	H	4,45
k. gentisová	OH	H	H	OH	2,95

Tab. 2 Deriváty kyseliny skořicové



	R ₁	R ₂	R ₃	pK _a [51]
k.skořicová	H	H	H	4,43
k. ferulová	OH	OCH ₃	H	4,04
k. kávová	OH	OH	H	4,04
k. p-kumarová	OH	H	H	4,10
k. chlorogenová	OH	OH		3,96

4.1.1.2. Optimalizace podmínek

Na základě předchozích prací na katedře [52-54] bylo zvoleno BGE-S-BGE uspořádání elektrolytových systémů. Bylo nutné optimalizovat složení všech tří elektrolytů (TE, LE a BGE). Všechny elektrolyty i vzorek obsahovaly 20 % (v/v) methanolu.

Jako TE byl zpočátku použit roztok kyseliny borité o $pH=8,2$. TE s kyselinou boritou však kladl velké nároky na separační systém, protože roztok v kapiláře se

zahříval, zvyšovalo se napětí a analýza byla často přerušována. To vyústilo ve snahu změnit elektrolytový systém ITP tak, aby zatížení aparatury bylo nižší. Cílem práce bylo stanovení aromatických kyselin a komplexace s kyselinou boritou nebyla proto nezbytná, jako je tomu u analýzy flavonoidů v rostlinném materiálu.

Jako TE byly vyzkoušeny kromě kyseliny borité tři další látky (MES, HEPES a *p*-nitrofenol), které měly vyšší pohyblivost než kyselina boritá. Jako vhodná alternativa ke kyselině borité v roztoku terminátoru se ukázala HEPES.

Jako vedoucí iont LE byl použit Cl⁻. Jako protiiont byly vyzkoušeny látky TRIS a imidazol, z kterých byl pro další analýzy vybrán imidazol (pK_a je 7,1). Imidazolový pufr s *pH* 7,1 zajistil dostatečnou ionizaci a tím migraci fenolických kyselin.

Pro dosažení kvalitní separace je vhodné, aby efektivní pohyblivost aniontu základního elektrolytu byla co nejbližší efektivní pohyblivostí analyzovaných látek. Byly testovány čtyři různé anionty. Tři z nich (MOPSO, MES a HEPES) byly deriváty sulfonových kyselin, čtvrtým byla kyselina hydroxyizomáselná. Nejlepší separace s ohledem na tvar a rozdělení píků, bylo dosaženo v systému s MES.

Pro zvolený systém s MES byla provedena optimalizace *pH* s cílem zjistit optimální hodnotu. Opět se hodnotil především počet a tvar jednotlivých píků. Testované rozmezí *pH* bylo 7,71-8,50. Nejlepšího rozdělení bylo dosaženo při *pH* 8,31.

Pro zjištění vlivu kyseliny borité v BGE na separaci látek byl testován vliv jejího přídatku do BGE v rozmezí do obsahu 50 mM kyseliny borité v BGE. V nepřítomnosti kyseliny borité byly první dva analyty (později identifikované jako kyselina protokatechová a kávová) zpomaleny a migrovaly s pomalejšími kyselinami. Při koncentraci 30 mM kyseliny borité byla separace nejlepší, při nižších koncentracích bylo rozlišení píků výrazně horší. Při vyšších koncentracích se prodlužovala doba analýzy bez dalšího zlepšení separace.

Testován byl také vliv přídatku α -cyklodextrinu a β -cyklodextrinu do BGE v koncentračním rozmezí 5-15 mM. Jako nejvýhodnější se projevilo použití α -cyklodextrinu v koncentraci 10 mM.

S ohledem na komplikované instrumentální uspořádání této metody bylo zapotřebí věnovat velkou pozornost časovému režimu analýzy. Optimálního režimu

bylo dosaženo proměřením řady různých časových kombinací. ITP fáze začínala s proudem 200 μA (přibližně po dobu 10 minut). Od konce vlny uhličitánů byl tento proud ponechán po dobu dalších 100 sekund. Poté byl snížen na 100 μA a ponechán na této hodnotě 70 sekund. Poté byl proud přepnut na analytickou kolonu. Během přechodu analyzovaných zón do analytické kapiláry (210 sekund) byla jeho hodnota 50 μA . Po uplynutí 210 sekund byla analýza přerušena, preseparační kapilára propláchnuta BGE. Analýza pokračovala při 50 μA dalších 90 sekund. Poslední změnou proudu byla změna jeho hodnoty na 20 μA a při této hodnotě analýza probíhala až konce.

V optimálním systému migrovaly jednotlivé kyseliny v následujícím pořadí: k. protokatechová, k. kávová spolu kyselinou gentisovou, k. skořicová, k. vanilová, k. kumarová, k. syringová, k. ferulová a poslední k. chlorogenová.

4.1.1.3. Validace metody

Kalibrační závislosti látek byly měřeny v rozmezí koncentrací 1,92-0,192 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro k. protokatechovou, vanilovou, kumarovou, syringovou, ferulovou; 3,84-0,384 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro k. kávovou, chlorogenovou a gentisovou; 0,96-0,096 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro k. skořicovou.

Jako kvantitativní parametr byly použity plochy píků ze záznamů UV detektoru, které byly vyhodnoceny pomocí softwaru ITP Pro32 (KasComp, Bratislava, Slovenská republika). Kalibrační závislosti byly zpracovány v programu Microsoft Excel pomocí lineární regrese. Hodnoty korelačních koeficientů ($R=0,9937-0,9977$) svědčí o tom, že v daném rozmezí je závislost plochy píku na koncentraci studovaných látek lineární.

Detekční limit (LOD) byl stanoven nejčastější používanou metodou $3S/N$ (podle metodických pokynů ICH [55]). Nejnižší detekční limit vykazovala k. skořicová (0,005 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a k. kumarová (0,010 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Detekční limit se dále zvyšoval v pořadí: k. ferulová (0,021 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), k. syringová (0,026 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), k. kávová (0,034 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), k. protokatechová (0,041 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), k. vanilová (0,044 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nejvyšší detekční limit vykazovala k. chlorogenová (0,061 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Opakovatelnost časů byla velmi dobrá, pro jednotlivé analyty (kromě k. chlorogenové) nepřesáhla 1 %. Stejně tak opakovatelnost ploch píků prakticky nepřekročila 5 %, výjimkou byla opět kyselina chlorogenová.

4.1.1.4. Aplikace metody na analýzu rostlinného materiálu

Validovaná metoda byla aplikována na analýzu rostlinného extraktu připraveného sonifikací upráškované drogy v methanolu, následnou filtrací a naředěním vodou na požadovaný objem.

Výsledky identifikace vybraných konstituentů vrbovky popsanou metodou jsou v dobré shodě s prací, ve které A. Hiermann a B. Radl pomocí kapilární zónové elektroforézy analyzovali aromatické kyseliny ve stejné rostlinné droze [50]. Oproti této práci se nepodařilo prokázat kyselinu gallovou a kyselinu chlorogenovou, přestože ve směsi standardů v daném systému migrovala, naopak navíc byla identifikována kyselina kumarová.

Výsledky ITP-CZE analýzy extraktu z vrbovky lze také srovnat s výsledky získané metodou CZE využívající LVSS s přepínáním polarity [56]. Metoda i srovnání jsou uvedeny v kapitole 4.1.2.

Srovnání ITP-CZE s klasickou CZE v extraktech z jiných drog je obtížné z důvodu ne zcela totožných cílových analytů. Toto srovnání lze ale provést na úrovni základních analytických parametrů jako je citlivost, času analýzy a náročnosti úpravy vzorku.

Např. CZE analýze 13 fenolických kyselin v droze *Bromus inermis* předcházela extrakce na Soxhletově extraktorů a purifikace pomocí SPE [57]. Osm fenolických kyselin obsažených v potravinách a nápojích bylo extrahováno methanolem na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut, extrakt byl centrifugován, kapalná fáze filtrována přes membránový filtr, filtrát odpařen dosucha na vakuové rotační odparce a zbytek po odpaření rozpuštěn v methanolu [58,59]. Iinuma a Herrmann vyvinuli CE-ESI-MS metodu pro stanovení modelové směsi 6 fenolických kyselin a nebyla proto nutná žádná úprava vzorku [60]. V naší práci byl upráškován rostlinný materiál 30 min sonifikován methanolem, extrakt zfiltrován přes filtrační papír a před analýzou naředěný vodou. Tento jednoduchý postup byl možný, protože během ITP kroku

jsou nežádoucí nabité komponenty vzorku odvedeny k pomocné elektrodě. Vlastní analýza však byla delší, tj. asi 25 min. Ostatní publikované metody vykazovaly výrazně kratší časy, méně než 10 minut [57] nebo dokonce než 3,5 minuty [58,59].

Detekční limity, dosažené předloženou metodou pro fenolické kyseliny ($0,005-0,061 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly lepší, než limity dosažené klasickou CZE ($0,02-0,12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [57], $0,04-0,07 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [58,59] a $0,015-0,168 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [60]). Opakovatelnost ploch píků byla obdobná nebo lepší než u výsledků jiných autorů, např. RSD = 1,56–4,23% u [57], RSD < 5,4% u [59], RSD < 4,8% u [58] a RSD = 5–8,8% u [60]. Nebyl pozorován výraznější rozdíl v opakovatelnosti migračních časů v naší práci a srovnávaných publikacích. Také kalibrační rozmezí bylo srovnatelné.

4.1.2. Vývoj stacking-CZE metody pro analýzu fenolických kyselin

Cílem této práce bylo vypracování metody kapilární zónové elektroforézy s využitím techniky LVSS s přepínáním polarit (princip techniky viz kapitola 3.3.1.2) pro separaci a stanovení osmi fenolických kyselin v modelové směsi a extraktu z rostlinné drogy *Epilobium parviflorum*. Struktura a vlastnosti analyzovaných látek jsou uvedeny v kapitole 4.1.1.1).

4.1.2.1. Optimalizace CZE v klasickém modu

Nejprve byla provedena optimalizace elektrolytového systému pro analýzu kyseliny skořicové, kumarové, ferulové, syringové, kávové, gentisové, vanilové a chlorogenové. Cílem bylo dosáhnout jejich úplné separace se symetrickými píky a co největší plochou.

Pro separaci byl zvolen elektrolytový systém s alkalickým pH na základě borátového pufru pro dosažení ionizace karboxylových a fenolických skupin separovaných kyselin a možnosti zlepšení separace a selektivity tvorbou komplexů borátu s *o*-dihydroxylovými skupinami. Byl testován efekt koncentrace borátu, α -cyklodextrinu a methanolu a jako nejvhodnější BGE se ukázal systém složený z 50 mM borátu a 2% α -cyklodextrinu o $pH = 9,0$. V tomto elektrolytovém systému byly píky symetrické, rozdělené na základní linii s přijatelnou délkou analýzy.

4.1.2.2. Optimalizace CZE analýzy s využitím tzv. „stacking“ techniky

S využitím systému z předchozí optimalizace byly dále optimalizovány podmínky pro proces zakoncentrování velmi ředěných roztoků směsi kyselin za použití stacking procedury s přepnutím polarity. Cílem bylo zvýšit citlivost analýzy a stanovit obsah kyselin v rostlinném materiálu.

Pro získání co nejvyšší odezvy detektoru a tím i citlivosti stanovení bylo nutné nalézt vhodný tlak, dobu nástřiku a čas přepnutí polarity. U prvních dvou parametrů jde o optimalizaci dávkovaného objemu zředěného roztoku vzorku. Čas změny polarity pak určuje délku fokusačního kroku, který nesmí být ani příliš krátký (nedošlo by k dostatečnému zakoncentrování) ani příliš dlouhý (došlo by ke ztrátě analytů).

Jako modelová látka byla zvolena kyselina skořicová s nejkratším migračním časem. Čas přepnutí polarity byl určen podle hodnoty proudu. K přepnutí došlo v okamžiku, kdy proud dosáhl přibližně 95 % původní hodnoty (s opačným znaménkem), která byla naměřena při separaci pomocí klasické CZE.

Běžný hydrodynamický nástřik u klasické CZE je obvykle 6 vteřin při tlaku 50 mBar. Pro možnost zakoncentrování bylo nutno dávkování zvýšit. Software přístroje umožňoval délku nástřiku maximálně 99 vteřin, tato hodnota byla tedy brána jako konstantní a dávkovaný objem byl ovlivňován tlakem použitým při nástřiku. Závislost změny plochy píků na hodnotě tlaku byla sledována v rozmezí 50-200 mBar.

Se zvyšujícím se tlakem nástřiku se prodlužovat čas přepnutí polarity. Při hodnotě 200 mBar byl průběh proudu nekonstantní a plocha píku nemohla být odečtena. Nejlepší výsledky byly získány při aplikaci 100 mBar. Objem nástřiku při tomto tlaku odpovídal 70 % celkového objemu kapiláry. K přepnutí polarity došlo v 1,8 minutě.

4.1.2.3. Validace metody

Kalibrační závislost byla získána proměřením pěti standardních roztoků každé stanovované kyseliny v koncentračním rozmezí 0,1-2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za použití optimalizované metody. Plocha píků byla použita jako kvantitativní parametr, pro její vyhodnocení byl použit obslužný program Karat 32 Gold dodávaný s přístrojem. Pro každou koncentraci byla provedena tři měření, z kterých byl vypočítán aritmetický průměr. Hodnoty korelačních koeficientů (0,9982 — 0,9995) potvrzují lineární závislost plochy píků na koncentraci ve zvoleném rozmezí.

LOD byl určen analýzou látek příslušné koncentrace odpovídající poměru signálu k šumu s hodnotou 3 (podle metodických pokynů organizace ICH [55]). Nejnižší limit vykazuje kyselina skořicová, p-kumarová, ferulová, gentisová a syringová (0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vyšší detekční limit má kyselina kávová a vanilová (0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), nejvyšší kyselina chlorogenová (0,025 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Dostupné publikované práce používající pro konvenční CZE křemennou kapiláru, uvádějí pro kyselinu p-kumarovou LOD = 0,10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [61], 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (kapilára s vnitřním průměrem 75 μm) [62], LOD pro ferulovou kyselinu = 0,16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [61] a 0,040 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [62], LOD pro kyselinu kávovou 0,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [61], pro kyselinu vanilovou 0,030 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [62] a syringovou 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [62]. Uvedené detekční limity jsou vyšší než limity zjištěné optimalizovanou metodou CZE s využitím stacking techniky. Vyšší citlivost má metoda i v porovnání s HPLC, kde se dosažené detekční limity pohybují v rozmezí 0,029 - 0,416 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [63].

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů bylo provedeno šest měření pro danou koncentraci. Hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD) migračních časů nepřekročily 2 %, RSD ploch píků dosahovaly hodnot nižších než 5 % s výjimkou kyseliny syringové (RSD = 5,69 %).

Porovnáním korigovaných ploch píků (plocha píků/migrační čas) jednotlivých kyselin u klasické CZE a CZE s využitím stacking techniky bylo docíleno v průměru 40-ti násobného zvýšení citlivosti metody. V pracích ostatních autorů je možno nalézt údaje až o 100-násobném zakoncentrování [64], většinou však literatura uvádí 40-75-násobné zvýšení citlivosti [63].

Podrobný popis a výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.3.

4.1.2.4. Aplikace metody na analýzu rostlinného materiálu

Validovaná metoda byla aplikována na identifikaci a kvantifikaci výše uvedených fenolických kyselin v methanolickém extraktu nati vrbovky. V extraktu byly prokázány kyseliny skořicová, chlorogenová, kávová a vanilová. Výsledky byly porovnány s publikovanou prací A. Hiermana, který v extraktu z *Epilobium angustifolium* identifikoval kromě uvedených látek také kyselinu ferulovou a gentisovou. Extrakty uvedených kyselin však byly získány mnohem náročnější procedurou. Kvantitativní srovnání chybí, protože se autoři věnovali pouze kvalitativní analýze [50].

Kvalitativní srovnání s výsledky získanými na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která se věnovala analýze vrbovkové natě pomocí on-line kombinace ITP-CZE [65], je uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Porovnání výsledků získaných metodou LVSS a ITP-CZE [65]

Analyt	Obsah (mg·g ⁻¹ sušené upráškované drogy)	
	CZE (LVSS)	ITP-CZE
Kyselina skořicová	0,13	0,06
Kyselina chlorogenová	0,34	-
Kyselina kávová	0,27	0,65 (jako kávová+gentisová)
Kyselina vanilová	0,29	-
Kyselina kumarová	-	0,28
Kyselina ferulová	-	0,13

Metoda CZE s využitím LVSS s přepínáním polarity je dostatečně citlivá pro analýzu zkoumaných látek. Ve srovnání s publikovanou ITP-CZE metodou je opakovatelnost výsledků srovnatelná. Výhodou CZE je krátká doba separace (do 20 minut, oproti přibližně 35 minutám v případě ITP-CZE) a jednodušší obsluha přístroje. Na

rozdíl od HPLC, nejsou při CZE součástí BGE organická rozpouštědla [63,66], což je z ekonomického i ekologického hlediska výhodné.

4.1.3. Stanovení fenolických látek v methanolickém extraktu drogy *Melissae herba* on-line kombinací kapilární izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou

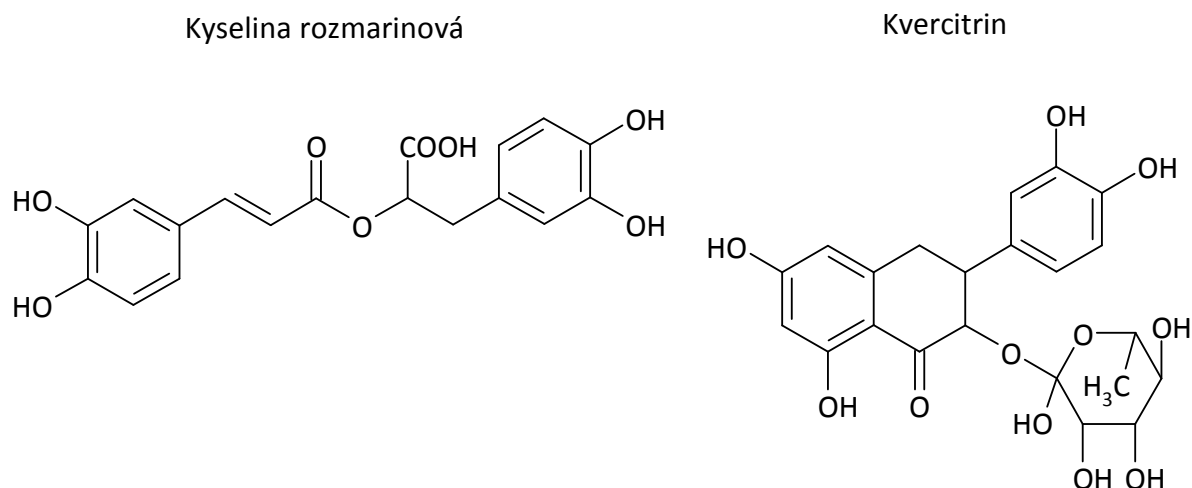
Cílem této práce bylo vypracování metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu fenolických látek obsažených v droze *Melissae herba* s využitím on-line kombinace kapilární izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy.

4.1.3.1. *Melissae herba* a analyzované látky

Drogu poskytují horní části natě meduňky lékařské (*Melissa officinalis*, *Lamiaceae*). Nejvýznamnější složkou drogy je její silice, která je charakteristická obsahem monoterpenických aldehydů (citral, geranial, neral a další). Mezi další izolované látky patří flavonoidy kvercitrin, rhamnocitrin a 7-glucokidy apigeninu, kvercetinu a luteolinu, třísloviny, fenolické kyseliny (zejména kyselina rozmarinová, kávová a chlorogenová), triterpeny a aromatické alkoholy [67,68].

Droga má antibakteriální a antifungální účinky. Byly prokázány také účinky spasmolytické a sedativní. Používá se k symptomatické léčbě gastrointestinálních poruch a k symptomatické léčbě neurotonických poruch (např. slabší formy nespavosti) [68].

Kyselina chlorogenová, *p*-kumarová, ferulová a kávová byly zmíněny již v kapitole 4.1.1.1. Do jisté míry charakteristickou kyselinou pro *Melissae herba* je kyselina rozmarinová ($pK_a = 2,79$ [51]), která se řadí také mezi deriváty kyseliny skořicové. V práci byl dále stanovován i flavonoid kvercitrin ($pK_a = 6,83$ [51])



Obrázek 24 Chemické struktury kyseliny rozmarinové a kvercitrinu

4.1.3.2. Optimalizace podmínek

Vzhledem k pK_a hodnotám fenolických kyselin (3-4) a kvercitrinu (~6,8) by bylo potřeba pracovat v systému s vysokým pH . Se zvyšováním pH by však docházelo k vyšší absorpci vzdušného CO_2 , prodlužování zóny uhličitanů v ITP fázi a tím i celé analýzy a ke zhoršení opakovatelnosti celé procedury. Vzhledem k přítomnosti dvou vicinálních fenolických hydroxylových skupin u některých analytů bylo výhodné využít komplexačních schopností kyseliny borité, díky kterým se on-column vytvořily záporně nabitě komplexy [69], které bylo možné separovat při nižších hodnotách pH .

Na základě předchozích prací na katedře [52-54] bylo zvoleno BGE-S-BGE uspořádání elektrolytových systémů. Pro zjištění vhodného proudového a časového režimu byly použity kyselina pikrová a 1-nitroso-2-naftolu jako vizuálního markeru pohybu zakoncentrovaných zón analytů (kyselina pikrová migruje před a 1-nitroso-2-naftol za sledovanými analyty).

Při vývoji metody bylo nutné optimalizovat složení všech tří elektrolytů (TE, LE a BGE). Všechny elektrolyty i vzorek obsahovaly 20 % (v/v) methanolu. Jako TE byl použit roztok 0,05 M kyseliny borité o pH^* 8,3. LE obsahoval 0,01M Cl^- jako vedoucí ion, jako protion byl použit TRIS. Jako anion v BGE byl použit derivát sulfonové kyseliny MOPSO (v koncentraci 25 mM) z důvodu efektivní pohyblivosti blízké pohyblivostem analyzovaných látek. Základní elektrolyt dále obsahoval kyselinu boritou jako kompletující agens.

V práci byl sledován vliv pH^* BGE v rozmezí 7,8-8,5. Jako kritérium vhodnosti pH^* byl zvolen počet a tvar píků a jejich rozlišení. V této fázi nebyly jednotlivé analyty identifikovány. Jako optimální bylo zvoleno pH^* 8,1.

Z důvodu ovlivnění separace komplexací některých analytů s kyselinou boritou byl otestován vliv přídavku této kyseliny do základního elektrolytu. Testované koncentrační rozmezí bylo 20-50 mM. Hodnocení probíhalo podle stejných kritérií jako u testování vlivu pH^* a relativně nejlepší separace byla pozorována při koncentraci 40 mM.

Testován byl také přídavek α - a β -cyklodextrinu v koncentracích 5-15 mM, ale nebylo pozorováno výraznější zlepšení.

Složení optimálního BGE bylo následující: 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS, 0,2 % HEC, 40 mM kyseliny borité, pH^* 8,1 (upravováno pomocí nasyceného roztoku hydroxidu barnatého).

4.1.3.3. Validace metody

Kalibrační závislosti analyzovaných látek byly proměřeny v rozmezí 0,5-5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako vnitřní standard (IS) byl použit apigenin v koncentraci 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako kvantitativní parametr byly odečítány plochy píků ze záznamů UV detektoru, které byly vyhodnocovány automaticky pomocí softwaru ITPPro32, kalibrační parametry byly vypočítány v programu Microsoft Excel pomocí funkce *linregrese()*. V testovaném rozmezí byla odezva detektoru na koncentrace lineární, což dokazují hodnoty korelačních koeficientů (0,9842-0,9988).

LOD byl určen metodou poměru signálu k šumu $3S/N$ (podle metodických pokynů organizace ICH [55]). Nejnižší hodnotu LOD vykazovala kyselina kávová (0,018 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), následovala kyselina ferulová (0,020 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), rozmarinová (0,027 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a *p*-kumarová (0,030 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nejvyšší hodnota LOD byla zjištěna u kvercitrinu (0,035 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a kyseliny chlorogenové (0,032 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Opakovatelnost metody byla ověřena na základě měření roztoku standardů o koncentraci 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (n=6). Opakovatelnost migračních časů (RSD < 1 %) i opakovatelnost ploch píků (RSD < 2 %) byla velmi dobrá.

4.1.3.4. Aplikace metody na analýzu rostlinného materiálu

Validovaná metoda byla aplikována na identifikaci a kvantifikaci výše uvede-
ných fenolických kyselin a flavonoidu v methanolickém extraktu z listu meduňky.
Kromě látek ze standardní směsi byla v extraktu prokázána přítomnost kyseliny pro-
tokatechové, kterou zmiňují i publikované práce jiných autorů [70,71]. Přítomnost
luteolin-7-O-glukosidu, popsána Carnatem [72], nebyla v naší práci potvrzena, stej-
ně jako kyselina *p*-hydroxybenzoová a gentisová, které byly identifikovány v práci
Zgórký a Głowniaka [73].

Kvantitativní analýza analytů byla provedena přímým srovnáním ploch píků
standardů a analyzovaných látek korigovaných plochou vnitřního standardu. Srov-
nání výsledků s jinými pracemi (vesměs chromatografickými) bylo možné pouze pro
kyselinu rozmarinovou a kávovou a je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4 Srovnání výsledků kvantitativní analýzy meduňky lékařské s jinými pracemi

Metoda	Obsah kyseliny rozmarinové (mg·g ⁻¹ drogy)	Obsah kyseliny kávové (mg·g ⁻¹ drogy)
ITP-CZE	43,54	1,65
HPLC [68]	40,5	-
HPLC [74]	17,03	1,99
HPLC [70]	27,4	0,30
MSPD-LC [73]	16,8	0,09

4.2. Využití elektroforetických technik ve farmaceutické analýze

4.2.1. Stanovení polyolů v infuzních roztocích metodou kapilární zónové elektroforézy

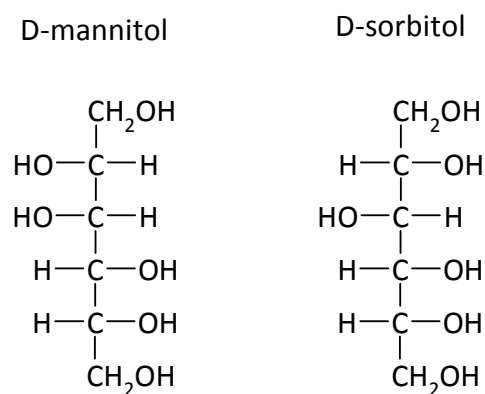
Cílem této práce bylo vypracovat metodu pro separaci a kvalitativní a kvantitativní analýzu mannitolu a sorbitolu s využitím CZE a její aplikace na komerčně vyráběné léčivé přípravky.

4.2.1.1. Analyzované látky

Mannitol a sorbitol jsou hydrofilní cukry, které obsahují šest hydroxylových skupin. Obsahují čtyři chirální centra.

Tyto polyoly jsou obecně užívány pro terapii oligurické fáze akutního renálního selhání. Při podání ve formě hypertonického infuzního roztoku snižují zadržování sodných iontů a vody, což vede ke zvýšené produkci moči a diuretickému efektu.

Oba cukry se také používají v dietních potravinách jako náhradní sladidla [75].



Obrázek 25 Chemické vzorce mannitolu a sorbitolu

4.2.1.2. Optimalizace metody

Z důvodu hodnot pK_a mannitolu a sorbitolu by bylo zapotřebí pracovat při vyšším pH pracovního elektrolytu. Aby se předešlo negativním jevům, které doprovázejí separace v silně alkalickém prostředí, byla využita komplexační schopnost tetra-boritanu sodného. Elektroforetická pohyblivost komplexů B (III) a příslušných poly-

olů umožňuje selektivní separaci a stanovení polyolů při nižším *pH* základního elektrolytu.

Protože oba cukry v UV oblasti prakticky neabsorbují, bylo pro stanovení zvoleno použití nepřímé UV detekce, kdy jsou látky detekovány jako negativní píky. Jako vhodné absorbující agens byly vyzkoušeny kyselina benzoová, sorbová, *p*-methoxybenzoová, fenylactová, 1-amino-2-naftol-4-sulfonová, 1-hydroxy-2-naftoová, *o*-chlorbenzoová a *m*-nitrobenzoová. Na základě migračních časů, ploch a symetrie píků byla jako optimální součást BGE zvolena 10 mM kyselina *m*-nitrobenzoová.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo *pH* roztoku základního elektrolytu. Bylo testováno *pH* v rozmezí 8,5-9,7. Vzhledem k délce analýzy a citlivosti bylo zvoleno jako optimální *pH* 9,3. Při testování přídavku methanolu do BGE bylo pozorováno snížení citlivosti a prodloužení celkové doby analýzy.

Jako vnitřní standard bylo testováno několik sloučenin, z kterých se jevil jako optimální xylitol.

Jako BGE byl zvolen 50mM tetraboritan sodný s přídavkem 10 mM kyseliny *m*-nitrobenzoové o *pH* 9,3 (upraveno triethylaminem).

4.2.1.3. Validace metody

Kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci pro jednotlivé analyty byly proměřeny v rozmezí 0,2 – 2,0 mg·ml⁻¹ pro mannitol i sorbitol s přídavkem vnitřního standardu xylitolu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Byly dosaženy hodnoty korelačních koeficientů 0,9998 pro mannitol a 0,9996 pro sorbitol.

LOD – určené metodou poměru směrodatné odchylky signálu a směrnice kalibrační křivky (podle metodických pokynů organizace ICH [55]) – byly 0,031 mg·ml⁻¹ pro mannitol a 0,028 mg·ml⁻¹ pro sorbitol.

Opakovatelnost migračních časů byla velmi dobrá – 0,21 % u mannitolu a 0,18 % u sorbitolu. Stejně uspokojivá byla i opakovatelnost ploch píků – 1,15 % u mannitolu a 0,74 % u sorbitolu.

Další validační parametry jsou uvedeny v kapitole 5.5.

4.2.1.4. Analýza HVLP a ověření správnosti metody

Vypracovaná metoda byla použita pro analýzu HVLP registrovaných v ČR – Infusio mannitoli a Infusio sorbitoli. Stanovení bylo provedeno přímým srovnáním infuzního roztoku a roztoku standardu. Získané výsledky byly pomocí Studentova *t*-testu porovnány s výsledky získanými jodometrickou titrací podle ČL2005 [76]. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi oběma metodami na 95% hladině spolehlivosti.

Pro výpočet výtěžnosti byly použity výsledky měření roztoku standardů, vzorku infuzního roztoku a vzorku infuzního roztoku s přidavkem standardů. Vypočítané hodnoty recovery se pohybovaly v rozmezí 99,14 – 100,32 %.

Pro analýzu infuzních roztoků obsahujících polyoly byla popsána kapilární izotachoforéza s konduktometrickou detekcí [77]. V této práci byly analyzovány infuzní roztoky obsahující sorbitol a xylitol. Součástí TE byla kyselina boritá, během analýzy byl tedy také uplatněn vznik záporně nabitých komplexů, které mohly být separovány. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozmezí 25 – 250 mg·l⁻¹ pro sorbitol a v rozmezí 50 – 500 mg·l⁻¹ pro xylitol, korelační koeficient byl 0,9988 pro sorbitol a 0,9984 pro xylitol. RSD byla 1,26 % pro sorbitol a 1,44 % pro xylitol. Analýza trvala 20 minut. Ve srovnání s ITP metodou je námi vyvinutá CZE metoda o něco méně citlivější, ale vzhledem k reálně stanovovaným koncentracím v HVLP není nižší citlivost na závadu. Metoda CZE pro analýzu polyolů je rychlejší (přibližně o osm minut) a snáze uplatnitelná v rutinním laboratorním provozu.

Mannitol, sorbitol a xylitol byly součástí směsi, která byla separována a detekována pomocí kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí při vysokém *pH* [78]. Absorpční pozadí zajišťovala 2,6-pyridindikarboxylová kyselina. Kalibrační závislost byla mezi 20-1000 mg·l⁻¹ lineární s korelačním koeficientem větším než 0,9996. RSD migračních časů nepřesáhla 0,5 %, RSD ploch však byla vyšší než 5%. Detekční limity pro uhlovodíky byly 23 - 35 mg·l⁻¹. Migrační časy polyolů se pohybovaly okolo 37 minut. Oproti této metodě nebylo v našem případě nutné pracovat ve

vysokém pH (díky komplexaci polyolů s tetraboritanem) a analýza byla výrazně rychlejší. Opakovatelnost ploch píků byla v našem případě nižší.

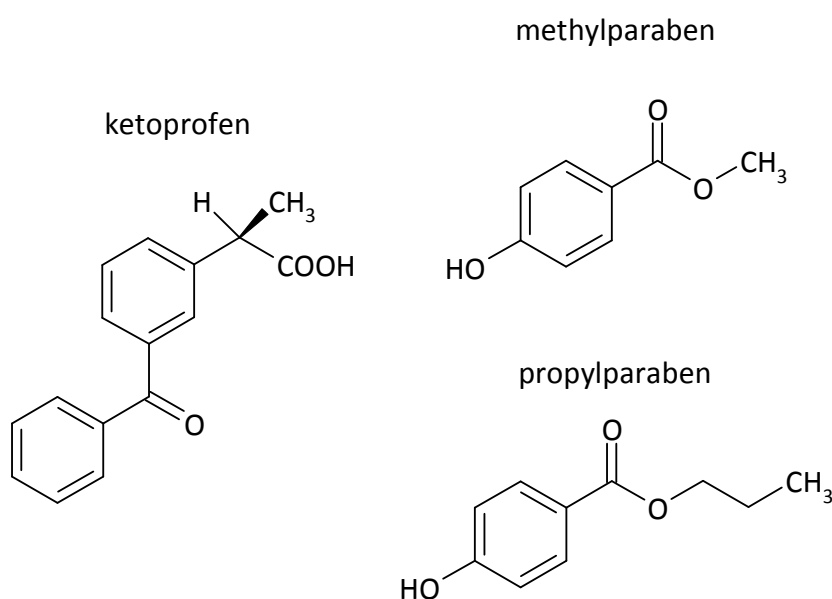
4.2.2. Separace a stanovení ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v léčivém přípravku micelární elektrokinetickou chromatografií

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro kvalitativní a kvantitativní analýzu ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu v komerčně dostupném léčivém přípravku Ketoprofen gel 2,5 % (Herbacos-bofarma, Pardubice, Česká republika).

4.2.2.1. Analyzované látky

Ketoprofen je nesteroidní antiflogistikum (NSAID) odvozené od kyseliny propionové. Účinkuje protizánětlivě, analgeticky a antipyreticky. Používá se systémově (např. při léčbě artrózy periferních kloubů) i lokálně (symptomatická léčba bolestí svalů a kloubů) [75,79].

Methylparaben a propylparaben jsou estery kyseliny *p*-hydroxybenzoové používané jako konzervační přísady v potravinách, nápojích, kosmetice a farmaceutických přípravcích. Díky synergickému účinku jsou většinou používány současně [80,81].



Obrázek 26 Chemické struktury ketoprofenu, methylparabenu a propylparabenu

4.2.2.2. Optimalizace metody

pK_a hodnoty methylparabenu (8,30 [51]) a propylparabenu (8,23 [51]) jsou podobné, ale pK_a ketoprofenu je odlišná (4,23 [51]). Jako vhodná metoda pro jejich současnou analýzu prakticky neutrálních parabenů a kyselého ketoprofenu byla vybrána MEKC.

Výběr vhodného BGE je velmi důležitý a proto bylo testováno několik různých elektrolytových systémů. Jednalo se o borátový, fosfátový a fosfát-borátový pufr, TRIS upravený různými deriváty sulfonových kyselin (MOPSO, HEPES, MES, BES, ACES a TAPS), tricinový pufr aj.

Použití organických pufrů se ukázalo jako výhodné s ohledem na délku analýzy. Úplná separace analytů však byla dosažena pouze u tricinového pufru a proto byl zvolen pro další optimalizaci.

Z možných surfaktantů byly testovány dva nejčastěji používané – dodecylsírán sodný (SDS) a cholát sodný. Z důvodu selektivity (při použití cholátu byly methylparaben a propylparaben hůře rozdělené) byl zvolen SDS.

Vliv pH^* byl testován v rozmezí pH 7,7-8,9 a jako optimální byla zvolena hodnota 8,3. Analýza byla při této hodnotě dostatečně rychlá a také rozlišení bylo nejlepší v testovaném rozmezí.

Optimalizována byla také koncentrace SDS (v rozmezí 10-60 mM), základního elektrolytu (v rozmezí 20-60 mM tricinu) a přísávek organického modifikátoru v rozmezí 0-30 % (v/v) methanolu. Pro zvýšení selektivity byl vyzkoušen přísávek α - a β -cyklodextrinu.

Jako optimální byl zvolen elektrolyt složený z 50mM tricinu, 30mM SDS, 5mM β -cyklodextrinu, 15 % (v/v) methanolu o pH^* 8,3 (upravené pomocí NaOH).

4.2.2.3. Validace metody

Kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci pro jednotlivé analyty byly proměřeny v rozmezí 2-40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro methylparaben, 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro propylparaben a 100-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro ketoprofen. Pro zvýšení přesnosti byl k jednotlivým kalibračním roztokům přidán IS (diklofenak sodný) o koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dosažené

hodnoty korelačních koeficientů (0,9999 u methylparabenu, 0,9944 u propylparabenu a 0,9969 u ketoprofenu) dokazují lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci analytů.

LOD, určené metodou poměru signálu k šumu $3S/N$ (podle metodických pokynů organizace ICH [55]), byly $0,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u methylparabenu, $0,53 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u propylparabenu a $0,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u ketoprofenu. V porovnání s publikovanou HPLC metodou [82] byla citlivost námi vyvinuté metody asi 50x nižší (ale vzhledem k reálným koncentracím ve vzorku to nebylo na závadu).

Opakovatelnost vypočítaná ze šesti měření byla velmi dobrá, u migračních časů nepřesáhla 1 %, stejně jako u ploch analytů korigovaných plochou vnitřního standardu (s výjimkou propylparabenu, který měl $RSD = 2,15 \%$).

Další validační parametry jsou uvedeny v kapitole 5.6.

4.2.2.4. Analýza HVLP a ověření správnosti metody

Metoda byla aplikována na analýzu komerčně dostupného přípravku Ketoprofen gel 2,5 % metodou vnitřního standardu. Na elektroforeogramu přípravku byly patrné tři další píky, které byly identifikovány jako složky levandulové silice obsažené v gelu, které neinterferovaly s analyty. Výsledky stanovení byly v dobré shodě s deklarovaným obsahem. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 96,56-103,86 %.

Správnost metody byla ověřena s využitím srovnávací HPLC metody vyvinuté v kontrolní laboratoři Katedry analytické chemie [83]. Byl použit Studentův t -test, který na 95 % hladině spolehlivosti neprokázal statisticky významný rozdíl mezi oběmi metodami.

5. Přílohy

5.1. Přehled publikovaných prací

5.1.1. Publikované články

1. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Spilková. *Chromatographia* 64 (2006) 37-43.
IF¹ = 1,171
2. J. Šafra, M. Pospíšilová, A. Kavalírová. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1022-1024.
IF = 2,032
3. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Honegr, J. Spilková. *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 124-132.
IF = 3,554
4. M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Šafra, I. Petriška. *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 257-263
IF = 3,554
5. J. Šafra, M. Pospíšilová, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (přijato k recenzi)
IF = 2,032

5.1.2. Postery uvedené ve sbornících

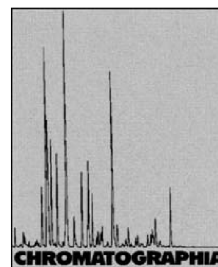
1. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Spilková: Vývoj metody ITP-CZE pro selektivní stanovení fenolických kyselin v rostlinném materiálu; Chiranal 2005, Olomouc, Česká republika, 7.2.-10.2.2005, č. posteru P30
2. M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Šafra: Determination of captopril in pharmaceuticals by capillary electrophoresis; Pittconn 2005, Pittsburgh, USA, 27.2.-4.3.2005, č. posteru 540-14P
3. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Chládek: Analýza vybraných anorganických iontů v biologickém materiálu pomocí CZE; Syntéza a analýza 2005, Brno, Česká republika, 12.9.-14.9.2005, č. posteru P81

¹ uvedené hodnoty IF jsou z roku 2006

4. J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Hašek: Development of CZE method for the analysis of phenolic acids in *Epilobium parviflorum* using stacking phenomena in electromigration; RDPA 2005, Rimini, Itálie, 24.9.-29.9.2005, č. posteru NP-P5
5. M. Pospíšilová, J. Šafra, M. Polášek: Determination of Clotrimazole and Its Degradation Product Imidazole in Spray Solution by CZE; ITP 2006, Paris, Francie, 28.-30.8.2006, č. posteru P51
6. J. Šafra, M. Urbánek, M. Pospíšilová: Využití přechodné izotachoforézy v kapilární elektroforéze pro analýzu látek s antioxidačním účinkem; Syntéza a analýza 2006, Velké Karlovice, Česká republika, 12.9.-15.9.2006, č. posteru P-70
7. J. Šafra, M. Pospíšilová, M. Pospíšil: Application of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis in Czech Republic; Joint Meeting 2006, Marburg, Německo, 4.-7.10. 2006, č. posteru Aoo8
8. J. Šafra, M. Pospíšilová: Development of CD-MEKC Method for the Analysis of Flavonoids in Commercial Ginkgo Phytopharmaceuticals; Chiranal 2007, Olomouc, Česká republika, 24.6.-27.6.2007, č. posteru P71
9. M. Pospíšilová, J. Šafra, L. Vančura: Analysis and Separation of Clotrimazole and Its Degradation Product in Pharmaceutical Preparation by Micellar Electrokinetic Chromatography; RDPA 2007, Elba, Itálie, 23.9.-26.9.2007, č. posteru P160
10. J. Šafra, M. Pospíšilová: Separation and Determination of Ketoprofen, Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical Preparation by Micellary Electrokinetic Chromatography; RDPA 2007, Elba, Itálie, 23.9.-26.9.2007, č. posteru P161
11. M. Pospíšilová, J. Šafra, J. Honegr, J. Spilková, Assay of Selected Antioxidants in Plant Extracts by On-line Coupling of Capillary Electrophoresis and Capillary Zone Electrophoresis; AAPS 2007, San Diego, USA, 11.11.-15.11.2007, č. posteru 1444

5.2. Příloha I: J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Spilková, Chromatographia 64 (2006), 37-43

Determination of Phenolic Acids in *Herba Epilobi* by ITP–CE in the Column-Coupling Configuration



CHROMATOGRAPHIA
2006, 64, 37–43

J. Šafra^{1,✉}, M. Pospíšilová¹, J. Spilková²

¹ Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic; E-Mail: jiri.safra@faf.cuni.cz

² Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

Received: 10 February 2006 / Revised: 23 March and 27 April 2006 / Accepted: 11 May 2006
Online publication: 5 July 2006

Abstract

The combination of capillary isotachopheresis (ITP) and capillary zone electrophoresis (CZE) in the column-coupling configuration has been optimized in a mode in which the background electrolyte employed in the CZE step was different from the leading and terminating electrolytes of the ITP step. The optimum composition of the electrolyte system was 0.01 M HCl, 0.02 M IMI, 0.2% HEC, pH 7.2 (leading electrolyte), 0.01 M HEPES, pH 8.2 (terminating electrolyte), and 25 mM MES, 50 mM TRIS, 30 mM boric acid, 0.2% HEC, pH 8.3 (background electrolyte). All solutions contained 20% methanol. The timing of the transfer of isotachophoretically stacked analyte zones into the CZE column was also optimized. An ITP–CZE method with UV detection at 270 nm was developed for separation of nine phenolic acids (protocatechuic, syringic, vanillic, cinnamic, ferulic, caffeic, *p*-coumaric, chlorogenic, and gentisic acids) in a model mixture and used for assay of some of these acids in a methanolic extract of *herba epilobi*. Application of ITP–CZE resulted in 100-fold better sensitivity than conventional CZE; limits of detection ranged between 10 and 60 ng mL⁻¹. When MES–TRIS–borate-based buffer, pH 8.3, was used in the CZE separation step the linearity of the ITP–CZE response was satisfactory (correlation coefficients were from 0.9937 to 0.9777). Repeatability was also satisfactory (RSD values ranged between 0.77% and 1.28% for migration times and between 1.65% and 13.69% for peak area).

Keywords

Capillary isotachopheresis
Zone electrophoresis
Phenolic acids
Plant extract
Epilobium

Introduction

The tannin-containing drug *herba epilobi* is obtained from the plant tops of *Epilobium parviflorum*, *E. montanum*, *E. roseum*, and *E. collinum* (*Oenotheraceae*). The

drug also contains sterols, flavonoids, and aromatic acids [1–3].

Few papers dealing with analysis of the active components of *herba epilobi* have been published. Aromatic acids in *herba epilobi* (ferulic, gallic, proto-

catechuic, cinnamic, caffeic, gentisic, and chlorogenic acids) have been analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE) [2]. Several methods, for example TLC and two-dimensional paper chromatography, have been used for analysis of flavonoids, sterols, and tannins in extracts of *herba epilobi* [1]. Selected flavonoids (quercetin, myricetin, etc.) have also been determined by HPLC with diode-array detection (DAD) [3]. Electromigration techniques, including CZE [4, 5] and isotachopheresis (ITP) combined with CZE [6], have been proposed for quantification of phenolic compounds in plant matrices (e.g. *Sambucus* flower, *Crataegus* leaves) and in landfill leachate. To the best of our knowledge ITP–CZE has not yet been used for assay of aromatic acids in *herba epilobi*.

CZE has attractive advantages, e.g. short analysis times, versatility, and very small amounts of solvent waste. It does, however, have disadvantages, for example unfavorable detection limits and the need to inject small sample volumes (nL) [7]. On-line combination of CZE with ITP can improve separation efficiency and reduce limits of detection, because the concentrating effect of ITP enables injection of large volumes (tens of microliters) of dilute samples. Interfering or irrelevant sample components can be removed as they leave the outlet of the ITP capillary or they can be prevented from entering the CZE capillary by flushing the pre-separation capillary

Original
DOI: 10.1365/s10337-006-0837-3
0009-5893/06/07

Chromatographia 2006, 64, July (No. 1/2)

© 2006 Friedr. Vieweg & Sohn/GWV Fachverlage GmbH

37

with background electrolyte (BGE) [6, 8–10]. It is important to choose suitable electrolyte system and find the optimum time to switch the current from the pre-separation capillary to the separation capillary [9].

The objective of this study was to develop an electrolyte system for ITP–CZE in the BGE-S-BGE arrangement ('S' denotes sample) that would be suitable for assay of aromatic acids in *herba epilobi*. The term 'BGE-S-BGE' means that the BGE used in the CZE step differs from the terminal and leading electrolytes (TE and LE, respectively) of the ITP stage [10]. This complicated arrangement has been successfully applied to the analysis of compounds of interest in plant material. The basic characteristics of the ITP–CZE method, namely repeatability, accuracy, linearity, and limit of detection, were evaluated.

Experimental

Instrumentation

ITP–CZE was performed with the EA 100 Villa Labeco CS Isotachophoretic Analyzer (Spišská Nová Ves, Slovakia) equipped with a column-switching system. Pre-separation and analytical capillaries were made from fluorinated ethylene–propylene (FEP) copolymer. The pre-separation capillary (9.0 cm long, 0.8 mm i.d.) was equipped with a conductivity detector positioned 38 mm from the bifurcation point. The analytical capillary (16.0 cm long, 0.3 mm i.d.) was operated with a conductivity detector and with an external LCD 2083 spectrophotometric detector (ECOM, Prague, Czech Republic) operated at 270 nm. Samples were injected by use of a sampling valve (30 μ L). The electrolyte chambers containing the LE and BGE were separated from the electrolytes in the capillaries by semi-permeable cellophane membranes. The PC software ITP Win Pro32 (KasComp, Slovakia) was used for control of the ITP and CZE runs and for collecting and processing experimental data. pH was measured with a PHM-220 pH-meter (Radiometer, France). UV spectra were acquired with an HP 8453 Hewlett–Packard spectrophotometer (HP, USA). A Sonorex RK 31 ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Germany) was used for degassing and sonication.

Chemicals

All chemicals used for preparation of model mixtures and electrolyte solutions were of analytical-reagent grade. α -Cyclodextrin, β -cyclodextrin, 2-hydroxyethylcellulose (HEC), 2-hydroxyisobutyric acid (HIBA), ferulic, gentisic, chlorogenic, caffeic, *p*-coumaric, protocatechuic, cinnamic, syringic, and vanillic acids, 3-(*N*-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid (MOPSO), TRIS, and methanol were obtained from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA). HEPES, imidazole (IMI), and MES were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Boric acid and *p*-nitrophenol were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). Ultrapure water, used throughout, was prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The sample of *herba epilobi* was obtained from Natura (Czech republic).

Standard and Electrolyte Solutions

A stock solution containing syringic, vanillic, protocatechuic, chlorogenic, ferulic, caffeic, *p*-coumaric, cinnamic, and gentisic acids (0.024 mg mL⁻¹ of each) was prepared in methanol. A 2.00-mL aliquot of this stock solution was transferred into a 25-mL volumetric flask, mixed with 3.00 mL methanol, and diluted to 25 mL with water, so the final model mixture contained 20% (*v/v*) methanol. All solutions were filtered through a no. 4 sintered glass filter and degassed for 15 min in an ultrasonic bath before ITP and CZE analysis. HEC was added to the leading and background electrolyte solutions. The LE, TE, and BGEs contained 20% (*v/v*) methanol.

Preparation of Plant Extract

Dried pulverized *herba epilobi* (1.5 g) was weighed into a 50-mL volumetric flask, 50.00 mL methanol was added, and the mixture was sonicated for 30 min. The resulting suspension was filtered through dry paper filter and the supernatant was diluted with water to contain 20% (*v/v*) methanol before ITP–CZE analysis.

Results and Discussion

Method Optimization

In this work, on-column ITP sample pretreatment was used before CZE separation of selected phenolic acids extracted from the plant material. Because the pK_a values of the acids were between 4 and 5 [6] and because of the presence of *ortho* dihydroxyphenyl groups in three of the analytes (caffeic, chlorogenic, and protocatechuic acids), and hence their ability to form complexes with borate [11], alkaline borate-based electrolyte systems were used.

Selection of the ITP Electrolyte System

Solutions of boric acid of pH 8.2 and Cl⁻/TRIS of pH 8.1 were initially used as the TE and LE, respectively. Use of boric acid as terminating electrolyte has drawbacks, for example generation of high voltage in the separation capillary. Negative effects of Joule heating are enhanced dispersion, formation of bubbles, and, eventually, collapse of the analysis. The composition of the ITP electrolyte system was therefore studied in detail in this work. Three different terminators with greater electrophoretic mobility than borate were tested—MES ($u_o = 26.8$), 4-nitrophenol ($u_o = 23.95$), and HEPES ($u_o = 13.3$). Unfortunately MES and 4-nitrophenol migrated too fast in the ITP system and the 4-nitrophenol (which absorbs strongly in the UV region) also negatively affected separation of the analytes in the CZE phase. Because of its effective mobility, HEPES was found to be optimum terminator and a suitable alternative to boric acid. The composition of the LE was also optimized with regard to type of counter ion—TRIS (pK_a 8.1) was replaced by IMI (pK_a 7.1). In this operational electrolyte system with an LE of pH 7.1 only the aromatic acids were transferred into the CZE capillary and uncharged sample matrix components could not interfere with the separation.

Selection of the BGE for CZE

To avoid peak-shape distortion as a result of high electromigration dispersion,

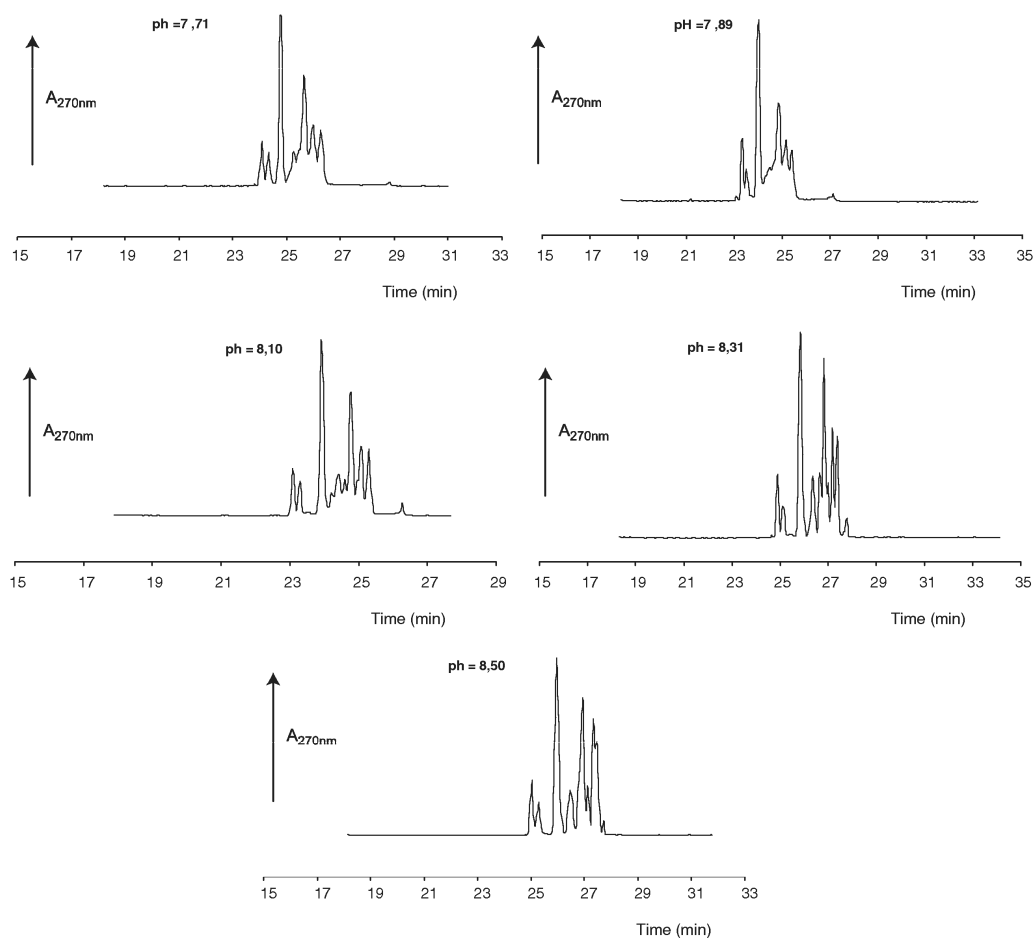


Fig. 1. Effect of pH

the effective mobility of a co-ion in the running buffer should be close to the effective mobility of the solutes. Several initial experiments and literature data [6, 12] suggested the LE or TE from the ITP phase could not be used as the BGE for CZE separation. The separation can be optimized by selection of a suitable co-ion in the electrophoretic buffer. We therefore examined three sulfonic acids (MOPSO, MES, and HEPES) and 2-hydroxyisobutyric acid (HIBA) as co-anions in the new electrophoretic buffer of pH 8.1. Some analytes migrate together and cannot be effectively resolved by CZE if the operating buffer with HEPES is used. Resolution of the analytes is the same or only slightly better when using HIBA or MOPSO. The best separations with fairly sharp peaks were achieved in the system with MES as the BGE co-ion.

Effect of pH

The effect of running buffer pH (7.71, 7.89, 8.10, 8.31, or 8.50) on the quality of separation of the compounds was investigated. At pH 7.71 and 7.89 the slowly migrating analytes remained unresolved whereas from pH 8.10 resolution began to improve. The best resolution was achieved at pH 8.31 and 8.50 (Fig. 1). At this stage only separation quality was monitored, so the peaks were not identified.

Effect of Boric Acid

Addition of boric acid to BGEs may affect the separation of compounds containing vicinal hydroxy groups on the aromatic ring, because of the formation

of borate complexes. Thus caffeic, protocatechuic, and chlorogenic acids can form charged (uninegative) borate complexes. The effect of seven different concentrations of boric acid (0, 10, 15, 20, 30, 40, and 50 mM) on peak resolution was examined. In the absence of boric acid protocatechuic and caffeic acids migrated together with the slowly-migrating acids. Addition of 10 mM borate to the BGE affected the migration of these two acids—they migrated with shorter migration times, most probably because of the formation of negatively charged complex species. Interestingly, in the presence of borate the order of migration of the high-molecular-weight chlorogenic acid did not change, and this acid migrated as the last of all the analytes. Similar results were obtained with 15 and 20 mM boric acid, and the optimum

Table 1. Time and current regime of the analysis

Mode	Step	Current	Duration	Capillary
ITP	1	200 μ A	Start + 100 s from the step of CO_3^{2-}	Preseparation
	2	100 μ A	70 s	
Current switching				
Transmigration	3	50 μ A	210 s	From preseparation to analytical
Replacement of electrolytes				
CZE	4	50 μ A	90 s	Analytical
	5	200 μ A	To the end of the analysis	

Table 2. Overall ITP–CZE migration times of the analytes

Analyte	t_R (min)
Protocatechuic acid	25.3
Caffeic + gentisic acids	25.8
Cinnamic acid	26.7
Vanillic acid	27.2
Coumaric acid	27.6
Syringic acid	27.9
Ferulic acid	28.2
Chlorogenic acid	28.6

concentration was found to be 30 mM. The quality of the separation was impaired by further increasing the borate concentration to 40 and 50 mM. Higher concentrations of boric acid also resulted in prolongation of migration times.

Effect of Cyclodextrins

Because the type and concentration of selectors are important conditions in CZE separations, the effect of α - and β -cyclodextrin at 5, 10, and 15 mM was studied. Addition of α -cyclodextrin resulted in better quality separation than β -cyclodextrin. The best resolution of all the analytes was achieved by use of 10 mM α -cyclodextrin.

Time and Current Mode

The period during which analytes transmigrate from the preseparation capillary into the analytical capillary and the electrolyte system is changed to CZE mode is a critical moment during the analysis [7]. Optimum time and current mode was established after numerous ITP–CZE analyses. The optimum time and current regime is presented in Table 1. The separation unit for on-line combination of capillary isotachopheresis in the column-coupling arrangement has been described

in more detail elsewhere [12] and principles of ITP–CZE and instrumental arrangements are also explained elsewhere [13].

Qualitative Analysis

Results from qualitative analysis are summarized in Table 2. The optimum BGE for the CZE separation was of pH 8.3 and contained 25 mM MES, 50 mM TRIS, 0.2% HEC, 30 mM H_3BO_3 , and 10 mM α -cyclodextrin. Protocatechuic acid was the fastest migrating analyte followed by caffeic and gentisic acids, which were, unfortunately, unresolved (i.e. comigrated). Complex-formation with boric acid is the probable reason for the rapid migration of caffeic and protocatechuic acids. Chlorogenic acid seemed to be the slowest analyte, with problematic repeatability of both migration time and peak area.

The electropherogram obtained from the model mixture is presented in Fig. 2.

Calibration Data

Calibration data were evaluated for all the analytes under investigation, using the optimum BGE described above. The concentration ranges of the calibration solutions were 0.192 to 1.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for protocatechuic, vanillic, coumaric, syringic, and ferulic acids, 0.384 to 3.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for caffeic, chlorogenic, and gentisic acids, and 0.096 to 0.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for cinnamic acid.

As is conventional, peak area was taken as the response variable for quantification. Regression analysis of the calibration data was performed by use of Microsoft Excel. The results obtained are summarized in Table 3. Good linear relationships were obtained between peak

area and analyte concentration; correlation coefficients were between 0.9977 and 0.9937. The method was least sensitive for chlorogenic acid.

Limits of Detection and Quantification

Limits of detection (LOD) were evaluated, on the basis of signal-to-noise ratio (S/N), by comparing signals from samples containing known low concentrations of analytes with those from blank samples, and establishing the minimum concentrations at which the analytes could be reliably detected. A signal-to-noise ratio between 3:1 and 2:1 is usually regarded as acceptable for estimating detection limit. [14]; $S/N = 3$ was chosen in this work. $S/N = 10$ was chosen for limit of quantification (LOQ).

LOD values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) increased in the order 0.005 for cinnamic acid, 0.010 for coumaric acid, 0.021 for ferulic acid, 0.026 for syringic acid, 0.034 for caffeic acid, 0.041 for protocatechuic acid, 0.044 for vanillic acid, and 0.061 for chlorogenic acid. LOQ values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) increased in the order 0.017 for cinnamic acid, 0.033 for coumaric acid, 0.069 for ferulic acid, 0.086 for syringic acid, 0.112 for caffeic acid, 0.135 for protocatechuic acid, 0.145 for vanillic acid, and 0.201 for chlorogenic acid.

Repeatability

The repeatability of migration times and the peak areas was evaluated from results from six replicate measurements. The relative standard deviations (RSD) obtained are listed in Table 4. Repeatability of migration times was fairly good; RSD values did not usually exceed 1% except for chlorogenic acid. Peak area repeatability was also relatively satisfactory—RSD were <5% for most of the analytes. The worst repeatability was obtained for chlorogenic acid.

Analysis of Plant Material

The volume of methanolic plant extract injected in ITP–CZE analysis was 30 μL . The ballast compounds present in the extract were diverted to the auxiliary electrode during the ITP preseparation step whereas the analytes of interest were

stacked and then transferred to the analytical capillary. Identification of each compound in the extract was achieved by addition of a small amount of standard, which resulted in an increase of the height of the appropriate peak. The results were in good agreement with those of other authors [2]. An electropherogram obtained from a plant extract is presented in Fig. 3.

Determination of the Constituents of *Herba Epilobi* Extract

Quantification of some of the compounds was accomplished by the external standard method. Peak areas for standards in the model mixture and for peaks appearing in the electropherogram of the *herba epilobi* extract were compared. Unfortunately these quantitative results could not be compared with those reported by other authors, because most performed qualitative analysis only. It is necessary to note that caffeic and gentisic acids were not separated by the proposed ITP-CZE method and so the amounts of these analytes were calculated as caffeic acid. This presumably explains why caffeic acid was discovered in this work to be the major phenolic acid present in the extract whereas cinnamic acid was the least abundant component. Results obtained from quantification of plant-extract components are summarized in Table 5.

The Comparison of ITP-CZE with CZE

Several papers have been published on the CZE determination of phenolic acids in plant materials and in food [15–18]. Exact comparison of the analytical merits of such methods with those of our proposed ITP-CZE method is rather difficult, because some of the aromatic acids analyzed were different. It is, nevertheless, possible to compare the ITP-CZE and CE methods with regard to complexity of sample pretreatment, sensitivity, and analysis time.

CZE assay of cinnamic, sinapic, chlorogenic, syringic, ferulic, benzoic, *p*-coumaric, vanillic, *p*-hydroxybenzoic, rosmarinic, caffeic, gallic, and protocatechuic acids in *Bromus inermis* [15] involved Soxhlet extraction then SPE

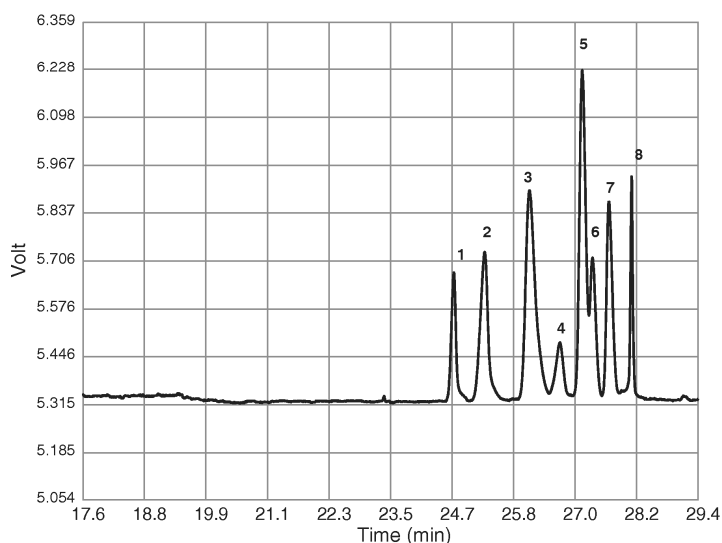


Fig. 2. Electropherogram obtained from a standard mixture: 1 = protocatechuic acid, 2 = caffeic + gentisic acids, 3 = cinnamic acid, 4 = vanillic acid, 5 = coumaric acid, 6 = syringic acid, 7 = ferulic acid, 8 = chlorogenic acid. The BGE consisted of 25 mM MES, 50 mM TRIS, 30 mM H_3BO_3 , 10 mM α -cyclodextrin, 0.2% HEC, and 20% (*v/v*) methanol, pH 8.3

Table 3. Calibration data for the analytes

Analyte	Calibration plot $y = kx + q$	s_k	s_q	r	$s_{residual}$
Protocatechuic acid	$y = 2512.73x - 13.70$	97.07	116.63	0.9977	138.67
Caffeic + gentisic acids	$y = 2318.73x + 120.84$	100.49	239.70	0.9972	285.01
Cinnamic acid	$y = 14235.27x + 1026.60$	633.94	383.01	0.9970	455.41
Vanillic acid	$y = 1796.67x + 89.14$	81.13	98.52	0.9970	117.15
Coumaric acid	$y = 7729.79x + 439.71$	430.36	512.39	0.9954	609.22
Syringic acid	$y = 3507.81x + 129.01$	174.87	205.12	0.9963	243.89
Ferulic acid	$y = 5074.25x - 84.61$	271.56	325.99	0.9957	387.60
Chlorogenic acid	$y = 1081.42x + 213.27$	70.53	167.20	0.9937	198.00

y is peak area, x the concentration in $\mu g mL^{-1}$, s the standard deviation, and r the correlation coefficient

Table 4. Repeatability of migration times and peak areas

Analyte	RSD (% , $n = 6$)		Concentration ($\mu g mL^{-1}$)
	Time	Area	
Protocatechuic acid	0.78	3.59	0.96
Caffeic + gentisic acids	0.77	4.16	1.92
Cinnamic acid	0.82	2.14	0.48
Vanillic acid	0.85	1.65	0.96
Coumaric acid	0.91	4.42	0.96
Syringic acid	0.96	2.40	0.96
Ferulic acid	1.01	5.13	0.96
Chlorogenic acid	1.28	13.69	1.92

RSD is the relative standard deviation

purification of the extract before analysis. Sonication with methanol for 10 min has been used for analysis of protocatechuic, salicylic, *p*-hydroxybenzoic, vanillic, syringic, *p*-coumaric, ferulic, and sinapic acids in food and drink

(cereals, wine, beer) [16, 17]; the extract had to be centrifuged, the liquid phase was filtered through a 0.45 μm membrane filter, the filtrate was evaporated to dryness by rotary evaporation, and the dry residue was redissolved in

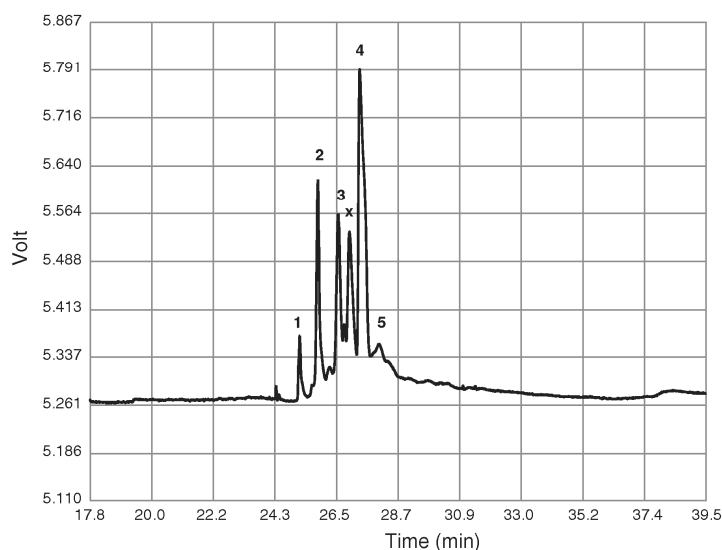


Fig. 3. Electropherogram obtained from a plant extract: 1 = protocatechuic acid, 2 = caffeic + gentisic acids, 3 = cinnamic acid, x = not identified, 4 = coumaric acid, 5 = ferulic acid. Conditions were as for Fig. 2

Table 5. Determination of phenolic acids in *Herba Epilobi*

Compound	Acid Content (mg g ⁻¹ pulverized drug) ± RSD [%], n = 3)
Protocatechuic acid	0.07 ± 3.07
Caffeic + gentisic acids*	0.65 ± 5.02
Cinnamic acid	0.06 ± 1.95
Coumaric acid	0.28 ± 8.88
Ferulic acid	0.13 ± 5.41

* Expressed as caffeic acid

methanol. Inuma and Herrmann developed a CE-ESI-MS method for determination of vanillic, cinnamic, 4-hydroxycinnamic, 3-hydroxy-4-ethoxybenzoic, ferulic, and sinapic acids in mixtures of standards only, so no sample pretreatment was needed [18].

In our study the plant material was sonicated with methanol for 30 min and the extract was merely filtered through paper and diluted with water before ITP-CZE. Such simple sample pretreatment was possible because during the ITP step any interfering and irrelevant sample components could be removed from the system by on-line diversion to the side electrode.

The LODs achieved by use of our ITP-CZE method for phenolic acids (0.005–0.061 µg mL⁻¹) were better than those of single CZE (0.02–0.12 µg

mL⁻¹ [15], 0.04–0.07 µg mL⁻¹ [16, 17], and 0.015–0.168 g µmL⁻¹ [18]).

RSD of peak areas were similar to or better than in other work (1.56–4.23% [15], <5.4% [16], <4.8% [17], and 5–8.8% [18]). There was no significant difference between RSD of migration times in our work and those reported elsewhere.

Although the separation time (25 min) in the proposed ITP-CZE method is longer than for other methods (less than 10 min [15] and less than 3.5 min [16, 17]), it must be noted that this is, in practice, compensated by the simpler sample treatment.

The calibration range in our work was similar to that reported elsewhere (0.1–100 µg mL⁻¹ [16, 17]).

Finally, it must be stated that, in contrast with classical CZE, the proposed ITP-CZE technique requires operation by a very skilled analyst and is not extremely robust or ideal for routine laboratory analysis. It may, however, presumably be useful in special instances when complicated off-line sample pretreatment must be avoided. The main value of this work consists in the practical introduction to analytical practice of the previously theoretically considered [10] but until now not well-established BGE-S-BGE electrolyte system, which can facilitate analysis of complex biological

or plant samples without sample pretreatment.

Conclusion

Most previously published HPLC or CZE methods for assay of aromatic acids in plant materials [2, 4, 19] typically involve sample pre-concentration. The pre-concentration steps usually consists of several repeated operations that are laborious and time-consuming. Substantial enhancement of detection sensitivity in CZE has now been achieved on the basis of isotachophoretic sample pretreatment before CZE separation.

A model mixture of nine aromatic acids was separated by ITP-CZE in on-line column-coupling mode without any off-line pre-concentration steps. Limits of detection were between 5 and 60 ng mL⁻¹.

This ITP-CZE system was used to determine the amounts of protocatechuic, caffeic, gentisic, cinnamic, coumaric, and ferulic acids in *herba epilobi* by direct analysis of a methanolic extract of the drug. Although the method is selective and sensitive, it is complicated; despite this it could be used as an alternative to HPLC methods for analysis of plant constituents.

Acknowledgement

This work was supported by the Grant Agency of Charles University, No. 306/2005/BCH, the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR8964-3/2006, and by MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

References

- Spilková J, Johánková M, Dušek J (1995) *Ceská a Slov Farm* 44:196–200
- Hierman A, Radl B (1998) *J Chromatogr A* 803:311–334
- Slacanin I, Marston A, Hostettmann K, Delabays N, Dabellay C (1991) *J Chromatogr* 557:391–398
- Jianming X, Zuliand C, Jimmy C, Tang C (2002) *J Chromatogr A* 942:289–294
- Jen-Fon J, Yean-Hwa H, Maw-Rong L (1996) *J Chromatogr A* 734:375–380
- Urbánek M, Pospíšilová M, Polášek M (2002) *Electrophoresis* 23:1045–1052
- Křivánková L, Boček P (1997) *J Chromatogr B* 689:13–34
- Křivánková L, Gebauer P, Boček P (1995) *J Chromatogr A* 716:35–48
- Kaniánský D, Marák J, Láštinec J, Rejčenga JC, Onuska FI (1999) *J Microcolumn Sep* 11:141–153

10. Křivánková L, Gebauer P, Thormann W, Mosher RA, Boček P (1993) *J Chromatogr* 683:119–135
11. Sillén GL, Martell AE (1964) Stability constants of metal-ion complexes. The Chemical Society, London
12. Urbánek M, Blechtová L, Pospíšilová M, Polásek M (2002) *J Chromatogr A* 958:261–271
13. Urbánek M, Křivánková L, Boček P (2003) *Electrophoresis* 24:466–485
14. International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Validation of analytical methods: methodology. ICH Q2B
15. Štrbová D, Vlček J, Kubáň V (2005) *J Sep Sci* 29:308–313
16. Hernández-Borges J, González-Hernández G, Borges-Miquel T, Rodríguez-Delgado MA (2005) *J Food Chem* 91:105–111
17. Hernández-Borges J, González-Hernández G, Borges-Miquel T, Rodríguez-Delgado MA (2005) *Chromatographia* 62:271–276
18. Iinuma Y, Herrmann H (2003) *J Chromatogr A* 1018:105–115
19. Jirovský D, Horáková D, Kotouček M, Valentová K, Ulrichová J (2003) *J Sep Sci* 26:739–742

**5.3. Příloha II: J. Šafra, M. Pospíšilová, A. Kavalírová, J.
Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006), 1022-1024**

Short communication

Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids

Jiří Šafra*, Marie Pospíšilová, Andrea Kavalírová

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 17 October 2005; received in revised form 9 January 2006; accepted 10 January 2006
Available online 20 February 2006

Abstract

Eight phenolic acids were analyzed by capillary zone electrophoresis. On-line analyte preconcentration was carried out by hydrodynamic injection of large volume of sample followed by removal of the bulk of the low conductivity sample matrix by polarity switching. The optimal electrolyte system consisted of 50 mM sodium tetraborate of pH 9.0 (adjusted with 0.1 M phosphoric acid) containing 2% of α -cyclodextrin. The separations were carried out with a fused silica capillary (effective length 50 cm, i.d. 50 μ m) and monitored at 200 nm. Under optimized preconcentration conditions (sample injection 99 s at 100 mbar and the polarity switching time 1.0 min) linear calibration ranges (0.1–2.0 μ g/ml, $R=0.9979$ – 0.9995), favourable limits of detection (0.01–0.025 μ g/ml) and good repeatability of the peak areas (R.S.D.: 2.76–5.69%, $n=6$) were achieved.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Large-volume sample stacking; Stacking; Phenolic acids; Capillary electrophoresis

1. Introduction

The aim of the presented work was to develop CZE method for the determination of eight phenolic acids with antioxidant activity in *Herba epilobi*.

1.1. Large-volume sample stacking with polarity switching

Large-volume sample stacking technique with polarity switching mode was used to enhance the detection sensitivity in CZE. Initially a large plug of low conductivity sample was introduced hydrodynamically into the capillary and a negative voltage was applied. The large solvent plug was then electroosmotically pushed out of the capillary while the negative species stacked up at the boundary between the sample zone and the background electrolyte (BGE). Once the major part of the low conductivity zone has been pushed out of the capillary, the positive voltage was applied for the separation. The time of polarity switching was determined by monitoring the driving current value. As soon as the current reached the value close to the original one (about 95–99%), the polarity was switched [2–4].

1.2. Compounds under study

The studied antioxidants can be divided into two groups: derivatives of benzoic acid (vanillic, syringic and gentisic acids) and derivatives of cinnamic acid (cinnamic, *p*-coumaric, caffeic, ferulic and chlorogenic acids). These acids occur in *H. epilobi* and are responsible for the antioxidant effect of the plant.

The active compounds of *H. epilobi* were determined earlier by different techniques. Hiermann and Radl developed a CZE method using a fused silica capillary, phosphate buffer of pH 7.0 and UV detection for the analysis of aromatic acids occurring in plant extracts [1]. The polyphenolic metabolites were analyzed by RP-HPLC with UV and MS detection [5]. Gallotannins, ellagotannins and flavonoids were studied by HPLC-MS [6] and the HPLC with UV and MS detection was used for the analysis of flavonoid glycosides in various *Epilobium* species [7].

2. Experimental

2.1. Apparatus

Capillary electrophoretical system P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter equipped by PDA was used. Communication with PC and analysis control was supported by 32 Karat Software 4.01.

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 482.
E-mail address: jiri.safra@faf.cuni.cz (J. Šafra).

The separations were performed in fused silica capillary, i.d. 50 μm and total length 60 cm (effective length 50 cm).

2.2. Reagents

All chemicals were of analytical grade quality. Cinnamic, gentisic, coumaric, ferulic, vanillic, syringic and caffeic acids, α -cyclodextrin and methanol Chromasol[®] for HPLC were provided by Sigma–Aldrich. Sodium tetraborate and phosphoric acid were obtained from Lachema Brno.

Standard solutions of above mentioned aromatic acids (100 mg/ml) were prepared by dissolving these compounds in 50.00 ml of methanol and degassed in ultrasonic bath. This stock solution was diluted with water to contain 10% (v/v) of methanol. The electrolyte consisted of 50 mM sodium borate buffer with pH 9.0 containing 2% of α -cyclodextrin.

3. Results and discussion

3.1. CZE with a standard hydrodynamic injection process (injection volume representing 1% of the overall capillary volume)

Alkaline BGE based on a borate buffer was employed to achieve ionization of the carboxylic and phenolic groups of the analytes and possibly to enhance separation of the analytes through complex formation of borate with vicinal –OH groups of dihydric phenols [8]. The effect of concentration of borate, α -cyclodextrin and of the content of methanol in the BGE was tested. The electropherogram of conventional CZE is shown in Fig. 1A.

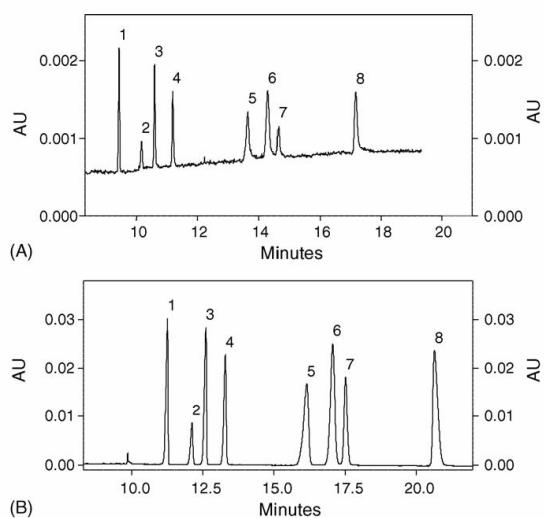


Fig. 1. Electropherogram of standard mixture ($c = 2 \mu\text{g/ml}$): (A) classical CZE and (B) CZE using large-volume sample stacking with polarity switching (for conditions see Section 3.1). (1) Cinnamic acid, (2) chlorogenic acid, (3) *p*-coumaric acid, (4) ferulic acid, (5) caffeic acid, (6) gentisic acid, (7) syringic acid and (8) vanillic acid.

3.1.1. Effect of borate concentration

Chlorogenic acid and caffeic acid form complexes with borate. It is caused by *ortho*-dihydroxyphenyl moieties in their structures. Effect of borate concentration was tested at pH 9 for 10, 30, 50 and 70 mM borate. Optimum peak symmetry and peak area were achieved with 50 mM borate.

3.1.2. Effect of pH

The pH of BGE is an important parameter influencing electroosmotic flow and ionization of analytes and thus it may act selectively to change the electrophoretic mobility of analytes. The effect of pH was examined with the borate-containing BGEs of pH 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2 and 9.4. The pK_a values of the phenolic acids under study range between 4 and 5 and hence they are fully ionized in such BGEs [8,9]. Poor resolution of all analytes was observed below pH 9.0. Increasing pH above 9.0 resulted in longer analysis times. Therefore, pH 9.0 was selected as the optimum choice giving best results in terms of the resolution of the acids of interest.

3.1.3. Effect of addition of methanol

It is known that the content of methanol in BGE affects analysis time, peak symmetry and resolution. With the increasing methanol content in the BGE from 5% to 20% (v/v) the migration times of the analytes increased and the baseline quality and the resolution worsened. Therefore, in further experiments the BGE without the addition of methanol was used.

3.1.4. Effect of α -cyclodextrin

The separation quality was significantly influenced by the addition of 2–5% of α -cyclodextrin into the BGE of pH 9. The migration times and order of acids changed considerably and all the compounds were separated to baseline and the total analysis time was acceptable. Optimum content of α -cyclodextrin in the BGE was 2%.

3.2. CZE with a large-volume sample hydrodynamic injection, followed by the removal of the large plug of low conductivity sample matrix from the capillary using polarity switching (injected sample volume representing 70% of the capillary volume)

Cinnamic acid was chosen as a model standard to find suitable pressure, sample injection time and polarity switching time to increase the sensitivity of the method.

Hydrodynamic injections were performed under pressures ranging from 50 to 200 mbar for 99 s. The best results were achieved at 100 mbar, which corresponds to an injected volume representing 70% of the capillary volume.

The polarity was switched as soon as the experimental current reached 95% of its standard value observed during conventional CZE separation performed with the same BGE. The electropherogram of standards mixture obtained using large-volume sample stacking is shown in Fig. 1B.

Table 1
Calibration parameters and relevant analytical data of CZE method using large-volume sample stacking with polarity switching

Acid	Calibration curve, $y = kx + q$	s_k	s_q	r	s_{residual}	Time (min) \pm R.S.D. (%)	Area R.S.D. (%)
Cinnamic	$y = 77585x - 2439$	1685	2065	0.9993	2560	10.77 \pm 0.50	2.76
Chlorogenic	$y = 26418x - 2734$	957	1173	0.9980	1454	11.55 \pm 0.58	3.53
Coumaric	$y = 77029x - 3346$	3856	4725	0.9983	5857	12.01 \pm 0.86	3.50
Ferulic	$y = 63113x - 2475$	2165	2654	0.9982	3290	12.64 \pm 0.94	2.93
Caffeic	$y = 107467x - 6599$	1880	2304	0.9995	2856	15.08 \pm 0.85	4.11
Gentisic	$y = 14020/x - 6994$	2553	3129	0.9995	3879	15.89 \pm 1.07	3.37
Syringic	$y = 76853x - 7742$	2949	3614	0.9979	4479	16.37 \pm 1.34	5.69
Vanillic	$y = 141081x - 10104$	3688	4519	0.9990	5602	19.08 \pm 1.62	3.74

y , Corrected peak area; x , concentration in $\mu\text{g/ml}$; s , standard deviation.

3.3. Comparison of conventional CZE and CZE with large volume sample stacking

According to our results the corrected peak areas (peak area/migration time) increased by the factor of 40 compared to the peak areas obtained by conventional CZE. No drifting of the baseline was observed during the CZE separations with large-volume sample stacking.

4. Method validation

4.1. Calibration parameters

The calibration was carried out with five standard solutions containing 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ of each analyte and relevant pieces of information are given in Table 1.

4.2. LOD and LOQ

LOD ($S/N=3$) and LOQ ($S/N=10$) were found to be 0.01 and 0.033 $\mu\text{g/ml}$ for cinnamic, *p*-coumaric, ferulic, gentisic and syringic acids. The same values for caffeic and vanillic acid were 0.02 and 0.066 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The highest values were obtained for chlorogenic acid (0.025 and 0.083 $\mu\text{g/ml}$).

4.3. Repeatability

Solution of standard acids containing 1 mg/ml of analytes was repeatedly ($n=6$) injected. Repeatability data are included in Table 1.

The repeatability of the results, expressed by the relative standard deviation of six CZE measurements is satisfactory. The R.S.D. values of migration times do not exceed 2% whereas R.S.D.s of peak areas are lower than 5% except of syringic acid (R.S.D. = 5.69%).

4.4. Resolution

Resolutions of neighbouring peaks were calculated using 32 Karat Software 4.01. The resolution factor (R_s) values determined at optimal conditions were 3.1 for the cinnamic–

chlorogenic acid peaks, 2.0 for chlorogenic–coumaric acid peaks, 2.3 for coumaric–ferulic acid peaks, 5.9 for ferulic–caffeic acid peaks, 1.7 for caffeic–gentisic acid peaks, 1.4 for gentisic–syringic acid peaks and 6.9 for syringic–vanillic acid peaks.

5. Conclusions

Large-volume sample stacking with polarity switching has proved to be a powerful tool for sensitivity enhancement in CZE analysis of selected aromatic acids. A 40-fold sensitivity enhancement was attained for the quantitative analysis of extremely diluted analytes in low conductivity matrices. The proposed method is intended for the identification and assay of the listed phenolic acids in the methanolic extract of *H. epilobi*.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of Charles University No. 306/2005/BCH, Internal grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. NL/7689-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

References

- [1] A. Hiermann, B. Radl, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 311–314.
- [2] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 281–289.
- [3] M. Urbánek, L. Křivánová, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466–485.
- [4] J.J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, G. Castaneda Penalvo, N. Rodríguez Farinas, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 279–286.
- [5] B.H. Heba, A.M.S. Husseina, M.S. Marzouk, I. Merfort, M. Linscheid, M.A.M. Nawwar, *Phytochem.* 46 (1997) 935–941.
- [6] M.A.M. Nawwar, M.S. Marzouk, W. Nigge, M. Linscheid, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 645–654.
- [7] B. Ducrey, J.L. Wolfender, A. Arston, K. Hostettmann, *Phytochem.* 38 (1995) 129–137.
- [8] M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Poláček, *Electrophoresis* 23 (2002) 1045–1052.
- [9] E.P. Serjeant, B. Dempsey, *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, IUPAC Chemical Data Series No. 23, Pergamon Press, Oxford, 1979.

5.4. Příloha IV: J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Honegr, J. Spilková, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 124–132

Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration

Jiří Šafra^{a,*}, Marie Pospíšilová^a, Jan Honegr^a, Jiřina Spilková^b

^a Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Pharmacognosy, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic

Received 17 July 2007; received in revised form 6 September 2007; accepted 12 September 2007

Available online 16 September 2007

Abstract

A method utilising isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column coupling configuration with UV detection at 320 nm was developed for separation and determination of five phenolic acids (rosmarinic, *p*-coumaric, ferulic, caffeic and chlorogenic) and flavonoid quercitrin in a methanolic extract of *Melissae herba*. The proposed method has been validated with correlation coefficients from 0.9842 to 0.9988, RSD values between 0.39% and 0.83% for migration times and between 0.40% and 2.05% for peak areas.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Capillary isotachopheresis; Zone electrophoresis; Phenolic acids; Rosmarinic acid; Quercitrin; *Melissae herba*

1. Introduction

The drug *Melissae herba* is obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (Lamiaceae) [1]. It contains triterpenes and phenolic acids derived from caffeic acid, dimers such as rosmarinic acids, and trimers such as melitric acids; flavonoids (quercitrin, rhamnocitrin, etc.) and glycosides of monoterpenes and of aromatic alcohols; monoterpenoid aldehydes, terpenoids and others [2,3]. This drug is traditionally used for the symptomatic treatment of gastrointestinal disturbances, as an adjunctive therapy for the painful component of functional dyspepsia and for the symptomatic treatment of neurotonic disorders in the adults and in the children, for example in case of minor sleeplessness [3].

Rosmarinic acid is the main component derived from hydroxycinnamic acid (it could be also used for expressing the total amount of phenolic acid in *M. herba*). Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid. It has a number of interesting biological activities, e.g. antiviral, antibacterial, antiinflammatory and antioxidant. It is

commonly found in species of the Boraginaceae or Lamiaceae [2–5].

A few papers dealing with the analysis of the active components of *M. herba* have been published. Rosmarinic, chlorogenic, protocatechuic, gentisic, *p*-hydroxybenzoic, caffeic, vanillic, syringic, *p*-coumaric and ferulic acids in different qualitative and quantitative proportions depending on the plant examined were determined by the method combining solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography (methanolic extracts were evaporated to dryness, diluted with 30% aqueous methanol and passed under vacuum through conditioned octadecyl BakerBond solid-phase extraction (SPE) microcolumns; for quantitative analysis of rosmarinic acid, an isocratic solvent system of acetonitrile/water/acetic acid (20:80:1, v/v/v) and detection at 280 nm was used. Other phenolic acids were analysed with a mobile phase of methanol/water/acetic acid (25:75:1, v/v/v), detection at 254 nm and constant flow rate) [6].

The qualitative and quantitative composition of the main aromatic and polyphenolic constituents of the infusion of *M. officinalis* were examined by GC–MS and HPLC using gradient elution and diode array detection (DAD) [7].

The extraction of antioxidants from *M. officinalis* leaves with ethanol and identification of individual antioxidants (carnosic,

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 482.

E-mail address: jiri.safra@faf.cuni.cz (J. Šafra).

ursolic and oleanolic acids) by high performance liquid chromatography with UV detection at 230 nm has been described in [8]. The mobile phase was a mixture of acetonitrile–water 65:35 (v/v) containing 0.5% phosphoric acid and 1 mM EDTA. Effects of particle size, amount of organic modifier and temperature on the extraction rates and concentrations of antioxidants in the extracts were studied and kinetics was determined [8].

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) was used for sample preparation of *M. officinalis* prior to liquid chromatography of rosmarinic, caffeic and protocatechuic acids as phenolic compounds present in this herb. The mobile phase was methanol–water (pH 2.5), pumped at a flow rate of 0.4 mL min^{-1} , with a linear gradient composition increasing from 15% methanol to 75% methanol [9].

HPLC analysis of phenolic acids (rosmarinic, caffeic and protocatechuic acid) in *M. officinalis* using mobile phase composed of mixture of methanol–water (pH 2.5, adjusted with phosphoric acid) with detection at 260, 280 and 330 nm has been presented in [10].

The structures of interest of this work are presented in Fig. 1.

Some articles dealing with the determination of rosmarinic acid in plant materials other than *M. herba* have been also published. An HPLC method for the determination of rosmarinic and caffeic acids in several aromatic herbs (rosemary, sage, thyme, spearmint, balm, and lavender) using C18 reversed-phase column, a gradient elution system of methanol–water containing orthophosphoric acid, and a photodiode array detector has been described in [11]. Moreover the HPLC was used for the determi-

nation of rosmarinic acid in some other plant materials including *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) [12]; *Lavandula vera* and *officinalis* (Lamiaceae) [13,14]; *M. officinalis* (Lamiaceae) [15]; *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) [16]. Chromatographic techniques (HPLC, GC) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) – electrophoretic method utilising chromatographic principles – were applied for enantioselective separation of rosmarinic acid in *Hedera helix* (Araliaceae) [17]. A TLC-densitometric method has been employed for simultaneous determination of rosmarinic and caffeic acids in five *Salvia* species [18].

Carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid and other unidentified phenolic compounds in rosemary were separated by capillary zone electrophoresis (CZE) using a 40-cm capillary and a 20 mM tetraborate buffer (pH 9.0); a UV diode array detector and mass spectrometry were utilized [19]. CZE method has been also evaluated for the analysis of honey samples of different floral origin. All the phenolics were separated on a fused-silica column ($50 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$) by using 100 mM sodium borate buffer (pH 9.5) containing 20% of methanol [20]. Moreover the CZE with UV detection was employed in analysis of rosmarinic acid in *Salvia officinalis* [21,23] and in rosemary [22]. All methods employed borate buffer at relatively high pH (9.0–9.6).

In rosemary, hesperetin, acacetin, diosmetin, apigenin, luteolin and ferulic, rosmarinic and caffeic acids were analyzed by CZE coupled with electrochemical detection (ED) [24]. CZE-ED using 50 mM borate buffer (pH 8.7) was developed for the analysis of isovanillic, vanillic, rosmarinic, caffeic and protocatechuic acids and quercetin in *Origanum vulgare* (Lamiaceae) and its medicinal preparation [25]. CZE-ED in borate buffer was

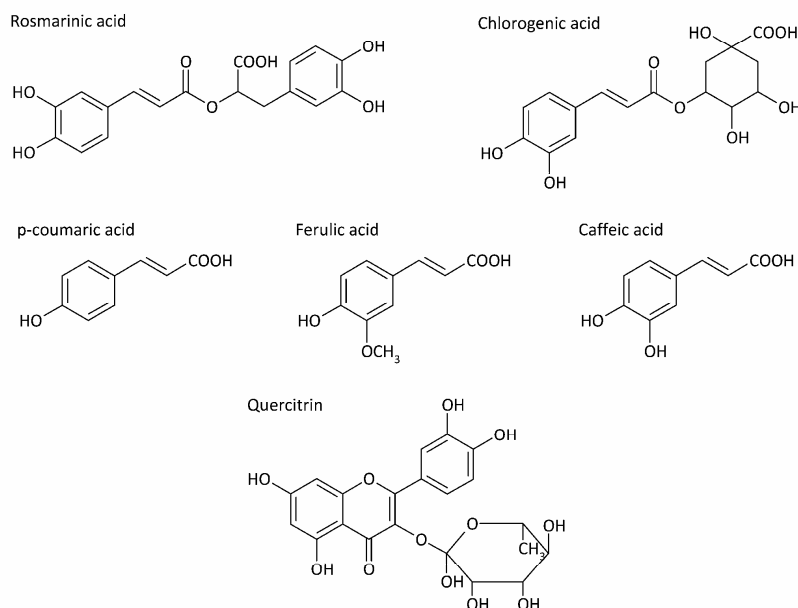


Fig. 1. Structure of the investigated compounds. Two enantiomers of rosmarinic acid might occur. The total concentration of rosmarinic acid was determined at this work.

also employed in the analysis of phenolic compounds in *Perilla frutescens* (Labiatae) [26].

CZE has attractive advantages, e.g. short analysis times, versatility, and very small amounts of solvent waste. It does, however, have disadvantages, for example unfavourable detection limits and the need to inject small sample volumes (nL) [27]. On-line combination of CZE with isotachopheresis (ITP) in the column-coupling configuration can improve separation efficiency and reduce limits of detection, because the concentrating effect of ITP enables injection of large volumes (tens of microliters) of dilute samples. Interfering or irrelevant sample components can be removed as they leave the outlet of the ITP capillary or they can be prevented from entering the CZE capillary by flushing the pre-separation capillary with background electrolyte (BGE) [28–31]. It is important to choose suitable electrolyte system and find the optimum time to switch the current from the pre-separation capillary to the separation capillary [30].

The objective of this study was to develop an electrolyte system for ITP–CZE in column coupling mode, which uses two capillaries, the first capillary for ITP and the second one for CZE. Capillary ITP is used to focus analytes in the first capillary and the CZE separation then proceeds in the second capillary [32]. We decided to employ the BGE-S-BGE arrangement ('S' denotes sample) that would be suitable for the assay of aromatic acids and flavonoids in *M. herba*. The term 'BGE-S-BGE' means that the BGE used in the CZE step differs from the terminating and leading electrolytes (TE and LE, respectively) of the ITP stage [28,33]. This complicated arrangement has been successfully applied to the analysis of compounds of interest in plant material. The basic characteristics of the ITP–CZE method, namely repeatability, accuracy, linearity, and limit of detection, were evaluated.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

ITP–CZE was performed with the EA 100 Villa Labeco CS Isotachophoretic Analyzer (Spišská Nová Ves, Slovakia) equipped with a column-switching system. Pre-separation and analytical capillaries were made from fluorinated ethylene-propylene (FEP) copolymer. The pre-separation capillary (9.0 cm long, 0.8 mm i.d.) was equipped with a conductivity detector positioned 38 mm from the bifurcation point. The analytical capillary (16.0 cm long, 0.3 mm i.d.) was operated with a conductivity detector and with an external LCD 2083 spectrophotometric detector (ECOM, Prague, Czech Republic) operated at 270 nm. Samples were injected by use of a sampling valve (30 μ L). The electrolyte chambers containing the LE and BGE were separated from the electrolytes in the capillaries by semi-permeable cellophane membranes. The personal computer (PC) software ITP Win Pro32 (Kas-Comp, Bratislava, Slovakia) was used to control the ITP and CZE runs and for collecting and processing experimental data. The pH* was measured with a PHM-220 pH meter (Radiometer Analytical SAS, Lyon, France). UV spectra were acquired

with an HP 8453 Hewlett–Packard spectrophotometer (HP, Palo Alto, USA). A Sonorex RK 31 ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) was used for degassing and sonication.

2.2. Chemicals

All chemicals used for preparation of model mixtures and electrolyte solutions were of analytical-reagent grade. α -Cyclodextrin, β -cyclodextrin, 2-hydroxyethylcellulose (HEC), apigenin, hesperetin, ferulic, gallic, chlorogenic, caffeic, *p*-coumaric, rosmarinic acids, quercitrin, luteolin, methanol, 3-(*N*-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid (MOPSO), Tris, and methanol were obtained from Sigma–Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Boric acid, 1-nitroso-2-naphtol and picric acid were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic). Ultrapure water, used throughout, was prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The drug *M. herba* was provided by Department of Pharmacognosy of Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (Czech Republic).

2.3. Standard and electrolyte solutions

A stock solution containing rosmarinic, *p*-coumaric, ferulic, caffeic and chlorogenic acids and quercitrin (0.025 mg mL⁻¹ of each) was prepared in methanol. A 2.00-mL aliquot of this stock solution was transferred into a 10-mL volumetric flask and diluted to 10 mL with water, so the final model mixture contained 20% (v/v) methanol. All solutions were filtered through a No. 4 sintered glass filter and degassed for 15 min in an ultrasonic bath before ITP and CZE analysis.

The optimal LE was 10 mM HCl, 0.2% hydroxyethylcellulose, pH* \approx 7.2 (adjusted with Tris) and the TE was 50 mM H₃BO₃ of pH* \approx 8.2 (adjusted with barium hydroxide). The BGE used in the CZE step was different from LE and TE used in the ITP step (but all electrolytes contained 20% (v/v) of methanol). The optimum composition of the BGE in the CZE step was 25 mM MOPSO, 50 mM Tris, 40 mM H₃BO₃, 0.2% hydroxyethylcellulose, pH* \approx 8.1 (adjusted with barium hydroxide).

2.4. Preparation of plant extract

Dried pulverized *M. herba* (1.0 g) was weighed into a 100-mL volumetric flask. 50.00 mL methanol was added and the mixture was sonicated for 30 min. The resulting suspension was filtered through dry paper filter and the supernatant was diluted with water to contain 20% (v/v) methanol before the ITP–CZE analysis.

3. Results and discussion

3.1. Method optimization

3.1.1. Selection of the ITP electrolyte system

Considering the fact that the pK_a values of hydroxyphenylcarboxylic acid derivatives range between 4 and 5 [34,35] and those

of phenolic groups of flavonoids between pK_a 9 and 11 [35,36] and taking into account the presence of *ortho*-dihydroxyphenyl moieties (known for their ability to form complexes with borate) in some molecules of interest (rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids and quercitrin), boric acid solution of pH^* 8.2 (adjusted with barium hydroxide) was used as TE.

The LE was hydrochloric acid with Tris as the counterion. The formation of negatively charged borate complexes of *o*-phenols with boric acid facilitated smooth migration of the flavonoids at pH^* 8.2 and resulted in the increase of efficiency of separation [36]. It means that at the end of the pre-separation ITP step all the analytes were concentrated into a stack of narrow rectangular zones with sharp boundaries ready to be introduced into analytical capillary (for more details see [31,37]). Two coloured markers, picric acid and 1-nitroso-2-naphthol, were used for exact timing of the transfer of isotachophoretically stacked analyte zones into the CZE column and for the control of the residual amount of the LE and TE entering the CZE capillary together with the analytes.

3.1.2. Selection of the BGE for CZE

To avoid peak-shape distortion as a result of high electro-migration dispersion, the effective mobility of a co-ion in the running buffer should be close to the effective mobility of the solutes. Several initial experiments and literature data [31,37] suggested that the LE or TE from the ITP phase could not be used as the BGE for CZE separation. The effective mobility of MOPSO is close to the mobilities of the analytes of interest [37], therefore MOPSO was selected as a co-ion. The influence of the presence of boric acid in the BGE on the migration of analytes was tested as well as pH^* of BGE and addition of cyclodextrins.

The time and current mode was also optimized.

3.1.3. Effect of pH^*

To estimate the effect of pH^* on the selectivity of separation, the BGE buffers with 25 mM MOPSO as co-ion and 40 mM boric acid with pH^* values between 7.8 and 8.5 were tested. At pH^* 7.8 and 8.0 the analytes remained unresolved and the asymmetry of their peaks was high. The best resolution was achieved at pH^* 8.1 (Fig. 2) whereas at higher pH^* values the resolution was getting

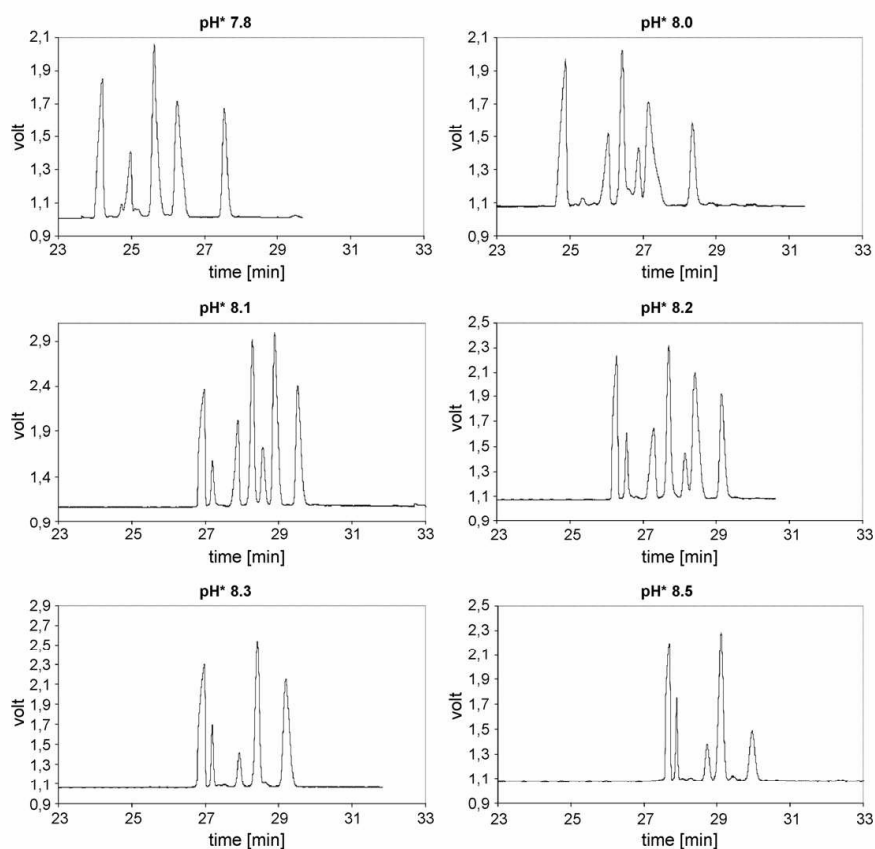


Fig. 2. Effect of pH^* .

Table 1
Time and current regime of the analysis

Mode	Step	Current (μA)	Duration	Capillary
ITP	1	200	Until the voltage ≈ 3 kV was reached	Pre-separation
	2	100	280–300 s from the step of CO_3^{2-}	
Current switching				
Transmigration	3	50	220 s	From pre-separation into analytical
Replacement of electrolytes				
CZE	4	50	80 s	Analytical
	5	200	To the end of analysis	

worse. At this stage only the separation quality was examined and so the peaks were not identified.

3.1.4. Effect of boric acid

Addition of boric acid to BGEs may affect the separation of compounds containing vicinal hydroxy groups on the aromatic ring, because of the formation of borate complexes. Thus rosmarinic, chlorogenic and caffeic acid and quercitrin can form charged (uninegative) borate complexes. The effect of seven different concentrations of boric acid (20, 30, 40, and 50 mM) on the peak resolution was examined. As the concentration of boric acid increased the quality of separation was getting better, especially in the case of the fourth peak. The best results were obtained using 40 mM boric acid, further increase of borate concentration resulted in prolongation of migration times without any further benefit.

3.1.5. Effect of cyclodextrins

Because the type and concentration of selectors are important conditions in CZE separations, the effect of α -cyclodextrin (5–35 mM) and β -cyclodextrin (5–15 mM) was studied. Although some minor improvement of separation was observed when using α -cyclodextrin (namely at its 30 mM concentration), it was not fundamental and α -cyclodextrin was not used for further optimization. In the presence of β -cyclodextrin the number of peaks decreased and the peaks broadened.

3.1.6. Time and current mode

The period during which analytes transmigrate from the pre-separation capillary into the analytical capillary and the electrolyte system is changed to CZE mode is a critical moment during the analysis [27]. Optimum time and current mode was established after numerous ITP–CZE analyses and picric acid and 1-nitroso-2-naphthol were used as the colour markers which made it possible to use the response of ITP conductivity detector for exact timing of introduction of ITP zones into CZE separation capillary. During this investigation it was found that the peaks of the analytes were not deformed in the electropherogram if the time interval for the current switching was set of about 20 s before the stacked zone of analytes reaches bifurcation block. The optimum time and current regime is presented in Table 1. The separation unit for on-line combination of capillary isotachopheresis in the column-coupling arrangement is described in Fig. 3 and also in more detail elsewhere [37].

3.2. Qualitative analysis

The migration times of samples investigated include only CZE step (see Table 1). The analytes migrated in following order: caffeic acid ($t_r = 6.54$ min), rosmarinic acid ($t_r = 7.63$ min), *p*-coumaric acid ($t_r = 8.22$ min), chlorogenic acid ($t_r = 8.43$ min), ferulic acid ($t_r = 8.91$ min), quercitrin ($t_r = 9.79$ min) and apigenin (IS; $t_r = 6.54$ min). It is noted at this point that the duration of the pre-separation ITP step is dependent on the absorption of CO_2 by TE during work (although TE contained barium hydroxide and the replacement of TE was carried out after every analysis) and consequently the length of ITP stage was changed.

The optimum BGE for the CZE separation had pH* 8.1 and it contained 25 mM MOPSO, 50 mM Tris, 0.2% HEC, 40 mM H_3BO_3 and 20% (v/v) of methanol. Caffeic acid was the fastest migrating analyte, followed by rosmarinic acid. The next two acids – *p*-coumaric and chlorogenic – were, unfortunately, not fully resolved (i.e. they co-migrated). Complex-formation with boric acid is the probable reason for the rapid migration of caffeic and rosmarinic acids. Ferulic acid has no possibility to form the complex with boric acid and therefore it migrates as the slowest acid. The last two peaks corresponded to quercitrin (although forming borate complexes, of its relatively big molecule results in its slowest migration) and apigenin (IS).

The electropherogram of the model mixture is presented in Fig. 4. An apparent discrepancy of times was explained above.

3.3. Calibration data

Calibration data were evaluated for all the analytes under investigation, using the optimum BGE described above. To improve the linearity of calibration curves, apigenin was used as the internal standard. The calibration curve was plotted for each analyte in the concentration range 0.5–5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (covered by five experimental points, each measured in duplicate). The PC software made possible to obtain us peak areas of poorly resolved chlorogenic acid from quercitrin. Statistical evaluation of the calibration data, i.e. peak area ratio (analyte/internal standard) versus sample concentration (in $\mu\text{g mL}^{-1}$) confirmed satisfactory linearity expressed by correlation coefficient values ranging from 0.9842 (chlorogenic acid) to 0.9988 (caffeic acid); the method was at least sensitive for chlorogenic acid and quercitrin. Regression analysis of the calibration data was per-

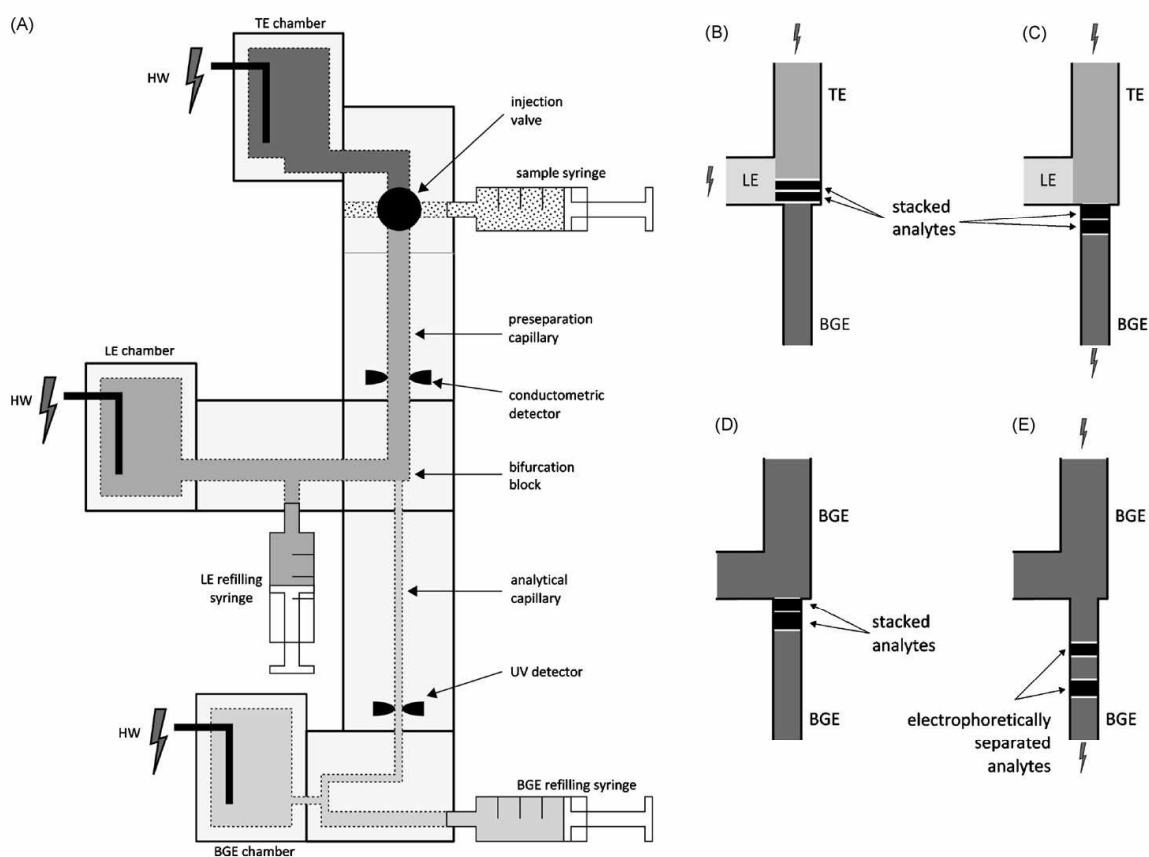


Fig. 3. (A) The scheme of apparatus for ITP-CZE; (B) the end of ITP step; analytes are stacked into the narrow zones at the bifurcation point; (C) analytes are transferred electrophoretically into the analytical capillary; (D) the pre-separation capillary is flushed hydrodynamically with BGE; (E) analytes are separated in the CZE mode.

formed by use of Microsoft Excel. The results are summarized in Table 2.

3.4. Limits of detection and quantification

Limits of detection (LoD) were evaluated, on the basis of signal-to-noise ratio (S/N), by comparing signals from samples containing known low concentrations of analytes with those

from blank samples, and establishing the minimum concentrations at which the analytes could be detected reliably. A signal-to-noise ratio between 3:1 and 2:1 is usually regarded as acceptable criterion for estimating detection limit [38]; $S/N = 3$ was chosen in this work. $S/N = 10$ was chosen for limit of quantification (LoQ).

LoD values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) increased in the order 0.018 for caffeic acid, 0.020 for ferulic acid, 0.027 for rosmarinic acid, 0.030

Table 2
Calibration data for the analytes

Analyte	Calibration curve, $y = k \cdot x + q$	s_k	s_q	R
Caffeic acid	$y = 0.4934x + 0.1091$	0.017	0.056	0.9988
Rosmarinic acid	$y = 0.3205x + 0.0341$	0.017	0.059	0.9971
<i>p</i> -Coumaric acid	$y = 0.2931x + 0.0942$	0.024	0.079	0.9935
Chlorogenic acid	$y = 0.2617x + 0.0468$	0.033	0.110	0.9842
Ferulic acid	$y = 0.4488x + 0.0733$	0.021	0.068	0.9979
Quercitrin	$y = 0.2325x + 0.1231$	0.016	0.053	0.9952

y , peak area ratio (analyte/internal standard); x , concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$; s_k , standard deviation of the slope of calibration curve; s_q , standard deviation of the intercept of the calibration curve; R , correlation coefficient.

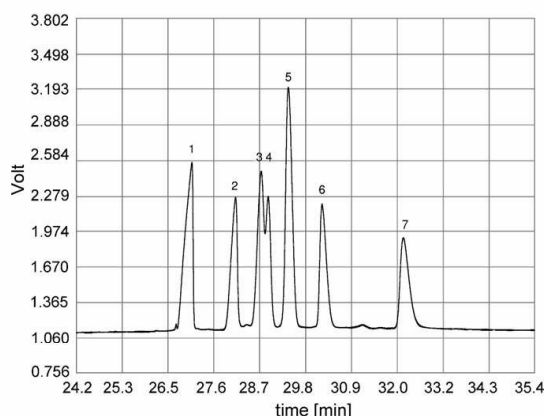


Fig. 4. Electropherogram of the standard mixture: 1=caffeic acid, 2=rosmarinic acid, 3=*p*-coumaric acid, 4=chlorogenic acid, 5=ferulic acid, 6=quercitrin, 7=apigenin (IS; $c = 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$); BGE consisted of 25 mM MOPSO, 50 mM Tris, 40 mM H_3BO_3 , 0.2% HEC, 20% (v/v) of methanol, pH* 8.1.

for the *p*-coumaric acid, 0.032 for chlorogenic acid and 0.035 for quercitrin. LoQ value (in $\mu\text{g mL}^{-1}$) increased in the order 0.060 for caffeic acid, 0.065 for ferulic acid, 0.091 for rosmarinic acid, 0.098 for *p*-coumaric acid, 0.106 for ferulic acid and 0.116 for quercitrin.

3.5. Repeatability

The results of replicate analyses ($n=6$) of prepared mixture containing $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each analyte showed excellent RSD < 1% for the migration times and RSD < 2% for the peak areas (except of *p*-coumaric where the RSD was 2.05%).

3.6. Analysis of plant material

The volume of methanolic plant extract injected in ITP–CZE analysis was $30 \mu\text{L}$. The ballast compounds present in the extract were diverted to the auxiliary electrode during the ITP pre-separation step whereas the analytes of interest were stacked and then transferred to the analytical capillary. Identification of each compound in the extract was achieved by the addition of the individual standard, which resulted in an increase of the height of the appropriate peak. The results were in good agreement with those of other authors [6,7,9–11]. An electropherogram of the plant extract is shown in Fig. 5. Appropriate isotachopherogram corresponding to the ITP pre-separation step is shown in Fig. 6.

In addition to compounds included in the model mixture the protocatechuic acid was found as the first peak of electropherogram. The presence of this acid has been mentioned in several papers [9,10]. The peak of chlorogenic acid is negligible. Because the presence of luteolin-7-*O*-glucoside has been reported in *Melissa* [7] we tried to identify this compound in the extract, but the result was negative. Zgórka and Głowniak have found also *p*-hydroxybenzoic and gentisic acid [6] which were not presented in our plant extract.

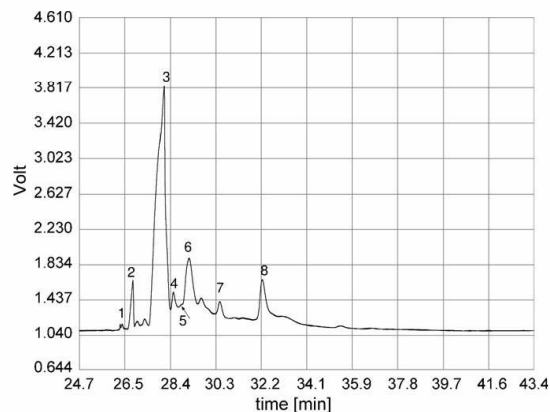


Fig. 5. Electropherogram of the plant extract: 1=protocatechuic acid, 2=caffeic acid, 3=rosmarinic acid, 4=*p*-coumaric acid, 5=chlorogenic acid, 6=ferulic acid, 7=quercitrin, 8=apigenin (IS; $c = 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$); for conditions see Fig. 4.

3.7. Determination of the constituents of *M. herba* extract

Quantification of the compounds and accuracy of the ITP–CZE technique was accomplished by the internal standard method (IS=apigenin). The analyte peak areas/IS peak are ratios for standards in the model mixture and for peaks appearing in the electropherogram of *M. herba* extract were compared.

As mentioned in Introduction several papers dealing with the analysis of *M. officinalis* have been published earlier. Chromatographic techniques were exclusively employed for the quantification. The comparison of quantitative results obtained in the present work is possible for caffeic and rosmarinic acid. Our results of quantification of rosmarinic acid agree well with those appearing in literature (our result: 43.54 mg g^{-1} , results of other authors obtained by HPLC: 40.5 mg g^{-1} (calculated from

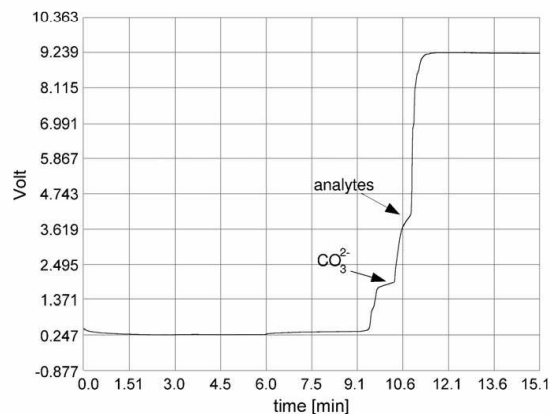


Fig. 6. Isotachopherogram of the plant extract; analytes were not separated in this step. Boric acid solution of pH* 8.1 (adj. with barium hydroxide) was used as TE. The LE was hydrochloric acid with Tris and 0.2% HEC at pH* 7.2. Either LE or TE contained 20% (v/v) of methanol.

Table 3
Determination of phenolic acids in *Herba mellissae*

Compound	Compound content (mg g ⁻¹ pulverized drug ± RSD [%]) (n = 3)
Caffeic acid	1.65 ± 0.80
Rosmarinic acid	43.54 ± 1.73
<i>p</i> -Coumaric acid	1.00 ± 1.04
Chlorogenic acid	0.30 ± 4.65
Ferulic acid	3.70 ± 2.17
Quercitrin	1.25 ± 2.97

% (w/w)) [3], 17.03 mg g⁻¹ [8] and 27.4 mg g⁻¹ [10] and by LC: 16.8 mg g⁻¹ [6]. The differences were bigger in the case of caffeic acid (our result: 1.65 mg g⁻¹, results of other authors obtained by HPLC: 1.99 mg g⁻¹ [8] and 0.3 mg g⁻¹ [10]; by LC: 0.089 mg g⁻¹ [6].

Unfortunately our results could not be compared with similar data obtained by CE methods. Though several papers have been published on the ITP–CZE [31,37] or simple CZE [19] analysis of plant materials, none of them was dealing with *M. herba*.

The results of the assay of plant extract components are summarized in Table 3. The recovery at analyte levels of 1 and 2 µg mL⁻¹ varied from 90 to 98%.

It must be stated that, in contrast to classical CZE, the proposed ITP–CZE technique requires operation by a very skilled analyst and is not extremely robust or ideal for routine laboratory analysis. It may be, however, presumably useful in special instances when complicated off-line sample pretreatment must be avoided. The main value of this work consists in the practical introduction to analytical practice of the previously theoretically considered [28] but until now not well-established BGE-S-BGE electrolyte system, which can facilitate analysis of complex biological or plant samples without sample pretreatment.

4. Conclusion

In this work, the hyphenation of ITP preconcentration to CZE has been explored for the separation and assay of caffeic, rosmarinic, *p*-coumaric, chlorogenic and ferulic acids and flavonoid quercitrin in a methanolic extract of *M. herba*. Several previously published methods for the determination of aromatic acids and flavonoids involve sample pre-concentration. The pre-concentration steps usually consist of several repeated operations that are laborious and time consuming. Substantial enhancement of detection sensitivity in CZE has now been achieved on the basis of isotachophoretic sample pre-treatment before CZE separation using on-line coupling of pre-separation and analytical capillary. A model mixture of five aromatic acids and two flavonoids have been separated by ITP–CZE within 30 min. Limits of detection between 18 and 35 ng mL⁻¹ were achieved. Although the method is selective and sensitive, it is rather laboratory complicated and it is necessary to monitor a transfer of the ITP stack of analytes into the analytical capillary. Despite this fact the ITP–CZE method could be used

as an alternative to HPLC methods for the analysis of plant constituents.

Acknowledgements

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, no. NR/8964-3, by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

References

- [1] Czech Pharmacopoeia 2005, Grada Publishing a.s., Prague, 2005.
- [2] A. Allahverdiyev, N. Duran, M. Ozguven, S. Koltas, *Phytomedicine* 11 (2004) 657.
- [3] J. Bruneton, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Intercept Lavoisier, Andover, 1999.
- [4] V. Holzmánová, *Chemické listy* 90 (1996) 486.
- [5] M. Petersen, M.S. Simmonds, *Phytochemistry* 62 (2003) 121.
- [6] G. Zgórka, K. Główniak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 79.
- [7] A.P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, J.L. Lamaison, *Pharm. Acta Helv.* 72 (1998) 301.
- [8] S. Herodež, M. Hadolin, M. Škerget, Ž. Knez, *Food Chem.* 80 (2003) 275.
- [9] A. Žiaková, E. Brandšteterová, E. Bláhová, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 271.
- [10] A. Caniová, E. Brandšteterová, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 24 (2001) 2659.
- [11] H. Wang, G. Provan, K. Helliwell, *Food Chem.* 87 (2004) 307.
- [12] F.K. Tieli, S.M.C. da Costa, J.O. da Silva, P.S. Pereira, S.V. Sampaio, *Toxicol. Lett.* 144 (2003) 89.
- [13] E. Kovatcheva, A. Pavlov, I. Koleva, M. Ilieva, M. Mihneva, *Phytochemistry* 43 (1996) 1243.
- [14] K. Stehfest, M. Boese, G. Kerns, A. Piry, C. Wilhelm, *J. Plant Physiol.* 161 (2004) 151.
- [15] J. Tóth, M. Marlianová, D. Tekelová, M. Koreňová, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 50 (2003) 139.
- [16] J. Yuan, H. Chen, F. Chen, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2651.
- [17] A. Trute, A. Nahrstedt, *Phytochem. Anal.* 7 (1996) 204.
- [18] G. Janicsák, I. Máthé, *Chromatographia* 46 (1997) 322.
- [19] M. Bonoli, M. Pelillo, G. Lercker, *Chromatographia* 57 (2003) 505.
- [20] P. Andrade, F. Ferreres, M. Gil, F. Tomas-Barberan, *Food Chem.* 60 (1997) 79.
- [21] S. Baskan, N. Oztekin, F.B. Erim, *Food Chem.* 101 (2007) 1748.
- [22] A. Ben Hamed, D. Gajdošová, J. Havel, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1188.
- [23] M. Herrero, D. Arraez-Roman, A. Segura, E. Kenndler, B. Gius, M.A. Raggi, E. Ibanez, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 54.
- [24] Y. Peng, J. Yuan, F. Liu, J. Ye, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 431.
- [25] Z. Tang, Y. Zeng, Y. Zhou, P. He, Y. Fang, S. Zang, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2861.
- [26] Y. Peng, J. Ye, J. Kong, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 8141.
- [27] L. Křivánková, P. Boček, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 13.
- [28] L. Křivánková, P. Gebauer, W. Thormann, R. Mosher, P. Boček, *J. Chromatogr.* 638 (1993) 119.
- [29] L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr.* 716 (1995) 35.
- [30] D. Kaniánský, J. Marák, J. Láštinec, J. Reijenga, F. Onuska, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 141.
- [31] M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, *Electrophoresis* 23 (2002) 1045.
- [32] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis (Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 45)*, Elsevier, Amsterdam, 2005.

- [33] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466.
- [34] Z. Grodzinska-Zachwieja, *J. Chromatogr.* 241 (1982) 217.
- [35] G. Sillén, A.E. Martell, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, The Chemical Society, London, 1964.
- [36] P. Morin, F. Villard, M. Dreux, *J. Chromatogr.* 628 (1993) 153.
- [37] M. Urbánek, L. Blechtová, M. Pospíšilová, M. Polášek, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 261.
- [38] International Conference on Harmonisation, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Q2(R1). Fed. Reg. 60 (1995) 11260.

**5.5. Příloha III: M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Šafra, I. Pet-
riška, J. Chromatogr. A 1143 (2007), 258-263**

Determination of mannitol and sorbitol in infusion solutions by capillary zone electrophoresis using on-column complexation with borate and indirect spectrophotometric detection

Marie Pospíšilová*, Miroslav Polášek, Jiří Šafra, Ivan Petriška

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague,
Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

Received 9 October 2006; received in revised form 21 December 2006; accepted 2 January 2007
Available online 13 January 2007

Abstract

Capillary zone electrophoresis with indirect UV detection at 215 nm was applied for the separation and determination of mannitol (MA), sorbitol (SO) and xylitol in the form of anionic borate–polyol complexes. The separation was carried out in a fused silica capillary (total length 60 cm, effective length 50 cm, I.D. 50 μm) at 25 kV. The optimized background electrolyte was 200 mM borate buffer (pH 9.3, adjusted with triethylamine) containing 10 mM 3-nitrobenzoate as the chromogenic co-ion. The separation took ~ 13 min. The rectilinear calibration range was 0.2–2 mg mL^{-1} for MA and SO when using xylitol (1 mg mL^{-1}) as the internal standard. The limit of detection at a S/N of 3 was ~ 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for either analyte. The method was used for the assay of MA or SO in pharmaceutical infusion solutions. The RSD values were 0.15% or 1.07% ($n=6$) when determining 100 mg mL^{-1} of MA or 50 mg mL^{-1} of SO in commercial infusion solutions. The results were in good agreement with those of pharmacopoeial iodimetric titration.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: CZE; Polyols; Borate complexes; Pharmaceuticals

1. Introduction

Mannitol (MA) and sorbitol (SO) are polyols commonly used in the treatment of patients with oliguric renal failure. Administered as a hypertonic infusion solution, they enhance distal tubule delivery of Na^+ and water resulting in increased urine formation, i.e., they exhibit diuretic effect. Polyols, commonly termed sugars alcohols, are also widely distributed as artificial nutritive sweeteners in food and beverages (including diet drinks). Hence the development of analytical methods for the assay of these compounds in foods and pharmaceuticals allowing efficient quality control of the finished products is important.

In recent years, MA or SO have been determined in different matrices including food, biological samples or pharmaceuticals by HPLC with amperometric, polarimetric or UV detection [1–6]. Although HPLC with UV detection is a fast and simple method, its particular drawback is limited sensitivity due

to the lack of suitable chromophores in the molecules of polyols. Therefore, a pre-column derivatization of the polyols prior to the HPLC analysis is sometimes employed for the enhancement of sensitivity [5,6]. GC with flame ionization detection was developed as an alternative technique to determine urinary MA after its derivatization [7] and a GC with mass spectrometric detection was recently introduced for determining polyols in biological matrices [8,9].

Thanks to its high separation efficiency, expeditiousness, relative simplicity, flexibility, versatility, reduced operational costs and minimal waste generation, capillary electrophoresis (CZE) became a widely accepted analytical technique suitable for the assay of various kinds of analytes in relatively complex matrices. The applicability of CZE for the analysis of different compounds including polyols has been demonstrated recently in a review [10] and in a number of articles [11–17].

Since polyols are non-UV absorbing compounds, they have been analyzed recently by capillary electrophoresis with amperometric, refractive index and laser-induced fluorescence detection [11–13]. Several CZE methods were devised for the simultaneous analysis of inorganic anions, organic acids

* Corresponding author. Tel.: +420 495067453; fax: +420 495067164.
E-mail address: marie.pospisilova@faf.cuni.cz (M. Pospíšilová).

and carbohydrates and other anionic compounds and for the determination of carbohydrates in food samples using indirect UV detection with strongly alkaline (pH > 12) background electrolyte (BGE) containing pyridine-2,6-dicarboxylic acid [14–16]. Other authors utilized a BGE of pH 13 for an indirect UV–CZE analysis of native nonderivatised sugars in tissue cultures [17].

Pharmacopoeial analyses of MA and SO, either as the bulk drug or in infusion solutions, consist in an ion-exchange liquid chromatography with refractometric detection or in simple but nonselective iodimetric titration [18,19].

Previously the authors developed an ITP method with conductometric detection for the separation of four polyols—mannitol, sorbitol, dulcitol and xylitol [20,21]. The present study is dealing with the development, optimization and validation of a CZE method suitable for the quality control of pharmaceuticals containing polyols since in our opinion earlier published CZE methods are not optimally suited for routine pharmaceutical analysis of such analytes.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals used were of analytical grade. D-Mannitol, D-sorbitol, xylitol (XY), sodium tetraborate, 3-nitrobenzoic acid, benzoic acid, D-sorbic acid, 4-methoxybenzoic acid, phenylacetic acid, 1-amino-2-naphthol-4-sulphonic acid hemihydrate, 1-hydroxy-2-naphthoic acid and 2-chlorobenzoic acid were obtained from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). Triethylamine (TEA), purity >99.5%, was purchased from Fluka Buchs, Switzerland. Commercial infusion solutions containing 100 g L⁻¹ of mannitol (Infusio mannitoli) or 50 g L⁻¹ of sorbitol (Infusio sorbitoli) were purchased from Infusia Hořátev (Czech Republic) or Medicamenta Vysoké Mýto (Czech Republic), respectively.

Ultra pure water prepared with a Millipore Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA) was used for the preparation of all solutions. The electrolyte solutions and standard solutions were filtered through 0.45 μm membrane filters (Millex, Millipore) and degassed by sonication (Bandelin Sonorex RK 31, Bandelin Electronic, Germany) for 10 min.

2.2. Instrumentation and conditions for CZE

All experiments were performed by using a computer-controlled P/ACE MDQ electrophoretic analyzer equipped with a diode array detection system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) and running with an integrated P/ACE Station Software (32 Karat Version 4.0) package. A pH meter (PHM 220, Radiometer, France) equipped with PHC2401-8 combined glass electrode calibrated with standards aqueous Radiometer buffers was employed for the pH measurements.

Electrophoretic separations were performed in fused silica capillaries with total length of 60 cm, effective length 50 cm and I.D. 0.050 mm (Composite Metal Services, The Chase, Hallow, Worcester, UK), maintained at 25 °C. To activate a new cap-

illary it was rinsed with 1 M NaOH for 20 min, washed with deionized water for 10 min, treated with 1 M HCl for 20 min, washed again with water for 10 min, and finally conditioned with the BGE for 10 min. Daily before the first sample injection the capillary was conditioned with 0.1 M NaOH for 20 min and with water for 20 min. The capillary was washed with 0.1 M NaOH and water between runs.

Separations were performed with a BGE containing 50 mM sodium tetraborate (adjusted to pH 9.3 with TEA) and 10 mM 3-nitrobenzoic acid. The samples were injected hydrodynamically at a pressure of 35 mbar for 8 s. Detection was carried out at 215 nm, and all measurements were performed at a constant voltage of 25 kV.

The negative peaks of analytes were inverted automatically to positive peaks by the electrophoretic system software.

2.3. Standard and sample solutions

Purely aqueous stock solutions containing 10 mg mL⁻¹ of MA, SO or XY were prepared by dissolving the compounds in water. The final model mixture for the development of the CZE method and for the optimization experiments contained 1 mg mL⁻¹ of each analyte. Calibration solutions prepared by dilution of the stock solutions contained 0.2–2.0 mg mL⁻¹ of MA and SO and 1 mg mL⁻¹ of XY as internal standard (I.S.). The ratios of analyte/I.S. peak areas were plotted against nominal concentrations of standards to obtain calibration curves. The parameters of the equations of the calibration curves (slope, intercept, correlation coefficient) were computed by linear regression.

The real samples of infusion solutions were diluted with water and treated with measured volume of the stock solution of XY to ensure that the approximate concentration of the analytes is approximately 1 mg mL⁻¹ and that the concentration of the I.S. is 1 mg mL⁻¹ before the CZE analysis. The calibration curve equations were used to calculate the content of MA or SO in the dosage forms analysed. The reference iodimetric determinations were carried out by a standard pharmacopoeial method [19].

2.4. Validation, electrophoretic characteristics

Number of theoretical plates, asymmetry, resolution, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and electrophoretic mobilities were evaluated by using common relationships [22]. The chemical stability of MA and SO in solutions was calculated from the peak areas and defined as relative decrease [S_T (%)] of the peak area of the analyte expressed as S_T (%) = 100 $|A_i - A_0|/A_0$, where A_0 is the ratio of the peak areas of the analyte (A_{st}) and internal standard ($A_{I.S.}$) measured at time zero and A_i is the same ratio measured at time t ; S_T (%) < 1 is required [23,24].

3. Results and discussion

Electrophoretic analysis of sugar alcohols is somewhat problematical due to their neutral character (with pK_a values 13–14

[16] they are difficult to ionize in aqueous medium) and lack of suitable chromophores in their molecules. Hence, the current known analytical approach involves CZE analysis in strongly alkaline BGE (0.25 M NaOH) combined with electrochemical detection [25].

In our present work, the ionization of the sugar alcohols is based on the on-column complex-formation reaction between borate and polyol resulting in the formation of anionic complexes. Evidently the borate–polyol anionic species are capable of electro-migration at lower pH compared to native polyols; this fact should result in more stable baseline, symmetric peaks of analytes and increased sensitivity compared to CZE with extremely alkaline BGEs.

The complex formation reaction between borate and polyols was introduced into common analytical practice and utilized for the analysis of polyhydric alcohols and for titrimetric or potentiometric determination of boric acid long ago [26]. Complex-formation equilibria in the aqueous borate–polyol systems have been studied extensively since the forties of the twentieth century [27]; they are known to be rather complicated because of the possibility of the formation of various kinds of borate–polyol species. Anyway all such complexes exist in the form of anions in alkaline medium above pH 8 [28]. The most recent conductometric and polarimetric study of relatively complicated complex-formation equilibria of polyols (such as SO, MA, glycerol, dulcitol and xylitol) with boric acid revealed the formation of $[B(\text{polyol})_1]^-$, $[B(\text{polyol})_2]^-$ and $[B_2(\text{polyol})_1]^{2-}$ species [29].

The problem with the lack of sufficiently absorbing chromophores in the molecules of MA and SO can be solved by using indirect UV detection. Different UV-absorbing substances possessing high molar absorption coefficients have to be investigated as components of the BGEs.

Initially, analytical conditions such as the type and concentration of the chromogenic ion, pH of the BGE and separation voltage were optimized for achieving most favourable separation efficiency, peak shape, sensitivity, and duration of the CZE analysis.

3.1. Selection of the BGE and UV-absorbing ion

The chromogenic co-ion suitable for the indirect UV detection should have effective mobility close to that of the analytes and at the same time it should possess high molar absorption coefficient at the detection wavelength selected [22]. Eight various chromogenic ions (benzoate, D-sorbate, 4-methoxybenzoate, phenylacetate, 1-amino-2-naphthol-sulphonate, 1-hydroxy-2-naphthoate, 2-chlorobenzoate, and 3-nitrobenzoate) bearing the same charge as the borate–polyol complexes were examined as co-ions in 50 mM sodium tetraborate/TEA (pH 9.3) electrophoretic system at concentration levels of 2, 5 and 10 mM. Acceptable results in terms of peak resolution and peak symmetry were achieved with D-sorbate, 4-methoxybenzoate, phenylacetate, 2-chlorobenzoate and 3-nitrobenzoate. In further optimization experiments involving regression analysis of calibration data 10 mM 3-nitrobenzoate ($\epsilon = 22,387 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\lambda = 215 \text{ nm}$) was selected as the

BGE UV-absorbing ion since it afforded the best sensitivity of detection and good symmetry of analyte peaks.

3.2. Selection of the internal standard (I.S.)

The I.S. should be selected among chemical substances having molecular structure similar to that of the analytes and, in particular, showing minimum UV absorption at the detection wavelength in order to give a negative peak alike the polyols detected. Out of five compounds tested (azelaic acid, itaconic acid, maleic acid, dulcitol and xylitol) xylitol (1 mg mL^{-1}) was chosen as the optimal I.S. migrating faster but close to the analytes.

3.3. Selection of optimum pH

In CZE ionic species are separated according to their charge and size. The pH of the BGE affects the effective charge of the analytes and therefore the electrolyte pH is an important factor influencing the resolution and sensitivity. Since the sugar alcohols are very weak acids (their pK_a values range between 12 and 14; $pK_a = 13.6$ for SO [16]) strongly alkaline electrolyte solutions of $\text{pH} > 12$ were used earlier to convert them to anions and to promote their electro-migration in CZE analysis. For example, 0.25 M sodium hydroxide was used as BGE for the CZE separation of sugar alcohols with direct electrochemical detection [25]; the application of BGE of pH 12.1 with reverse direction of the electroosmotic flow (EOF) and indirect UV detection was also reported [14,16]. The migration times of polyols tended to be rather long (22.9, 23.2 and 23.5 min for MA, SO and XY, respectively, at 20°C and 36 to 38 min at 15°C) under these conditions and the analytes migrated poorly resolved [16,14]. As mentioned above the ionization constants of the $H[B(\text{sorbitol})_2]$ and $H[B(\text{mannitol})_2]$ acids reported in [29] as pK_a 6.07 and pK_a 6.21 indicate that conventional CZE at slightly alkaline and moderate pH might be suitable for separating the borate–polyol complexes. Borate buffers with different pH values ranging from 8.5 to 9.7 were tested as BGEs. Even though the time of separation was shorter with BGEs of pH 8.8–9.1, pH 9.3 was selected as optimum because of higher sensitivity, better peak resolution and baseline stability (a baseline disturbance occurred at $\text{pH} > 9.5$). The higher migration time of MA compared to SO is probably associated with the higher stability of the $[B(\text{mannitol})_2]^-$ complex [29].

Finally, CZE with indirect UV detection at 215 nm was used for the selective assay of mannitol, sorbitol and xylitol in the form of anionic borate–polyol complexes. The separation was carried out at 25 kV and 25°C with a fused silica capillary (total length 60 cm, effective length 50 cm, I.D. 50 μm). The optimized BGE was 50 mM tetraborate buffer (pH 9.3, adjusted with TEA) containing 10 mM 3-nitrobenzoate as the chromogenic co-ion. Samples were injected hydrodynamically at a pressure of 35 mbar for 8 s. Under these conditions the time of complete separation of SO, MA and I.S. is relatively short; the mean values of the migration times were estimated as 10.6 min for XY, 11.4 min for SO and 12.5 min for MA.

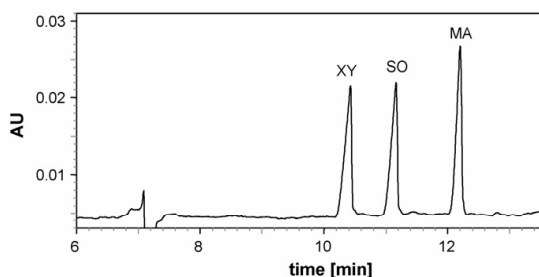


Fig. 1. Electropherogram of standard mixture of polyols; MA, mannitol; SO, sorbitol; XY, xylitol (1 mg mL^{-1} of each); BGE: 50 mM sodium tetraborate (adjusted to pH 9.3 with TEA) and 10 mM 3-nitrobenzoic acid; hydrodynamic sampling at pressure of 35 mbar for 8 s; detection at 215 nm; applied voltage 25 kV; temperature 25°C .

The electropherogram of a prepared standard mixture of the three sugar alcohols is presented in Fig. 1.

The effective mobility values u_{eff} for each borate–polyol complex in the optimum BGE of pH 9.3 were calculated by using appropriate equation [22]. These values are summarized in Table 1 together with previously published u_{eff} data for borate–polyol complexes separated by capillary isotachopheresis (ITP) with leading electrolyte of pH 8.1 [20] and for noncomplexed polyols migrating in BGE of pH 12.1 (with reversal direction of the EOF and indirect detection) [14]. It can be clearly seen that the effective mobilities of the analytes migrating in our system are approximately by one order of magnitude higher compared to parent polyols partially ionized at pH 12.1 and about three times higher compared to the u_{eff} values of corresponding borate–polyol complexes migrating under the above mentioned ITP conditions.

3.4. Validation of the method

The CZE method was validated after developing and optimizing the electrophoretic system. System suitability (SST) and validation parameters were evaluated according to International Conference on Harmonization (ICH) guideline recommendations [23,24]. The method validation covers system suitability (efficiency of the separation, repeatability, resolution and asymmetry) and the estimation of validation parameters such as accuracy, precision, selectivity, linearity, LOD, LOQ and short-term stability. The RSD values were calculated for repeated standard solution sampling to check the method repeatability as well as for repeated injections of samples of infusion solu-

Table 1
Effective electrophoretic mobilities of borate–polyol complexes and parent polyols

Analyte	$u_{\text{eff}} [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$		
Xylitol	-19.9^{a}	-7.1^{b}	-0.86^{c}
Sorbitol	-21.2^{a}	-8.2^{b}	-1.18^{c}
Mannitol	-22.7^{a}	-7.4^{b}	-1.34^{c}

^a This paper, borate complexes, pH 9.3.

^b Ref. [20], borate complexes, pH ~ 8 .

^c Ref. [14], parent polyols, pH 12.1.

tions to check the method precision. Accuracy was evaluated by analysing three spiked placebo solutions with two injections of each spiked solution. Linearity was confirmed in the concentration range $0.2\text{--}2.0 \text{ mg mL}^{-1}$ of MA and SO at five concentration levels; the method of internal standard (xylitol) was used. The LOD and LOQ values were calculated as a measure of the method sensitivity by the signal-to-noise ratio routine. Selectivity was checked by the comparison of electropherograms obtained by the measurement of a standard solution and a solution of placebo (pharmacopoeial water for injections containing no auxiliary compounds). Stability of standard solutions stored at 4°C in darkness and at ambient temperature under normal daylight illumination was examined. Initially concentrations of freshly prepared standard solutions were determined and thereafter the changes of the concentrations were monitored during next 3 days. Less than 1% relative decrease of concentration is considered as a mark of the stability of the given solution. Thus, the short-term stability of MA and SO was evaluated by comparison of response factors of freshly prepared and standard solutions stored at 4°C for 3 days in this case. The method validation results are summarized in Table 2.

Table 2
Analytical and validation parameters of the CZE method

	Mannitol	Sorbitol
SST—parameters		
Number of theoretical plates (N) ^a	26,460	9841
Peak asymmetry ^a	1.04	0.98
Resolution ^a	XY – SO = 1.54	SO – MA = 2.77
Repeatability—migration time (intra-day RSD, %) ^b	0.21	0.18
Repeatability—migration time (inter-day RSD, %) ^b	0.68	0.80
Repeatability—peak area (intra-day RSD, %) ^b	1.15	0.74
Repeatability—peak area (inter-day RSD, %) ^b	1.20	1.05
Validation data		
Precision (RSD, %) ^c	0.15	1.07
Linearity—slope; SD of the slope	1.015; 0.012	0.969; 0.015
Linearity—intercept; SD of the intercept	-0.006 ; 0.015	-0.037 ; 0.019
Linearity—correlation coefficient	0.99981	0.99964
Accuracy (%recovery) ($c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$)	100.4	99.2
Accuracy (RSD, %) ($c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$)	1.62	1.50
Selectivity	No interference	No interference
LOD (mg mL^{-1})	0.031	0.028
LOQ (mg mL^{-1})	0.093	0.085
Stability, ambient temperature, S_T (%) ^b	0.68	0.70
Stability, 4°C , S_T (%) ^b	0.80	0.72

^a $n = 3$.

^b $n = 6$.

^c Six real samples, each analyzed in triplicate after dilution to contain 1 mg L^{-1} of the analyte; linearity evaluated at 0.2, 0.6, 1.0, 1.6 and 2.0 mg L^{-1} , each calibration point measured in three replicates; accuracy: $n = 3$, each measurement carried out in duplicate.

Table 3
CZE determination of MA and SO in infusions

Preparation	Nominal content (g L ⁻¹)	Found ± RSD (% of nominal content)		Student <i>t</i> -test ^a (<i>n</i> = 6)
		CZE	Iodimetry [19]	
Infusio mannitoli 10	100	101.0 ± 0.15	101.8 ± 2.05	0.972
Infusio sorbitoli 5	50	100.6 ± 1.07	101.4 ± 1.64	0.915

^a 95% confidence level; $t_c = 2.228$ ($v = 2n - 2$).

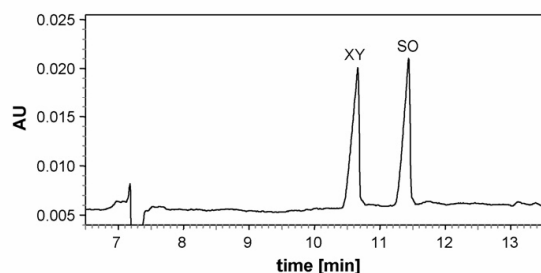


Fig. 2. Electropherogram of the infusion solution (infusio sorbitoli); SO, sorbitol; XY, xylitol (I.S.); for separation conditions see Fig. 1.

3.5. Analytical applications

The CZE method developed was applied to the assay of MA or SO in commercial infusion solutions (Fig. 2). In all instances single-component preparations were analysed due to the fact that MA and SO do not occur together in pharmacopoeial infusions. The results obtained by the proposed CZE method together with the results of pharmacopoeial iodimetric titration are presented in Table 3 together with the results of the statistical Student *t*-test. The Student *t*-test did not reveal any statistically significant difference between the results obtained by the proposed CZE and the reference method at 95% confidence level.

4. Conclusions

The proposed CZE method was successfully applied to the determination of mannitol and sorbitol in hyperosmolar infusion solutions. Whereas, the official pharmacopoeial HPLC method [18] with refractometric detection for the analysis of the bulk MO or SO requires operation of the separation column at 85 °C and the retention time of sorbitol is about 30 min, the proposed method is much simpler and faster (the migration times of the analytes do not exceed 13 min at ambient temperature and no sample pre-treatment is needed). The retention times typically exceed 20 min in other earlier published HPLC methods used for the assay of SO, MA and other alditols in foods and biological samples [1–3,5,6] except of [4] using ion chromatography and polarimetric detection, where the separation of MA and SO is accomplished within 7 min. Moreover, in papers [5,6] relatively complicated and lengthy (>30 min) derivatization procedures are required. Though the discussed HPLC methods (except of [18]) show better sensitivity than the proposed CZE with its LOQ values ~ 0.09 mg mL⁻¹ of MA or

SO, its potential use in fast analysis of foods, beverages or cosmetics containing relatively large amounts of MA and SO as sweeteners or humectants may be anticipated. The proposed CZE method could fully substitute the nonselective pharmacopoeial iodimetric assay of MA and SO in pharmaceutical products [19].

Acknowledgements

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Project No. NR8964-3/2006) and by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822.

References

- [1] Y. Bao, T.M.J. Silva, R.L. Guerrant, A.A.M. Lima, J.W. Fox, J. Chromatogr. B 685 (1996) 105.
- [2] C. Corradini, G. Canali, E. Cogliandro, I. Nicoletti, J. Chromatogr. A 791 (1997) 343.
- [3] I.G. Casella, M. Gatta, E. Desimoni, J. Chromatogr. A 814 (1998) 63.
- [4] A. Yamamoto, H. Ohmi, A. Matsunaga, K. Ando, K. Hayakawa, M. Nishimura, J. Chromatogr. A 804 (1998) 305.
- [5] A. Kiyoshima, K. Kudo, N. Nishida, N. Ikeda, Forensic Sci. Int. 125 (2002) 127.
- [6] S. Kwang-Hyok, P. Ui-Nam, C. Sarkar, R. Bhadra, Clin. Chim. Acta 354 (2005) 41.
- [7] M. Celli, P. Deufemia, R. Dommarco, R. Finocchiaro, D. Aprigliano, F. Martino, E. Cardfi, O. Giardini, Clin. Chem. 41 (1995) 752.
- [8] A. Kiyoshima, K. Kudo, Y. Hino, N. Ikeda, J. Chromatogr. B 758 (2001) 103.
- [9] J. Lee, B.C. Chung, J. Chromatogr. B-Anal. Tech. Biomed. Life Sci. 831 (2006) 126.
- [10] C. Martínez Montero, M.C. Rodríguez Doderó, D.A. Guillén Sanchez, C.G. Barroso, Chromatographia 59 (2004) 15.
- [11] L.A. Colon, R. Dadoo, R.N. Zare, Anal. Chem. 65 (1993) 476.
- [12] R.A. Evangelista, M. Liu, F. Chen, Anal. Chem. 67 (1995) 2239.
- [13] J.C. Ren, Y.Z. Deng, J.K. Cheng, Fenxi-Huaxue 21 (1993) 1374.
- [14] T. Soga, G.A. Ross, J. Chromatogr. A 837 (1999) 231.
- [15] T. Soga, M. Imaizumi, Electrophoresis 22 (2001) 3418.
- [16] T. Soga, M. Serwe, Food Chem. 69 (2000) 339.
- [17] X. Xu, W.T. Kok, H. Poppe, J. Chromatogr. A 716 (1995) 231.
- [18] European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, fifth ed., 2005.
- [19] Czech Pharmacopoeia 2005, Grada Publishing, Prague, 2005.
- [20] M. Pospíšilová, M. Poláček, J. Procházka, J. Chromatogr. A 722 (1997) 277.
- [21] M. Pospíšilová, M. Poláček, V. Jokl, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 387.
- [22] F. Foret, L. Křivánková, P. Boček, Capillary Zone Electrophoresis, VCH, Weinheim, 1993.
- [23] International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, vol. 60, March 1995.

- [24] International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, vol. 6, March 1997.
- [25] J. Ye, R.P. Baldwin, *J. Chromatogr. A* 687 (1994) 141.
- [26] M. Mikešová, M. Bartušek, *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun.* 15 (1985) 331.
- [27] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants, Vol.3: Other Ligands*, Plenum Press, New York, 1977.
- [28] S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1541.
- [29] E.M. Shvarts, R.T. Ignash, R.G. Belousova, *Russ. J. Gen. Chem.* 75 (2005) 1687.

***5.6. Příloha V: J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Pharm. Biomed.
Anal. (přijato k recenzi)***

Manuscript Number:

Title: Separation and Determination of Ketoprofen, Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical Preparation by Micellar Electrokinetic Chromatography

Article Type: Special Issue: RDPA 2007

Keywords: MEKC; Ketoprofen; Methylparaben; Propylparaben

Corresponding Author: Mr. Jiří Šafra, Mgr.

Corresponding Author's Institution: Pharmaceutical faculty of Charles University

First Author: Jiří Šafra, Mgr.

Order of Authors: Jiří Šafra, Mgr.; Marie Pospíšilová, Doc.

Abstract: Simple micellar electrokinetic chromatographic method was developed for the determination of ketoprofen as the active substance and methylparaben and propylparaben as preservatives in a semisolid pharmaceutical preparation. Separation was carried out with a fused silica capillary (50 cm effective length x 75 μm I.D.) at 30 kV and UV detection at 200 nm. Optimized background electrolyte was 50 mM tricine buffer (pH* 8.3, adjusted with NaOH) containing 30 mM sodium dodecyl sulfate as surfactant and 15 % (v/v) of methanol. Sodium diclofenac was used as internal standard. Single separation took about 13 min. Rectilinear calibration ranges were 100-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ketoprofen, 2-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for methylparaben and 1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for propylparaben with correlation coefficients 0.9969, 0.9999, and 0.9944 respectively. Repeatability of the MEKC method was characterized by the RSD values ranging between 0.77-2.15 % for peak areas and 0.52-0.73 % for migration times. The limit of detection at the S/N of 3 was 0.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ketoprofen, 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for methylparaben and 0.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for propylparaben.

The MEKC method was applied to the determination of the active compounds in Ketoprofen gel 2.5 %, Herbacos-bofarma Ltd., Bochemie Group (Pardubice, Czech Republic). No interferences from excipients present in the gel were observed. The recoveries ranged from 96.6 % to 103.9 % using the standard addition technique. No statistically significant differences were found when comparing the results with those of RP-HPLC method reported in literature.

1 **Separation and Determination of Ketoprofen,**
2 **Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical**
3 **Preparation by Micellar Electrokinetic Chromatography**

4
5 Jiří Šafra*, Marie Pospíšilová

6
7 Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of
8 Analytical Chemistry, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

9 *Corresponding author: Tel.:+420-495-067-482; E-mail address: jiri.safra@faf.cuni.cz

10

11 **Keywords:** MEKC; Ketoprofen; Methylparaben; Propylparaben

12 ***Abstract***

13 Simple micellar electrokinetic chromatographic method was developed for the determination
14 of ketoprofen as the active substance and methylparaben and propylparaben as preservatives
15 in a semisolid pharmaceutical preparation. Separation was carried out with a fused silica
16 capillary (50 cm effective length x 75 μm I.D.) at 30 kV and UV detection at 200 nm.
17 Optimized background electrolyte was 50 mM tricine buffer (pH* 8.3, adjusted with NaOH)
18 containing 30 mM sodium dodecyl sulfate as surfactant and 15 % (v/v) of methanol. Sodium
19 diclofenac was used as internal standard. Single separation took about 13 min.

20 Rectilinear calibration ranges were 100-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ketoprofen, 2-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for
21 methylparaben and 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for propylparaben with correlation coefficients 0.9969,
22 0.9999, and 0.9944 respectively. Repeatability of the MEKC method was characterized by the
23 RSD values ranging between 0.77-2.15 % for peak areas and 0.52-0.73 % for migration times.

1

1 The limit of detection at the S/N of 3 was $0.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ketoprofen, $0.38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for
2 methylparaben and $0.53 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for propylparaben.

3 The MEKC method was applied to the determination of the active compounds in Ketoprofen
4 gel 2.5 %, Herbacos-bofarma Ltd., Bochemie Group (Pardubice, Czech Republic). No
5 interferences from excipients present in the gel were observed. The recoveries ranged from
6 96.6 % to 103.9 % using the standard addition technique. No statistically significant
7 differences were found when comparing the results with those of RP-HPLC method reported
8 in literature.

9 **1. Introduction**

10 Ketoprofen (KP) is a propionic acid derivative, namely 2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid.
11 KP is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and it has shown anti-inflammatory,
12 analgesic and antipyretic activity in pharmacological studies [1]. Methylparaben (MP) and
13 propylparaben (PP) are effective antibacterial and anti-fungal agents that are commonly used
14 as preservatives in foods, beverages, cosmetics and pharmaceuticals [2]. MP and PP are used
15 together since they have a synergistic effect [3].

16 Recently KP was determined in tablets (by flow injection analysis [4]), gel (by HPLC [5-8]),
17 suppositories (by micellar liquid chromatography [9]) as well as in blood plasma (RP-HPLC
18 has been used [10]) or in wastewater (by LC-MS/MS has been performed [11]).

19 KP and six other anti-inflammatory drugs were also determined in pharmaceutical
20 preparations by CZE with UV detection (borate buffer of pH 8.15 containing 15 % of
21 methanol was employed) [12]. The comparison of capillary zone electrophoresis (CZE) and
22 micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been done for the determination of
23 different pharmaceuticals containing NSAIDs. The CZE method utilized phosphate buffer of
24 pH 8.0 and in the MEKC method has used borate buffer containing 40 mM SDS of pH 9.0

1 was used. Both CZE and MEKC method were found to be suitable for the assay of anti-
2 inflammatory drugs [13].

3 Only two method (HPLC) for simultaneous determination of KP in the presence of MP and
4 PP have been published so far [6; 8]. To our best knowledge, KP, MP and PP have not yet
5 been determined simultaneously by MEKC.

6 The aim of this work was the development of capillary MEKC method with UV detection for
7 the assay of KP, MP and PP in a multi-component pharmaceutical formulation.

8 **2. Experimental**

9 **2.1. Instruments**

10 All experiments were performed by using a computer-controlled P/ACE MDQ electrophoretic
11 analyzer equipped with a photodiode array detection system (Beckman Instruments, Fullerton,
12 CA, USA) and controlled by an integrated P/ACE Station Software (32 Karat Version 5.0)
13 package. A PHM-220 pH meter (Radiometer Analytical SDS, Lyon, France) equipped with
14 PHC2401-8 combined glass electrode calibrated with standard aqueous Radiometer buffers
15 was employed for the pH measurements.

16 Electrophoretic separations were performed in fused silica capillaries with total length of 60
17 cm, effective length 50 cm and I.D. 75 μ m), maintained at 20 °C. To activate a new capillary it
18 was rinsed with 1M NaOH for 20 min, 0.1M NaOH for 20 min and washed with deionized
19 water for 20 min. The capillary was conditioned with 1M NaOH for 10 min, 0.1M NaOH for
20 10 min and with water for 10 min daily before the first sample injection. The capillary was
21 washed with 0.1M NaOH and water between the runs.

22 The samples were injected hydrodynamically at a pressure of 50 mbar for 6 s. Detection was
23 carried out at 200 nm and all measurements were performed at a constant voltage of 30 kV.

1 **2.2. Chemicals**

2 MP, PP, KP, tricine, sodium dodecyl sulfate (SDS) and methanol were obtained from Sigma-
3 Aldrich (Milwaukee, WI, USA); phosphoric acid, sodium hydrogen phosphate and sodium
4 hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium diclofenac (DF) was
5 obtained from Amoli Organics Ltd. (Mumbai, India).

6 A Millipore Milli-Q RG ultra-pure water was used for the preparation of the solutions.
7 Commercially available gel (Ketoprofen gel 2.5 %, Herbacos-bofarma Ltd., Bochemie Group
8 (Pardubice, Czech Republic) containing KP, MP and PP was analyzed.

9 **2.3. Running Buffer**

10 A 50 mM tricine buffer containing 30 mM SDS and 15 % (v/v) of methanol was used as
11 running buffer. It was prepared by dissolving calculated amount of tricine and SDS in ultra-
12 pure water. The pH* was adjusted to 8.3 by NaOH.

13 **2.4. Standard and Sample Solutions**

14 The model mixture for the development of the CZE method and for the optimization
15 experiments contained 625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of KP, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MP, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PP and 625
16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DF as internal standard (I.S.). It was prepared by dissolving the compounds in 15
17 % (v/v) methanol.

18 Calibration solutions contained 100-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of KP, 2-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MP, 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
19 of PP and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DF (I.S.).

20 The ratios of analyte/I.S. peak areas were plotted against nominal concentrations of standards
21 to obtain calibration curves. The parameters of the equations of the calibration curves (slope,
22 intercept, correlation coefficient) were evaluated by linear regression.

23 Approximately 2 g of the Ketoprofen gel 2.5 % was weighed on analytical balance and treated
24 with 25 ml of 30 % (v/v) methanol; the mixture was stirred intensively for 5 min and

1 thereafter it was sonicated for 15 minutes at 40 °C. The resultant mixture was centrifuged at
2 3000 rpm for 15 min. A 5-ml aliquot of the supernatant was diluted with water to 10 ml and
3 injected for analysis.

4 **3. Results and Discussion**

5 The aim of this work was separation and simultaneous determination of KP, MP and PP.
6 MEKC as a potent modified electrophoretic method allowing excellent separations of neutral,
7 hydrophobic or water insoluble species was used with respect to the acid base properties of
8 KP (acid), MP and PP (weak acids) with pK_a 4.23, 8.30 and 8.23, respectively [14].

9 **3.1. Method Optimization**

10 **3.1.1. Selection of the BGE**

11 The separation can be optimized by selecting a suitable co-ion in the electrophoretic buffer.
12 Therefore we examined several electrolyte systems: borate buffer, phosphate buffer, borate-
13 phosphate buffer, TRIS adjusted subsequently by different sulfonic acids (MOPSO, HEPES,
14 MES, BES, ACES and TAPS), tricine, bicine and glycylglycine buffers. All mentioned
15 buffers contained 40 mM SDS as the surfactant. The pH* was adjusted to 8.5.

16 The compounds of interest migrated mostly in this order: MP, KP and PP.

17 The separation of MP and KP was unsatisfactory when the borate buffer was used. The
18 migration time of PP was relatively long and the peak shape was asymmetric. With the
19 phosphate buffer higher migration time (~ 25 min) of PP and improper baseline drifting was
20 observed. With the borate-phosphate buffer, high current (above 100 μ A) was generated and
21 the peaks obtained were asymmetric due to the electromigration dispersion. With decreased
22 voltage, the analysis time was prolonged significantly and no improvement in the results was
23 attained.

1 For this reason, a biological buffer with lower co-ion effective mobility was examined
2 And thus the total analysis time has been reduced to about 15 min. However, the separation of
3 MP and KP was incomplete when TRIS-based buffers were tested (even TRIS+ACES or
4 TRIS+TAPS resulted in complete comigration of MP and KP).
5 Essential improvement of separation has been achieved when buffers based on tricine or
6 bicine were employed. The analysis took about 17 minutes, all compounds were separated to
7 the baseline and the baseline showed no inappropriate drifting.
8 Several additional modifications of tricine buffer (sodium cholate instead of SDS, acetonitrile
9 instead of methanol) brought no improvement. Therefore the tricine buffer with SDS has been
10 used for further optimization.

11 **3.1.2. Selection of Internal Standard**

12 Several compounds were tested as IS: ethylparaben, butylparaben, DF and ibuprofen.
13 Ethylparaben and ibuprofen were not sufficiently separated from KP. The migration time of
14 butylparaben was too long (increasing the total time of analysis). Thus DF migrating between
15 KP and PP was chosen as a optimum internal standard.

16 **3.1.3. Effect of pH***

17 The buffer pH affects the ionization, the interactions between analytes and micelles and the
18 effective mobility of the analytes. Hence the effect of pH* 7.7 to 8.9 was examined in buffers
19 containing 50 mM tricine and 30mM SDS. At all pH* values (except of pH* ~ 8.9) all
20 compounds were fully separated. Best results were achieved at pH* 8.3. The effect of pH* is
21 demonstrated in Figure 1.

1 **3.1.4. Effect of SDS**

2 The critical micellar concentration (CMC) of SDS is 8.2 mM [15]. The SDS concentrations
3 tested ranged between 10 and 60 mM and the buffer of pH* 8.3 contained 50 mM tricine and
4 20 % (v/v) of methanol. At higher concentrations of SDS (50 and 60 mM), the total time of
5 analysis was unsatisfactory. With decreasing concentration of SDS the migration times of all
6 analytes decreased. At ≤ 20 mM SDS the quality of separation and peak shape deteriorated.
7 At 10 mM SDS the migration time of PP changed significantly and PP migrated faster than
8 DF. The optimal concentration of SDS was found to be 30 mM. The effect of SDS is
9 illustrated in Figure 2.

10 **3.1.5. Effect of Buffer Concentration**

11 While keeping other parameters constant (30 mM SDS, 20 % (v/v) of methanol, pH* 8.3, 30
12 kV, 20 °C), the effect of 20–60 mM tricine was examined. Migration times and current
13 intensity increased when increasing the concentration of tricine but no significant
14 improvement in the quality of separation was achieved. The best results in terms of the time
15 of analysis, resolution of analytes and the current generated were obtained with 50mM tricine.

16 **3.1.6. Effect of Methanol**

17 It is known that the content of methanol in BGE affects analysis time, peak symmetry and
18 resolution and – of course – solubility of analytes. With the increasing methanol content in the
19 BGE from 0% to 30% (v/v) the migration times of the analytes increased.

20 The optimum was found to be 15% (v/v) of methanol. With lower content of methanol shorter
21 migration times were achieved but the resolution of all analytes deteriorated. If the separation
22 was performed with higher content of methanol no improvement of the resolution of analytes
23 was attained while all the migration times increased. PP and DF has comigrated when 30 %
24 (v/v) of methanol was used. The effect of the methanol content is shown in Figure 3.

1 **3.1.7. Addition of cyclodextrins**

2 As the type and concentration of selectors are important conditions in CE separations the
3 effect of α - and β -cyclodextrin was studied.

4 The separation quality was not significantly influenced by the addition of α -cyclodextrin into
5 the BGE. Some interesting effect was observed when 5 to 15 mM β -cyclodextrine was added
6 into the BGE. With the 5-10mM β -cyclodextrin migration times of MP, KP and DF increased
7 but the migration time of PP decreased. The migration order of PP and DF was reversed in the
8 BGE with 15 mM β -cyclodextrin but the reproducibility deteriorated. No cyclodextrin was
9 used for the further optimization.

10 **3.1.8. Effect of Voltage**

11 The applied voltage ranged between 20 and 30 kV. The peak shape, resolution, generated
12 current and migration times were evaluated. As expected with the increasing voltage
13 migration times decreased while the current intensity increased. The resolution was
14 unaffected. For the analysis 30 kV voltage was used. This value permitted shorter analysis
15 time while the current intensity was still acceptable.

16 **3.1.9. Effect of Temperature**

17 The effect of temperature was examined between 20 and 30 °C. Unsurprisingly with the
18 increasing temperature, migration times decreased and the baseline drifting was more
19 pronounced. Finally the temperature of 25 °C was selected to avoid high current intensity
20 values and baseline noise.

21

22 The final optimum conditions for the separation were: 50mM tricine buffer (pH* 8.3)
23 containing 30mM SDS and 15 % (v/v) of methanol. The separation was carried out at 30 kV,

1 20±0.1 °C and the UV detection wavelength was set at 200 nm. The electropherogram of a
2 standard mixture of MP, KP, DF and PP is shown in Figure 4.

3 The effective mobility values u_{eff} for each analyte in the optimum BGE of pH* 8.3 were
4 calculated by using appropriate equation [16]. These values are summarized in Table 1.

5 **3.2. Validation of the Method**

6 The CZE method was validated after developing and optimizing the electrophoretic system.
7 System suitability (SST) and validation parameters were evaluated according to International
8 Conference on Harmonization (ICH) guidelines and recommendations [17]. The method
9 validation covers system suitability (efficiency of the separation, repeatability, resolution and
10 asymmetry) and the estimation of validation parameters such as accuracy, precision,
11 selectivity, linearity, LOD and LOQ. The RSD values were calculated for repeated standard
12 solution sampling to check the method repeatability as well as for repeated injections of
13 samples of gel extract to check the method precision.

14 Linearity was confirmed in the concentration range 100-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of KP, 2-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
15 of MP, and 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PP at five different analyte concentration levels; the method of
16 internal standard (DF) was used. The LOD and LOQ values were calculated as a measure of
17 the method sensitivity by the signal-to-noise ratio routine.

18 The accuracy of the method was statistically checked by comparison of the results with those
19 of the standard official HPLC technique [6] with use of the Student's *t*-test. No significant
20 differences were found between the results obtained by MEKC and official HPLC method for
21 the same batch of Ketoprofen gel 2.5 % at 95% confidence level.

22 Since appropriate placebo was unavailable the recovery was checked by the standard addition
23 technique, i.e., by analyzing six real samples spiked with a known amount of analyte and six
24 replicates of original non-spiked samples.

25 The method validation results are summarized in Table 2.

1 **3.3. Determination of KP, MP and PP in the Ketoprofen gel 2.5 % HBF**

2 **formulation**

3 The method developed was used for the determination of the three analytes in Ketoprofen gel
4 2.5% HBF. The results were in good agreement with the nominal label content. Other
5 constituents of the gel (such as aromatic oil) did not interfere in the determination of the
6 analytes and no degradation products of preservatives were found. The results of the analysis
7 are given in Table 3. The electropherogram is shown in Figure 5

8 **4. Conclusion**

9 The proposed MEKC method permits the quality control of pharmaceutical preparations
10 containing KP, MP and PP as active substances in a single run. The total analysis time is <13
11 min using 50mM tricine buffer (pH* 8.3) containing 15 % (v/v) of methanol and 30mM SDS.
12 The method was validated and the results obtained were precise and accurate. The developed
13 method was successfully applied to the quantitative analysis of active substances in
14 Ketoprofen gel 2.5% and the results obtained were statistically compared with those of
15 published HPLC method [6] by the Student's t-test. The t-values indicated the absence of
16 systematic errors at 95% confidence level. In comparison with the published HPLC method,
17 the proposed sample preparation is easier. The proposed assay shows lower sensitivity
18 compared to the HPLC method but it is still fully sufficient for the analysis of pharmaceutical
19 preparations containing KP, MP and PP as active constituents.

20 **Acknowledgements**

21 This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech
22 Republic, No. NR/8964-3, by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of
23 Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

1 **References**

- 2
- 3 [1] D. Lincová, H. Farhgali, *Fundamental and Applied Pharmacology*. Galén, Prague, 2002.
- 4 [2] H. Kang, H. Kim, *J. Pharm. Biomed. Anal* 15 (1997) 1359.
- 5 [3] M.D. Kreuz, A.L. Howard, D. Ip, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 725.
- 6 [4] H.Y. Aboul-Encin, A.G. Dal, M. Tuncel, *Il Farmaco* 58 (2003) 419.
- 7 [5] D.K. Bempong, L. Bhattacharyya, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 341-346.
- 8 [6] J. Dvořák, R. Hájková, L. Matysová, L. Nováková, M. Koupparis, P. Solich, *J. Pharm.*
9 *Biomed. Anal.* 36 (2004) 625-629.
- 10 [7] A. Panusa, G. Multari, G. Incarnato, L. Gagliardi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007)
11 1221-1227.
- 12 [8] L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, *J. Chromatogr. B*
13 813 (2004) 191-197.
- 14 [9] C. Martinez-Algaba, L. Escuder-Gilabert, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J.
15 Medina-Hernandez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 393-399.
- 16 [10] M.J. Martin, F. Pablos, A.G. Gonzalez, *Talanta* 49 (1999) 453-459.
- 17 [11] M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, *Talanta* 70 (2006) 678-690.
- 18 [12] Y. Chen, S. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 907-912.
- 19 [13] M.G. Donato, W. Baeyens, W. Van Den Bossche, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*
20 12 (1994) 21-26.
- 21 [14] SciFinder Scholar, Ed. Chemical Abstracts Service, American Chemical
22 Society, Ohio, USA, 2004
- 23 [15] M.G. Khaledi, *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and*
24 *Applications*. Wiley Press, New York, 1998.

- 1 [16] F. Foret, L. Křivánková, P. Boček, *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH, Weinheim,
2 1993.
- 3 [17] International Conference on Harmonisation, *Validation of Analytical Procedures: Text*
4 *and Methodology*, ICH Q2(R1). Fed. Reg. 60 (1995) 11260
5

1

2 **Table 1** Effective electrophoretic mobilities of the analytes

Analyte	Methylparaben	Ketoprofen	Diclofenac	Propylparaben
u_{eff} [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	-10.84	-14.02	-15.24	-18.00

1

2 **Table 2** Analytical and validation parameters of the MEKC method

	Methylparaben	Ketoprofen	Propylparaben
SST-parameters			
Number of theoretical plates	48971	8772	49064
Peak asymmetry	0.90	0.62	0.86
Resolution	MP – KP: 4.84	KP – DF: 2.28	DF – PP: 9.89
Repeatability - migration time ^a (RSD, %)	0.73	0.52	0.72
Repeatability - peak area ^a (RSD, %)	0.76	0.77	2.15
Validation data			
Linearity – slope; SD of the slope	0.2712 ± 0.0022	0.3087 ± 0.0140	0.3299 ± 0.0202
Linearity – intercept; SD of the intercept	0.0032 ± 0.0053	3.2690 ± 1.7285	0.0115 ± 0.0251
Linearity – correlation coefficient	0.9999	0.9969	0.9944
Linearity – Residual standard deviation	0.0064	2.0824	0.0302
Accuracy (% recovery)	103.86	96.56	102.35
Selectivity	No interference		
LOD (µg·ml ⁻¹)	0.38	0.82	0.53
LOQ (µg·ml ⁻¹)	1.28	1.78	2.74

3 ^a n = 6

4

1

2 **Table 3** Results of MEKC determination of MP, PP and KP in Ketoprofen gel 2.5 % (n = 6)

Analyte	Declared amount	Found [g/100 g] ±R.S.D.% MEKC n=6	Found [g/100 g] ±R.S.D.% HPLC n=6	Student t-test ^a (n=6)
Methylparaben	0.05	0.049 ± 1.70	0.050 ± 1.92	0.1235
Ketoprofen	2.5	2.49 ± 0.52	2.45 ± 1.90	0.4126
Propylparaben	0.025	0.027 ± 1.87	0.026 ± 1.92	0.3900

3 ^a 95% confidence level; $t_c = 2.571$; ($v = 2n - 2$).

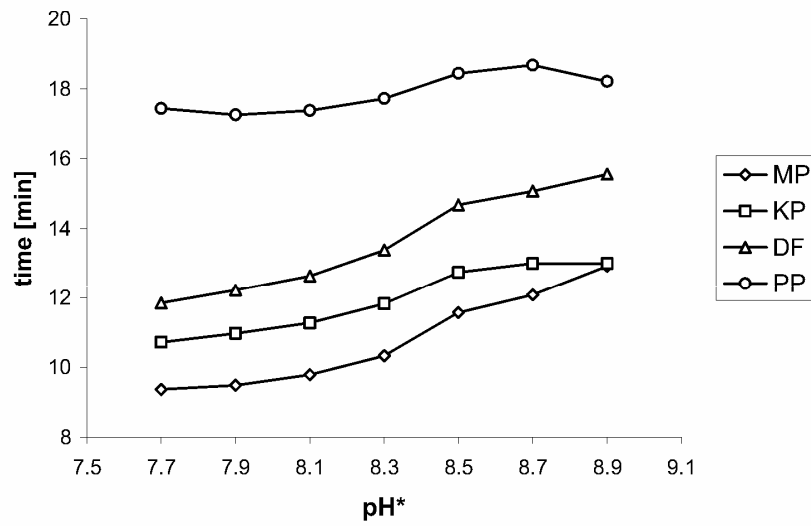
4

- 1 List of figures
- 2 Figure 1 Effect of pH* on the migration time of the analytes; MP... methylparaben, KP...
- 3 ketoprofen, DF... diclofenac, PP... propylparaben;
- 4 Figure 2 Effect of the SDS concentration on the migration time of the analytes; MP...
- 5 methylparaben, KP... ketoprofen, DF... diclofenac, PP... propylparaben;
- 6 Figure 3 Effect of the content of methanol on the migration time of the analytes; MP...
- 7 methylparaben, KP... ketoprofen, DF... diclofenac, PP... propylparaben;
- 8 Figure 4 Electropherogram of standard mixture of MP, KP and PP; MP... methylparaben (20
- 9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), KP... ketoprofen ($1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), DF... diclofenac ($30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), PP...
- 10 propylparaben ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); BGE: 50mM tricine, 30 mM SDS, 15 % (v/v) of methanol
- 11 (adjusted to pH* 8.3 with NaOH);
- 12 Figure 5 Electropherogram of Ketoprofen gel 2.5 %; MP... methylparaben, KP... ketoprofen,
- 13 DF... diclofenac, PP... propylparaben, x... compounds of essential oil; for conditions see
- 14 Figure 4

1

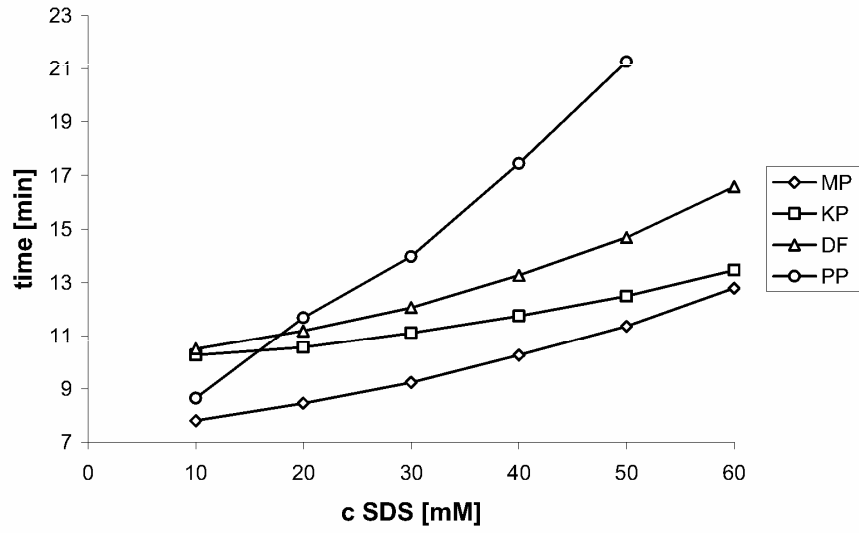
2 **Figure 1** Effect of pH* on the migration time of the analytes; MP... methylparaben, KP... ketoprofen, DF...

3 diclofenac, PP... propylparaben;



4

- 1 **Figure 2** Effect of the SDS concentration on the migration time of the analytes; MP... methylparaben, KP...
- 2 ketoprofen, DF... diclofenac, PP... propylparaben;



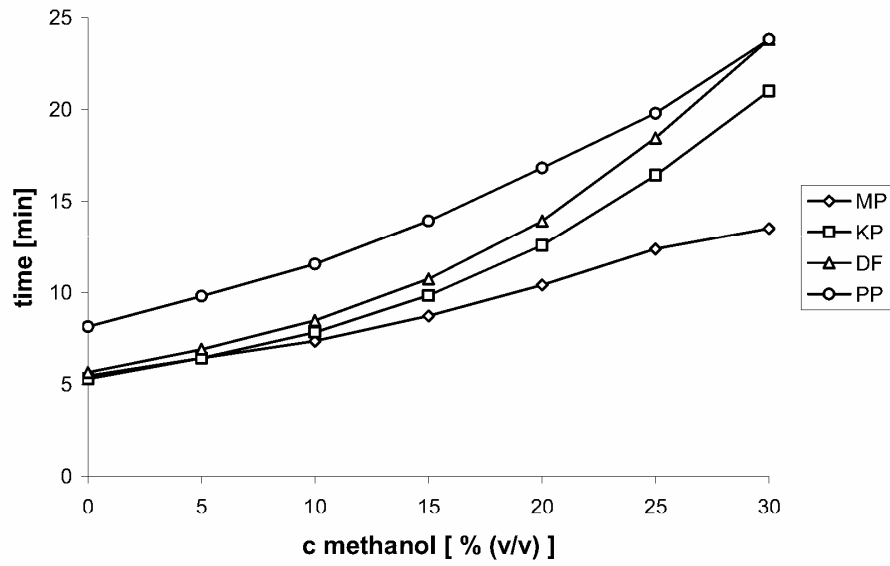
3

1

2 **Figure 3** Effect of the content of methanol on the migration time of the analytes; MP... methylparaben, KP...

3 ketoprofen, DF... diclofenac, PP... propylparaben;

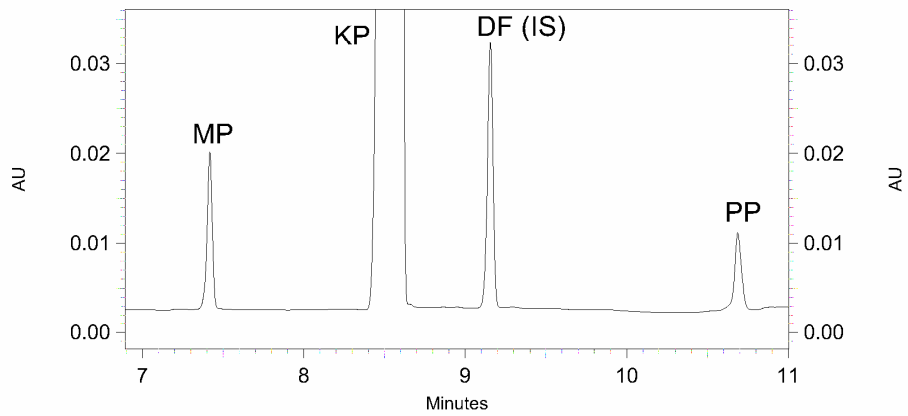
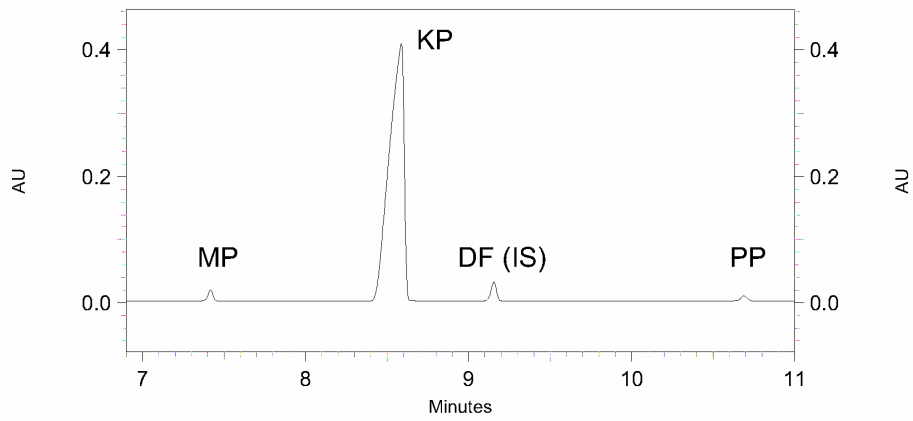
4



5

1

2 **Figure 4** Electropherogram of standard mixture of MP, KP and PP; MP... methylparaben ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), KP...
3 ketoprofen ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), DF... diclofenac ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), PP... propylparaben ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); BGE: 50mM
4 tricine, 30 mM SDS, 15 % (v/v) of methanol (adjusted to pH* 8.3 with NaOH);

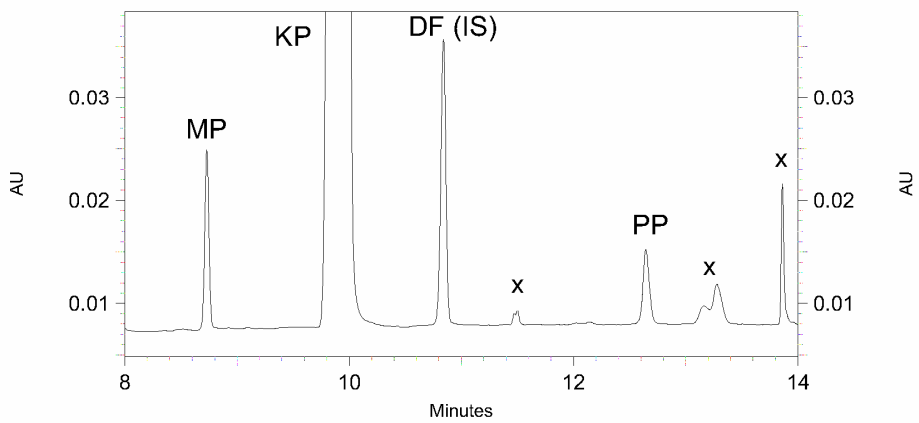
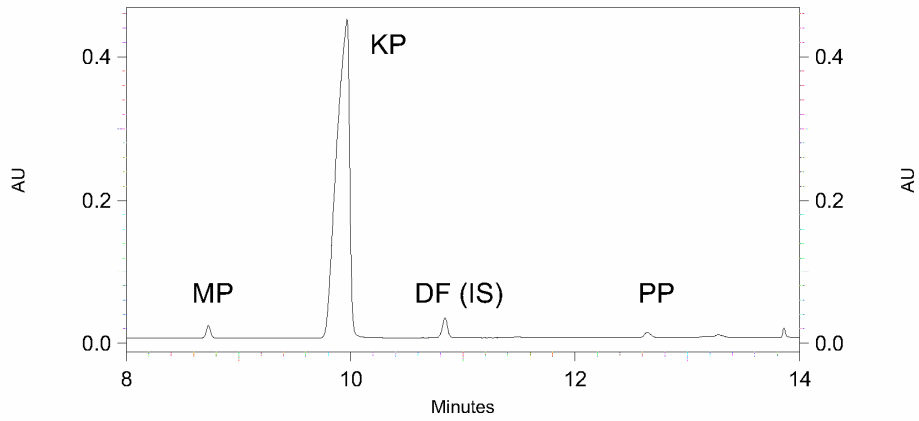


5

1

2 **Figure 5** Electropherogram of Ketoprofen gel 2.5 %; MP... methylparaben, KP... ketoprofen, DF... diclofenac,

3 PP... propylparaben, x... compounds of essential oil; for conditions see **Figure 4**



4

5

5.7. Příloha VI: Reprinty publikovaných posterů

VÝVOJ METODY ITP-CZE PRO SELEKTIVNÍ STANOVENÍ FENOLICKÝCH KYSELIN V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

JIŘÍ ŠAFRA¹, MARIE POSPÍŠILOVÁ¹, JIŘINA SPILKOVÁ²

¹ KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE, UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA, HEYROVSKÉHO 1203, 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

² KATEDRA FARMAKOGNOSIE, UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA, HEYROVSKÉHO 1203, 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

PRÁCE JE ZAMĚŘENA NA OPTIMALIZACI METODY ON-LINE KOMBINACE KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY A KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY (ITP-CZE) V DVOUKOLONOVÉM USPOŘÁDÁNÍ A JEJÍ APLIKACI NA ANALÝZU VYBRANÝCH KONSTITUENTŮ V METHANOLICKÉM EXTRAKTU ROSTLINNÉ DROGY. BYLO POUŽITO ELEKTROLYTOVÉ USPOŘÁDÁNÍ BGE-S-BGE, KDY ZÁKLADNÍ ELEKTROLYT V CZE JE ODLIŠNÝ OD VEDOUČÍHO I KONCOVÉHO ELEKTROLYTU V ITP. V RÁMCI OPTIMALIZACE OPERAČNÍHO SYSTÉMU ELEKTROLYTŮ V ITP BYLY TESTOVÁNY ČTYŘI TERMINÁTORY (Kyselina boritá, HEPES, MES, p-NITROFENOL) A DVA RŮZNÉ PROTIIONTY VE VEDOUČÍM ELEKTROLYTU (TRIS A IMIDAZOL). PŘI OPTIMALIZACI SLOŽENÍ BGE V CZE BYLY VYZKOUŠENY ČTYŘI RŮZNÉ ANIONY (MOPSO, MES, HEPES A KYSELINA HYDROXYIZOMÁSELNÁ). V PŘÍPADĚ ZVOLENÉHO CO-IONTU BYL SLEDOVÁN Vliv PŘÍDAVKU KYSELINY BORITÉ A PH NA KVALITU SEPARACE.

CÍLOVOU STRUKTUROU BYLY FENOLICKÉ KYSELINY. PRO POTŘEBY OPTIMALIZACE BYLA PŘIPRAVENA MODELOVÁ SMĚS DEVĚTI KYSELIN (KYSELINY PROTOKATECHOVÁ, VANILOVÁ, KUMAROVÁ, SYRINGOVÁ, FERULOVÁ, KÁVOVÁ, CHLOROGENOVÁ, GENTISOVÁ A SKOŘICOVÁ). PRO DETEKCI ANALYTŮ BYLA POUŽITA UV DETEKCE PŘI VLNOVÉ DÉLCE 270 NM. BYL VYBRÁN OPTIMÁLNÍ ČASOVÝ REŽIM PRO PŘEVOD ZAKONCENTROVANÝCH ZÓN ZE SEPARAČNÍ KAPILÁRY DO KAPILÁRY ANALYTICKÉ.

PŘI VALIDACI METODY BYLA PROVEDENO TESTOVÁNÍ LINEARITY PRO PĚT KONCENTRACÍ V ROZMEZÍ JEDNOTEK AŽ DESETIN $\mu\text{G}\cdot\text{ML}^{-1}$ KYSELINY A HODNOTY KORELAČNÍCH KOEFICIENTŮ SE POHYBOVALY V ROZMEZÍ 0,9977-0,9937. NALEZENÝ LOD BYL V ROZMEZÍ 10-60 $\text{NG}\cdot\text{L}^{-1}$. OPAKOVATELNOST MIGRAČNÍCH ČASŮ, VYJÁDRĚNÁ JAKO RSD, BYLA VELMI DOBRÁ A S VÝJIMKOU KYSELINY CHLOROGENOVÉ NEPŘESÁHLA 1 %; N=6. V PŘÍPADĚ OPAKOVATELNOSTI PLOCH PÍKŮ NEPŘEKROČILY HODNOTY RSD 5 %, OPĚT S VÝJIMKOU KYSELINY CHLOROGENOVÉ.

METODA BYLA POUŽITA PRO ANALÝZU FENOLICKÝCH KYSELIN V METHANOLICKÉM EXTRAKTU Z ROSTLINNÉ DROGY *HERBA EPILOBI*. OPTIMÁLNÍ ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM PRO ITP BYL: TE – 0,01M HEPES, PH=8,2 A LE – 0,01M HCL, 0,02M IMI, 0,2% HEC, PH=7,2. OPTIMÁLNÍ ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM PRO CZE (BGE) BYL 25MM MES, 50MM TRIS, 30MM H_3BO_3 , 0,2% HEC, PH=8,3. JAKO ROZPOUŠTĚDLO BYLA POUŽITA SMĚS VODY S METHANOLEM (4:1). Z LÁTEK Z MODELOVÉ SMĚSI BYLY V DROZE IDENTIFIKOVÁNY A STANOVENY KYSELINY PROTOKATECHOVÁ, KÁVOVÁ, GENTISOVÁ, SKOŘICOVÁ, KUMAROVÁ A FERULOVÁ. DROGA OBSAHOVALA NEJVÍCE KYSELINY KÁVOVÉ (0,65 MG/G PRÁŠKOVANÉ DROGY) A NEJMÉNĚ KYSELINY SKOŘICOVÉ (0,06 MG/G PRÁŠKOVANÉ DROGY).

PRÁCE BYLA ŘEŠENA ZA PODPORY IGA MZČR, GRANT Č. NL/7689-3 A VÝZKUMNÉHO ZÁMĚRU MSM 0021620822.



Vývoj ITP-CZE metody pro selektivní analýzu fenolických kyselin v rostlinném materiálu

Jiří Šafař¹, Marie Pospíšilová¹, Jiřina Spilková²
¹ Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
² Katedra farmakognosie, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

ÚVOD

Droga *Herba epilobii* je získávána z nadzemních částí některých druhů rodu *Epilobium* (*E. parviflorum*, *E. montanum*, *E. roseum* a *E. collinum*). Jde o tradiční drogu pro léčbu onemocnění prostaty a dezinfeke močových cest. Je pokládána především za řišťovou drogu. V rostlině však lze nalézt i jiné látky, např. steroly, flavonoidy či aromatické kyseliny. Na poslední jmenované, tedy látky s antioxidační aktivitou, je zaměřena tato práce.

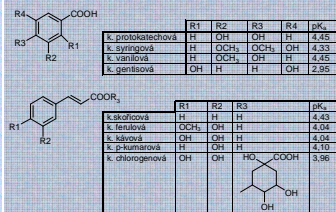
CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo využít on-line kombinace kapilární izotachofóry (ITP) a kapilární zónové elektroforýzy (CZE) pro analýzu vybraných látek ve složité rostlinné matici a vynést původní systém selektivní pro deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové a optimalizovat podmínky pro jejich kvalitativní a kvantitativní analýzu. Optimalizace se týkala především elektrolytového složení a proudového režimu analýzy.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CÍLOVÉ SLOŽKY

Cílovými složkami byly látky s antioxidační aktivitou ze skupiny fenolických kyselin. Jedná se o deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Jednotlivé látky absorbuji v UV oblasti.



PŘÍSTROJE

Měření byla prováděna na elektroforetickém analyzátoru EA 100 (Vilva Labco CS, Spilská Nová Ves, SR) v dvojkolovém uspořádání. Preseparační i analytická kapilára byly vyrobeny z FEP. Preseparační kapilára (délka 9,0 cm, I.D. 0,8 mm) byla vybavena vodovodním detektorem umístěným ve vzdálenosti 38 mm od rozdělovacího bloku. Analytická kapilára (délka 16,0 cm, I.D. 0,5 mm) byla vybavena vodovodním a externě připojeným UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou (Spektrofotometrický detektor LCD 2083, Ecom spol. s r.o., Praha). Pro reprodukovatelné dávkování vzorku byl použit dávkovací kolonet na 30 mL. Výhodnější měření byla prováděna pomocí softwaru ITP Pro32 (KasComp, SR) a Microsoft Excel.

CHEMICKÉ

Všechny použité chemikálie byly třídy čistoty pro analýzu. α- a β-cykloextrin, HEC, K, hydroxytomásečná, MOPSO, TRIS a standardy jednotlivých kyselin byly získány od firmy Sigma-Aldrich. HEPES, imidazol a MES byly dodány firmou Fluka. Kyselinu boritou a p-nitrotoluen vybírala Lachema Brno. Vzorek (*Herba epilobii parviflor.*, 50g, surovina pro bylinný čaj, Natura) byl zakoupen v Léčárně Pharmaceuturum, Brno. Stefanů 895, 500 02 Hradec Králové.

ROZTOKY STANDARDŮ A ELEKTROLYTOVÉ SYSTÉMY

Roztoky standardů (0,2 mg/mL) byly připraveny rozpouštěním jednotlivých standardů v methanolu a následným naředěním vodou tak, aby obsahovaly 20 % (v/v) methanolu. Také jednotlivé elektrolytové systémy obsahovaly 20 % (v/v) methanolu.

PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO EXTRAKTU

Droga byla uprávkována pomocí kuchyňského míšáku. K 1,5 g takto upravené drogy bylo přidáno 50,00 mL methanolu a směs se nechala extrahovat po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni v uzavřené baňce. Po uplynutí doby extrakce byla suspenze zfiltrována přes suchý papírový filtr. Tento zásobní roztok byl pak podle potřeby naředěn tak, aby obsahoval 20 % (v/v) methanolu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM PRO ITP

Byly vyzkoušeny čtyři různé terminátory. Jako první byla použita kyselina boritá. Tento terminátor však vložil velké nároky na aparaturu, roztok v kapiláře se zahřívá, roztok napětí a analýza se často přerušovala. Další testované látky měly vyšší pohyblivost než kyselina boritá. MES ($\mu_r=26,8$) nebyla pro použití v terminátoru vhodná, protože migrovala rychleji než analyzované látky. To se projevilo úbytkem počtu piků v CZE. Také p-nitrotoluen ($\mu_r=23,95$) migroval rychleji než analyzované látky, navíc při UV detekci značně absorboval. To mělo za následek vznik nového výrazného piků, který překrýval některé analyzované látky. Jako vhodná alternativa ke kyselině borité se ukázal HEPES ($\mu_r=13,3$). Při jejím použití se záznam prakticky neliší od záznamu získaných při užití kyseliny borité, zato nároky na přístroj byly poloviční.

Změna byla provedena také ve složení LE, kde byl TRIS ($pK_a=8,1$) nahrazen imidazolem ($pK_a=7,1$), což bylo výhodné pro migraci aromatických kyselin. Nižší pH LE také vedlo ke zkrácení zóny uhlíčená a tím i celé analýzy.

ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM PRO CZE

Výběr BGE

Na základě předchozích experimentálních měření na pracovišti byla zjištěna nevhodnost LE a TE z ITP jako BGE pro elektroforózu. Proto bylo použito uspořádání, kde je BGE zcela oddělen od LE a TE. Pro danou směs složek jsem testoval čtyři různé aniony: Tris z nich (MOPSO ($\mu_r=23,8$, $pK_a=6,79$), MES ($\mu_r=26,8$, $pK_a=6,13$) a HEPES ($\mu_r=21,8$, $pK_a=7,51$)) byl derivát sulfonových kyselin, čtvrtým pak byla kyselina hydroxytomásečná (HEBA). Vliv anionu na rozdělení směsi standardů byl testován při pH 8,1. HEPES se neověřila, protože separace v systému s ní byla nedokonalá, některé analyty migrovaly spolu. To mělo za následek menší počet piků na elektroforetogramu. HISA, stejně jako MOPSO, vykazovala z hlediska počtu piků lepší výsledky než HEPES. I zde však byla patrná nedostatečná separace piků (zejména u pomalejších analytů). Nejlepší separace byla dosažena v systému s MES.

Vliv pH

Pro systém s MES byla provedena optimalizace pH s cílem zjistit optimální hodnotu. Hodnotní se především počet a tvar jednotlivých piků. Jednotlivá měření proběhla pro hodnoty pH 7,71; 7,89; 8,10; 8,31 a 8,50. Nižší hodnoty pH (7,71 a 7,89) nebyly z uvedených hledisek vhodné, docházelo k nedostatečnému rozlišení pomalejších analytů. Od pH 8,10 byl již patrný trend ke zlepšování, přičemž nejlepší rozdělení bylo dosaženo při pH 8,31. Při pH 8,50 byla separace podobná stavu při pH 8,31.

Vliv kyseliny borité

Koncentrace kyseliny borité v základním elektrolytu významně ovlivňuje míru komplexace látek s dvěma vicinálními hydroxylovými skupinami. Z testovaných aromatických kyselin má strukturu předpokládá pro tvorbu borátových komplexů kyselina kávová, protocatechová a chlorogenová. Pro zjištění vlivu kyseliny borité v BGE na separaci látek jsem proměřil sedm různých koncentrací této kyseliny v BGE. Tyto koncentrace byly následující: 0 mM (BGE neobsahoval žádnou kyselinu boritou), 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM a 50 mM. V nepřítomnosti kyseliny borité byly první dva analyty (zejména identifikované jako k. protocatechová a kávová) zpomaleny a migrovaly s pomalejšími kyselinami.

Již od přidání 10 mM kyseliny borité byl znát její vliv na separaci prvních uvedených kyselin, které se přenesly na začátek záznamu. To znamená, že komplexace k. protocatechové a kávové s kyselinou boritou vedla ke zkrácení jejich migračních časů. Komplexace kyseliny chlorogenové nezpůsobila změnu pořadí její migrace, tzn. že tato kyselina se i ve formě komplexu separovala jako poslední z analytů. Obdobně separace proběhla při koncentracích 15 a 20 mM k. borité. Při dalším zvýšení koncentrace kyseliny borité na 30 mM byla separace relativně nejlepší. Od koncentrace 40 mM k. borité docházelo ke zhoršení separace. Současně se zvyšující koncentrací kyseliny borité docházelo i k prodloužení trvání CZE fáze, tak jak se zvyšovala iontová síla roztoku.

Jako optimální byla zvolena koncentrace 30 mM k. borité.

Vliv cykloextrinů

Pro zjištění vlivu cykloextrinů na separaci sledované směsi byly použity cykloextrin α a β v koncentracích 5, 10 a 15 mM. Co do kvality a počtu piků se jako příznivější jevil vliv cykloextrinu α než cykloextrinu β. Nejlepší rozdělení bylo pozorováno u koncentrace 10 mM, u koncentrace 5 mM a 15 mM docházelo k nedokonalé separaci či zhoršování tvarů piků.

PROUDOVÝ A ČASOVÝ REŽIM

Kritickým bodem celé analýzy je okamžik, kdy dochází k přechodu zakonzentrovávaných analytů do analytické kapiláry a změně elektrolytového systému. K optimálnímu proudovému a časovému režimu jsem došel proměnění řady různých nastavení proudu a času. Výsledný proudový a časový režim jsem zaznamenal do následující tabulky.

	Krok	Proud	Trvání	Kapilára
ITP	1	200 µA	100 s od CO ₂	preseparační
	2	100 µA	70 s	
přechod	přerušení proudu			
	3	50 µA		separační
CZE	přerušení proudu a změna elektrolytu			
	4	50 µA	90 s	separační
	5	200 µA	do konce analýzy	

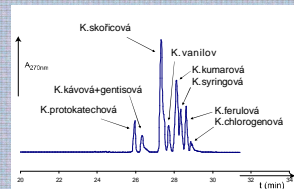
OPAKOVATELNOST

Pro ověření reprodukovatelnosti migračních časů a ploch piků bylo provedeno šest měření. Reprodukovatelnost času je velmi dobrá, pro jednotlivé analyty (kromě k. chlorogenové) nepřesahuje 1 procento. Stejně tak reprodukovatelnost ploch piků je uspokojivá, prakticky nepřesahuje pět procent. Výjimkou je kyselina chlorogenová, která zejména u plochy vykazovala výrazně horší reprodukovatelnost, než ostatní kyseliny. To patrně souvisí s její strukturou (např. velikostí molekuly).

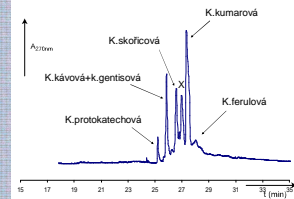
DETEKČNÍ LIMITY

Detekční limit (LOD) byl stanoven nejčastěji používanou metodou 3S/N (S... signál, N... šum). Nejnižší detekční limit vykazovala kyselina skořicová (0,005 mg/ml) a k. kumárová (0,010 mg/ml). Detekční limit se dále zvyšoval v pořadí: k. ferulová (0,021 mg/ml), k. syringová (0,026 mg/ml), k. kávová (0,034 mg/ml), k. protocatechová (0,041 mg/ml), k. vanilová (0,044 mg/ml). Nejvyšší detekční limit vykazovala k. chlorogenová (0,061 mg/ml).

KVALITATIVNÍ ANALÝZA



Elektroforetogram směsi standardů



Elektroforetogram rostlinného vzorku

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Analyt	obsah analytu (mg / g práškové drogy)
K. protocatechová	0,07
K. kávová + gentsisová *	0,65
K. skořicová	0,06
K. kumárová	0,28
K. ferulová	0,13

*vyjádřeno jako obsah kyseliny kávové

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla řešena za podpory IGA MZČR, grant č. NU/7689-3 a Výzkumného záměru MSM 0021620822.

540-14P

DETERMINATION OF CAPTOPRIL IN PHARMACEUTICALS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Marie Pospisilova, Charles University - Prague, Faculty of Pharmacy Department of Analytical Chemistry, Hradec Kralove 500 05, Czech Republic, Miroslav Polacek, Jiri Safra

Objective: To devise a capillary zone electrophoretic method (CZE) with indirect UV spectrophotometric detection suitable for selective assay of the content of the hypertensive drug captopril in four commercially available pharmaceuticals. **Methods:** The weight of pulverized tablets equivalent to 100 mg of captopril was sonicated with 80 ml of water for 15 min, the suspension was diluted to 100 ml and filtered through a sintered glass filter No. 4. Then 10 ml of this solution was transferred to 25 ml volumetric flask, 5 ml of internal standard (L-glutamic acid, 0.5 g/l) was added and diluted with water to the mark. After filtration through a membrane filter Millex (0.22 μm) the test solution was analysed by CZE. A computer-controlled PrinCE 650 capillary electrophoresis system (Prince Technologies B.V., The Netherlands) equipped with UV – VIS detector LAMBDA (Leonberg, Germany) and WinPrinCE software was used. The optimal operational electrolyte system consisted of 10 mM α -naphthylacetic acid adjusted to pH 7.8 with TRIS. The separation capillary was a fused silica tube (50 μm I. D., total length 60 cm, 45 cm to the detector) maintained at 25 °C. The separations were performed at the applied voltage of 30 kV. Samples were injected hydrodynamically at a pressure of 50 mbar for 4.8 s. Detection was carried out at 280 nm. **Results:** The calibration curve was linear from 0.1 to 1.0 g/l of captopril ($r = 0.99981$) and RSD was 1.5 % at the 0.5 g/l level ($n=6$). The LOD and LOQ were 7.7 mg/l and 25.8 mg/l respectively. A single analysis took 5 min. The method was suitable for determining captopril in Alkadil tablets, Apo-capto tablets, Capoten tablets and Tensiomin tablets (nominal content 25 mg/tbl, 12.5 mg/tbl, 25 mg/tbl and 50 mg/tbl) with RSD values ranging between 0.3-1.0 % ($n=3$). The recoveries of captopril were 99.6-101.5% ($n=4$). **Conclusion:** The developed CZE method for determination of captopril in four pharmaceuticals is characterised by good linearity, reproducibility, sensitivity and accuracy, which together with short time of analysis (about 5 min) and rapid and easy sample preparation make this method suitable for routine analysis of given pharmaceuticals. The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NL/7689-3 and by the MSM Project 111600001 of the Czech Ministry of Education.

Keywords: Capillary Electrophoresis, Method Development, Pharmaceutical, Validation
Application Code: Pharmaceutical
Methodology Code: Capillary Electrophoresis



DETERMINATION OF CAPTOPRIL IN PHARMACEUTICALS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

MARIE POSPÍŠILOVÁ, MIROSLAV POLÁŠEK AND JIŘÍ ŠAFRA

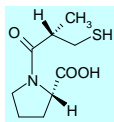
Analytical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

Abstract Number: 540—14 P

Introduction 1

CAPTOPRIL (CAP)

- The thiol-containing hypertensive drug



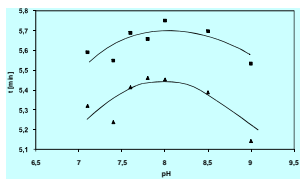
$pK_a = 4.22$

- Several papers dealing with spectrofluorimetry, stripping voltammetry, flow and sequential-injection spectrophotometric method were published for determining of CAP in pharmaceuticals [1-3]

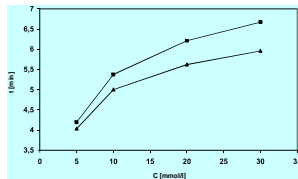
- [1] Chen, YH. et al, Talanta 23 (2003) 855.
- [2] Ionnidis, X. et al, J. Pharm.Biomed. Anal. 33 (2003) 309.
- [3] Tzanavaras, PD et al, Microchim. Acta 142 (2003) 55.

Results — Optimisation of electrophoretic conditions 4

The experimental conditions examined: *buffer type and concentration, * UV- absorbing species type and concentration, * pH of electrolytes, * type of internal standard *addition of α -/ β -cyclodextrin, *methanol content, * separation temperature, * voltage



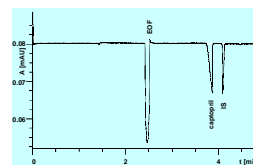
Effect of pH, Δ - CAP, \blacksquare - IS



Effect of BGE concentration, Δ - CAP, \blacksquare - IS

Experimental 3

- * Instrumentation. Capillary electrophoresis was performed on a PrinCE 650 instrument from Prince Technologies B.V., Netherlands with Bischoff HPLC spectrophotometric detector LAMBDA 1010, Germany and WinPrinCE software DAX 6.0. The 50 μ m I.D. uncoated fused silica capillary was used.
- * Chemicals. Captopril, Aldrich Chemie, USA, the purity corresponds PhBs 2002.
- * Pharmaceuticals: Tensiomin tablets, Capoten tablets, Alkadil tablets, Apo-capto tablets
- * All chemicals purchased from SIGMA-ALDRICH were of analytical grade.
- * A Millipore Milli-Q RG ultra pure water was used for the preparation of the electrolytes and stock solutions. All solutions were filtered through a 0.45 μ m filter Millex, Millipore, U.S.A.
- * Extraction of CAP from tablets: The weight of pulverized tablets equivalent to 100 mg of captopril was sonicated with 80 ml of water for 15 min, the suspension was diluted to 100.0 ml and filtered through a sintered glass filter No. 4. Then 10.0 ml of this solution was transferred to 25 ml volumetric flask, added 5 ml of the IS (L-glutamic acid, 0.5 g l⁻¹) and diluted with water to the mark. After filtration through a membrane filter Millex, 0.22 μ m, the sample was analysed by CZE.



Electropherogram of Capoten tablet

Operating electrolyte and the relevant data 5

* BGE: 10 mM α -naphthylacetic acid adjusted to pH 7.8 with TRIS	
* IS: L-glutamic acid; Indirect UV detection at 280 nm	
Selected analytical parameters for CAP	
Electrophoretic mobility	22.9 (10 ⁻⁷ m ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Separation efficiency	N = 21970; H = 20.5 μ m
System precision, (n = 6)	RSD = 1.49 % (area), 0.58 % (time)
LOD; LOQ	7.7 mg L ⁻¹ ; 25.8 mg L ⁻¹

CZE assay of CAP in formulations 7

CZE determination of CAP in tablets (n = 4)

Formulation	Declared content mg/tablet	CZE found \pm RSD
Tensiomin tablet	50	49.17 \pm 0.48
Capoten tablet	25	24.52 \pm 0.32
Alkadil tablet	25	24.45 \pm 0.36
Apo-capto tablet	12.5	12.18 \pm 0.87

CZE recovery of CAP added to the pharmaceutical

Formulation	Added (mg l ⁻¹)	Found (mg l ⁻¹)	RSD (n = 4) (%)	Mean recovery (%)
Tensiomin tablet	400.0	404.32	0.66	101.1
Capoten tablet	400.0	403.76	0.51	100.9
Alkadil tablet	400.0	398.52	0.37	99.6
Apo-capto tablet	400.0	405.88	0.41	101.5

Calibration 6

Regression parameters of calibration curve $y = k \cdot c + q$

Slope $k = 6.961 \pm 0.067$

Intercept $q = -0.117 \pm 0.041$

Correlation coeff. $r = 0.99981$

Number of points $n = 6$

* calibration range 0.1-1.0 g L⁻¹;

* $y =$ CAP peak area/IS peak area; $c =$

concentration of CAP in g L⁻¹

* each concentration was measured in triplicate

Conclusions 8

Capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect UV detection at 280 nm was used for selective assay of captopril as the active component in pharmaceutical preparations. The assay of CAP was carried out at 30 kV with 60 cm x 0.050 mm I.D. fused silica capillary (effective length 45 cm). Samples were loaded hydrodynamically at a pressure of 5 kPa for 4.8 s. The optimal operational electrolyte system consisted of 10 mM [alpha]-naphthylacetic acid adjusted to pH 7.8 with TRIS. The calibration curve was linear from 0.1 to 1.0 g/l of captopril ($r = 0.99981$) and RSD was 1.5 % at the 0.5 g/l level (n=6). LOD and LOQ were found of 7.7 mg l⁻¹ and 25.8 mg l⁻¹. A single analysis took 5 min. The method was suitable for determining captopril in Alkadil tablet, Apo-capto tablet, Capoten tablet and Tensiomin tablet (nominal content 25 mg/tbl, 12.5 mg/tbl, 25 mg/tbl and 50 mg/tbl) with RSD values ranging between 0.3-1.0 % (n=4). The recoveries of captopril were in the range of 99.6-101.5% (n=4).

Acknowledgement

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No NL/7689-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education

ANALÝZA VYBRANÝCH ANORGANICKÝCH IONTŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU POMOCÍ CZE

ŠAFRA JIŘÍ¹, POSPÍŠILOVÁ MARIE¹, CHLÁDEK JAROSLAV²

¹ Farmaceutická fakulta UK – Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; safraj@faf.cuni.cz

² Lékařská fakulta UK – Ústav farmakologie, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Kapilární elektroforéza je v posledním desetiletí rychle se rozvíjející technika v oblasti anorganických analýz. Má značný význam pro běžnou praxi v laboratořích zabývajících se environmentálními, biomedicínálními, klinickými, forenzními a industriálními analýzami [1]. Možných způsobů detekce je několik, např. přímá a nepřímá UV detekce, elektrochemická apod. Užití přímé UV detekce pro detekci anorganických iontů je výhodné zejména pro její selektivitu vůči několika málo absorbujícím anorganickým iontům (např. NO_3^- , NO_2^-). Zřejmě nejpoužívanější je však v současnosti nepřímá UV detekce, a to i přes některé nedostatky (např. nižší citlivost způsobená krátkou optickou dráhou) [2].

Cílem práce je vyvinout CZE metodu pro analýzu tří anorganických iontů (Cl^- , NO_3^- a NO_2^-) v biologickém materiálu dodaném Lékařskou fakultou UK v Hradci Králové. Jedná se o kondenzát vydechaného vzduchu, v němž lze nalézt látky odrážející probíhající zánět (NO_3^- a NO_2^-). Přítomnost chloridů může být použita jako marker diluce. Obsah iontů v daném materiálu je velice nízký a pohybuje se v jednotkách až stovkách $\mu\text{molů}$. Biologický původ analyzovaného materiálu je příčinou značné variability obsahu testovaných iontů.

V práci bylo vyzkoušeno několik elektrolytových systémů, poskytujících vhodné absorpční pozadí. Jednalo se o 2,6-pyridindikarboxylovou kyselinu, kyselinu benzoovou a chroman draselný.

Jako optimální byl vybrán elektrolyt o složení: 7,5 mM chroman draselný, 0,5 mM CTAB, pH=9. Analýzy probíhaly v křemenné kapiláře o průměru 50 μm , celkové délce 100 cm a separačním napětí -20 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 380 nm. Na modelové směsi standardů bylo dosaženo separace tří sledovaných aniontů na základní linii.

CZE metoda byla aplikována na analýzu jedenácti reálných vzorků, kdy byla zjištěna značná variabilita obsahu daných analytů. Citlivost metody byla dostatečná pro analýzu chloridů, v případě dusitanů a dusičnanů problematická. Způsob přípravy reálných vzorků (off-line prekoncentrace) i metoda CZE budou proto dále optimalizovány.

Tato práce je řešena za přispění GAUK 306/2005 BCH, Výzkumného záměru MSM 0021620822 a MSM 0021620820.

Literatura:

- [1] TIMERBAEV, A.R., *Electrophoresis* 2004, 25, 4008-4031
- [2] PAULL, B., KING, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 1892-1934

ANALÝZA VYBRANÝCH ANORGANICKÝCH IONTŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU POMOCÍ CZE

ÚVOD

Analyzované látky

Anorganické kationty a anionty hrají důležitou roli z hlediska složení biologických tekutin. Zjištěný odchylek od normálních koncentračních hladin těchto látek v daném biologickém médiu je velmi užitečné v diagnóze onemocnění jako jsou diabetes, jaterní a ledvinové dysfunkce a poruchy srdeční činnosti. Přesné stanovení koncentrací daných analytů je žádoucí a v klinické praxi se rutinně využívají standardní analytické metody AAS, AES a ISE. Vývoj alternativních a moderních analytických metod pro účely spolehlivého stanovení anorganických iontů je proto žádoucí.

Cílovými látkami této práce jsou anorganické ionty, které slouží jako indikátor probíhajícího zánětu v těle (NO_3^- a NO_2^-) a jako potenciální marker diluce daného biologického materiálu (Cl⁻), kterým je v našem případě dechový kondenzát.

Strategie práce

1. Zvolení separační elektromigrační metody (CZE)
2. Testování kvalitativně různých elektrolytových systémů pro nepřímou detekci analyzovaných iontů (přímá UV detekce není pro většinu anorganických iontů možná)
3. Optimalizace separačních podmínek (napětí, separační dráha, vlnová délka...)
4. Aplikace systému na reálné vzorky

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použitý přístroj

Práce probíhá na elektroforetickém analyzátoru od firmy Prince Technology s DAD a obslužným softwarem DAX-3D od firmy Van Mierlo Software Consultancy.

Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly třídy čistoty *pro analysis*. Kyselina benzoová a 3,5-dinitrobenzoová byla získána od firmy Lachema Brno, CTAB a chroman draselný od firmy Aldrich, 2,6-pyridinkarboxylová kyselina od firmy Koch-Light Laboratories Ltd.

Vzorky dechového kondenzátu byly získány z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

VÝSLEDKY A DISKuze

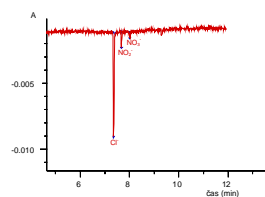
Na základě výsledků rešerše byl jako první zkoušen elektrolytový systém s PDC (kyselina pyridindikarboxylová) o pH 8,0, která se v dostupné literatuře pro anorganickou analýzu využívá velmi často. Pro potlačení elektroosmotického toku byl použit CTAB. Byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm a celkové délce 50 cm. Separací napětí bylo -20 kV. Detekce probíhala při 254 nm.

Toto uspořádání nevykazovalo dobré výsledky, separace byla nedostatečná.

Tuto skutečnost nezměnila ani optimalizace koncentrace PDC (3-9mM) a pH (5-10). Byla proto zvolena kapilára s větší délkou (100 cm). To se projevilo značným rozmýváním zón jednotlivých analytů, což vzhledem k velmi nízkým koncentracím (řádově stovky mikromolů na litr u chloridů, jednotky až desítky mikromolů na litr u dusičnanů a dusitanů) nebylo únosné.

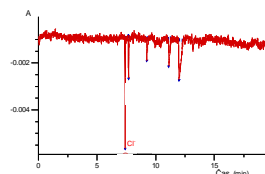
Bylo proto potřeba otestovat jiné elektrolyty, které by poskytly vhodné absorbní pozadí pro analýzu. Zkoušeny byly kyselina benzoová, 3,5-dinitrobenzoová a chroman draselný. Jako nejvhodnější se ukázal systém skládající se z **7,5mM chromanu, 0,5 mM CTAB o pH 9,0**. Separace sledovaných iontů byla na základní linii. Na základě záznamů DAD byla jako nejvhodnější vlnová délka pro detekci zvolena délka 380 nm. Separace probíhala při -25 kV.

Citlivost metody pro dusičnanů a dusitanů byla nízká, proto byly analyzovány chloridy, které poskytovaly spolehlivě kvantifikovatelnou odezvu. Na směsi standardů byly změněny základní validační parametry. Byla zjištěna kalibrační křivka chloridů v rozmezí 50-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Její rovnice byla: $y = -2\cdot 10^{-5}x - 5\cdot 10^{-5}$ a korelační koeficient 0,9985. Opakovatelnost plochy chloridů ve směsi standardů byla testována pro koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s RSD = 2,08%.



Elektroforeogram směsi standardů

Systém byl aplikován na jedenáct reálných vzorků. Byla zjištěna značná variabilita obsahu daných analytů. Přibližně u poloviny vzorků byla koncentrace chloridů dostatečná pro kvantifikaci. CZE metoda pro stanovení dusičnanů a dusitanů bude dále optimalizována (např. pomocí *off-line* prekoncentrace). U vybraného vzorku byla zjištěna opakovatelnost plochy píku chloridů RSD=7,31 %.



Elektroforeogram reálného vzorku

PODĚKOVÁNÍ

Práce je řešena za příspěví GAUK 306/2005 BCH, Výzkumného záměru MSM 0021620822 a MSM 0021620820.

Jiří Šafra¹, Marie Pospíšilová¹, Jaroslav Chládek²

¹ Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

² Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, Ústav farmakologie, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

DEVELOPMENT OF STACKING-CZE METHOD FOR ANALYSIS OF PHENOLIC ACIDS IN PLANT EXTRACTS OF EPILOBIUM PARVIFLORUM

Jirí Šafra, Marie Pospisilová, Jan Hasek, Andrea Kavalírová

Charles University, Department of Analytical Chemistry, 05 Hradec Králové, Czech Republic

The phenolic acids (cinnamic, gentisic, p-coumaric, ferulic, vanillic, syringic, caffeic and chlorogenic acid) were analyzed by capillary zone electrophoresis. On-line analyte preconcentration was carried out by large volume hydrodynamic injection followed by removal of the bulk of low conductivity sample-matrix by polarity switching.

The optimal electrolyte system consisted of 50mM sodium tetraborate with pH 9.0 (adjusted by 0.1M phosphoric acid) containing 2 % of α -cyclodextrine. The separations were carried out with a fused silica capillary (effective length 50 cm, I.D 50 μ m) at 200 nm.

The appropriate conditions for the preconcentration procedure were optimized by varying the injection volume (99 sec for 100 mBar) and the polarity switching time (1.0 min).

Under the optimized conditions, satisfactory calibration ranges (0.1-2.0 mg/ml, R=0.9979-0.9995), detection limits (0.01 μ g/ml-0.025 μ g/ml) and good repeatability of the peak areas (RSD: 2.76-5.69 %, n=6) were achieved.

After validation, the developed method was used for the quantification of selected constituents occurring in *Herba epilobi*. The method should be able to be used in identification and quantitative evaluation of the crude drug.

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency of Charles University No. 306/2005/BCH, Internal grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. NL/7689-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.



DEVELOPMENT OF CZE METHOD FOR THE ANALYSIS OF PHENOLIC ACIDS IN *EPILOBIUM PARVIFLORUM* USING STACKING PHENOMENA IN ELECTROMIGRATION

Jiří Šafra, Marie Pospíšilová, Jan Hašek

Department of Analytical Chemistry
Pharmaceutical Faculty of Charles University
Heyrovského 103/3, 500 03 Hradec Králové

INTRODUCTION

The plant drug called *Herba epilobi* is obtained from shoots of some species of genus *Epilobium* (*E. parviflorum*, *E. montanum*, *E. roseum* and *E. colinum*). It is a traditional drug for prostate treatment and disinfection of urinary tract. The tannin-containing drug is characterized by the presence of sterols and other useful compounds, e.g. flavonoids and aromatic acids. These compounds belong to the group of antioxidants. This work deals with the analysis of the selected aromatic acids.

AIM OF THE WORK

The aim of the work was to develop CZE method for the determinations of eight phenolic acids (cinamic acid, gentisic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, syringic acid, caffeic acid and chlorogenic acid) in *Herba epilobi*. To enhance the detection sensitivity in CZE, the large-volume sample stacking technique with polarity switching mode was used. It was necessary to find the suitable electrolyte system, injection volume and polarity time switching.

EXPERIMENTAL

COMPOUNDS UNDER STUDY

Studied compounds belong to the antioxidants. They can be divided into two groups: derivatives of benzoic acid (vanillic acid, syringic acid and gentisic acid) and derivatives of cinnamic acid (cinamic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid and chlorogenic acid).

	R4	R3	R2	R1	R	t_R [min]
Vanillic acid	-H	-H	-OH	-OCH ₃	4.45	
Syringic acid	-H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	4.33	
Gentisic acid	-OH	-H	-H	-OH	3.01	

	R4	R3	R2	R1	R	t_R [min]
Cinamic acid	-H	-H	-H	-H	4.43	
p-coumaric acid	-H	-OH	-H	-H	4.10	
Caffeic acid	-H	-OH	-OH	-H	4.04	
Ferulic acid	-H	-OH	-OCH ₃	-H	4.04	
Chlorogenic acid	-OH	-OH	-H	-H	3.96	

INSTRUMENT

Capillary electrophoresis system P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter equipped by FDA was used. Communication with PC a analysis control was supported by 32 Karat Software 4.01. The separations were performed in fused silica capillary, I.D. 50 µm and total length 60 cm (so effective length was 50 cm).

CHEMICALS

All chemicals were of analytical grade quality. Cinamic acid, gentisic acid, coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, syringic acid, caffeic acid, cyclo-dextrine and Methanol Chromasorb® for HPLC were provided by Sigma Aldrich. Sodium tetraborate and phosphoric acid were obtained from Lachema Brno. *Epilobium parviflorum herba* was bought in Pharmaceutum - Pharmacy in Hradec Králové.

Standard solutions and electrolytes

Standard solutions (100 µg/ml) were prepared by dissolving of each compound in 50.00 ml of methanol and degassed in a ultrasonic bath. The final model mixtures and the electrolyte solutions contained 10 % (v/v) of methanol.

SAMPLE PREPARATION

2,000 g of dried pulverised plant drug were extracted by 50.00 ml of methanol in a ultrasonic bath for 30 min. The suspension was filtered and the solution was kept in a refrigerator. Before the CZE analysis, it was diluted with water to contain 10 % (v/v) of methanol, degassed by sonication and filtered through membrane filter Millex®-LCF 0.5µm.

RESULTS AND DISCUSSION

CZE CLASSIC MODE OPTIMISATION

= CZE with a standard hydrodynamic injection process (injection volume representing 1 % of the capillary volume). The BGE comprised a borate buffer due to the potentiality of borate complexation with α -diphenolic groups. Several concentrations of borate, methanol and α -cyclodextrine were tested.

Effect of borate concentration

Chlorogenic acid and caffeic acid form complexes with borate. It is caused by ortho-dihydroxyphenyl moieties in their structures. Effect of borate concentration was observed with pH 9 for 10, 30, 50 and 70 mM borate. According to increasing concentrations, the analysis times become higher. The optimum peak symmetry and area were achieved with 50 mM borate.

Effect of pH

pH value is an important parameter to influence an electroosmotic flow and compound ionization. Tested pH values were 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2 and 9.4. Phenolic acids have pKa between 3.0 and 4.5, thus they are completely ionized in the electrophoretic system. In the range from 8.4 to 9.0, the poor resolutions of all analytes were achieved. The pH above 9.0 resulted in longer analysis times. As the optimum choice pH 9.0 was taken which provided the best results in terms of the resolution of the acid or our interest.

Effect of the methanol addition

The methanol content affects analysis time, peak symmetry and resolution. We tested 5%, 10% and 20% (v/v) of methanol in BGE. With the increasing methanol concentration, the migration times of acids became higher and the baseline quality and the resolution decreased. The BGE without the addition of methanol was used.

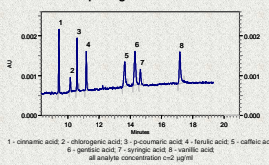
Effect of α -cyclodextrine

The separation quality was significantly influenced with cyclodextrine addition (tested concentrations: 2% and 5%). The migration times and order of acids were changed but all the compounds were separated to baseline. Total analysis time was satisfactory. 2 % of α -cyclodextrine was the optimum concentration.

Optimal conditions

BGE	50mM borate + 2 % α -cyclodextrine
pH	9.0
Solvent	water
Temperature	25°C
Voltage	20 kV
Injection	30 mBar; 14 sec
Detection	200 nm
Capillary	Fused silica, I.D. 50 µm, effective length 50 cm

Electropherogram in classic mode



METHOD VALIDATION

Calibration parameters

Acid	Calibration curve $y = kx + q$	k	q	R	s_{rel}
Cinamic	$y = 77585x - 2438.8$	1684.9	2065	0.9993	2559.8
Chlorogenic	$y = 26418x - 2733.7$	957.3	1173.2	0.9980	1454.3
Coumaric	$y = 77029x - 3346.3$	3855.5	4725.1	0.9993	6857.3
Ferulic	$y = 63113x - 2474.7$	2165.3	2653.7	0.9962	3289.5
Caffeic	$y = 107467x - 6598.8$	1879.9	2303.9	0.9995	2856
Gentisic	$y = 140207x - 6994.1$	2553.2	3129.1	0.9995	3878.9
Syringic	$y = 76853x - 7741.6$	2948.6	3613.6	0.9979	4479.4
Vanillic	$y = 141061x - 10104$	3687.5	4519.2	0.9990	5602.0

R - correlation coefficient, s_{rel} - standard deviation of k , q - standard deviation of q , s_{rel} - residual standard deviation

Limits of detection

Detection limits were calculated using the relationship $3S/N$ (S - signal, N - noise). The lowest values of LOD were found for cinamic, p-coumaric, ferulic, gentisic and syringic acids (0.01 µg/ml). Caffeic and vanillic acid LODs were 0.02 µg/ml. Chlorogenic acid showed the highest LOD = 0.025 µg/ml.

Repeatability

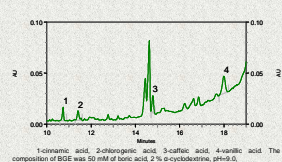
Test solution containing 1 µg/ml of analyte was repeatedly (n=6) injected. Repeatability data are summarized in following table.

Acid	RSD of peak area [%]	RSD of migration times [%]
Cinamic	2.76	0.50
Chlorogenic	3.53	0.58
Coumaric	3.50	0.86
Ferulic	2.93	0.94
Caffeic	4.11	0.85
Gentisic	3.37	1.07
Syringic	5.69	1.34
Vanillic	3.74	1.62

PLANT MATERIAL ANALYSIS

The identity of acids presented in *Herba epilobi* was confirmed by addition of standard. UV spectra of unknown peaks were also compared with spectra of standards.

Electropherogram of *Epilobium* extract



1-cinamic acid, 2-chlorogenic acid, 3-caffeic acid, 4-vanillic acid, 5-coumaric acid, 6-gentisic acid, 7-syringic acid, 8-ferulic acid. The composition of BGE was 50 mM of borate, 2% α -cyclodextrine, pH 9.0.

Assay of aromatic acids in plant extracts

Comparison of CZE results using large volume stacking with polarity switching and using ITP-CZE method in column coupling configuration developed at our department is given in following table.

Analyte	Content of analyte (mg/g dried drug)	
	CZE (stacking)	ITP-CZE
Cinamic acid	0.13	0.06
Chlorogenic acid	0.34	-
Caffeic acid	0.27	0.65
Vanillic acid	0.29	-
Coumaric acid	-	0.28
Ferulic	-	0.13

unresolved caffeic + gentisic acid

CONCLUSION

Large-volume stacking with polarity switching has been proved to be a powerful tool for a sensitivity enhancement in CZE. The 40-fold sensitivity enhancement was reached for the quantitative analysis of highly diluted samples in low conductivity matrices in this study. Finally, the use of this stacking procedure for assay of selected aromatic acids in methanolic extracts of *Epilobium herba* is presented.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Grant Agency of Charles University No. 306/2005/BCH, Internal grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. NU7659-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

CZE-STACKING MODE OPTIMISATION

= CZE with a large-volume sample hydrodynamic injection, followed by the removal of the large plug of low conductivity sample matrix out the capillary using polarity switching (injected volume representing 80 % of the capillary volume).

Stacking process:

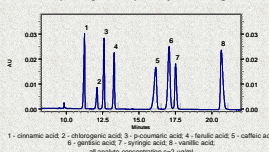
- It was necessary to find a suitable pressure, hydrodynamic injection and polarity switching time to increase the method sensitivity. The cinamic acid was chosen as a model standard.
- We had to find suitable injection pressure due to a software limitation (maximum injection time was 99 sec). Four pressure values were tested: 50, 100, 150 and 200 mBar.
- Time of polarity switching was determined using a monitoring of the electrical current. When the experimental current reached 95% of its standard value during an identical classical capillary electrophoresis, the polarity was switched.

Optimal conditions

The experimental condition are summarized in following table

Hydrodynamic injection time	99 sec
Injection pressure	100 mBar
Polarity switching time	1.0 min

Electropherogram of polarity switching mode



P 51

DETERMINATION OF CLOTRIMAZOLE AND ITS DEGRADATION PRODUCT IMIDAZOLE IN SPRAY SOLUTION BY CZE

M. Pospíšilová, J. Šafra, M. Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 (Hradec Králové) Czech Republic. Marie.Pospisilova@faf.cuni.cz

An overview of the recent trends in the development of HPLC or CE methods for the determination of impurities in drugs has been published in the recent five years (1,2). A simple RP-HPLC method was developed for the simultaneous analysis of parabens, clotrimazole and its impurities in bulk drug and topical creams (3).

A CZE method for determination of clotrimazole (CLO) and its degradation product imidazole (IMI) was developed. The separations were optimised by examining a number of experimental conditions such as buffer type and concentration, pH, suitable internal standard, methanol content, separation temperature and voltage. For the CZE separations, background electrolyte consisting of 30 mM phosphate buffer of pH 3 was used. The CZE analysis was carried out at 25 kV, 25 °C, with 60 cm x 0.075 mm ID fused silica capillary (effective length 50 cm) and UV detection at 210 nm.

The calibration curves were rectilinear ($r > 0.995$) for 0.1 – 5.0 µg/ml of CLO and 0.2 – 2.0 µg/ml of IMI (with histidine as internal standard). Precision of peak areas was 2.7% and 1.7% (n=6) for CLO and IMI respectively. The method was employed for the assay of CLO and IMI in clotrimazole spray solution during stability test. The RSD values ranged between 1.3% and 1.6% when determining 1.0 µg/ml of each analyte (n=4). The separation took ≈ 8 min and the recoveries ranged between 98 to 102%.

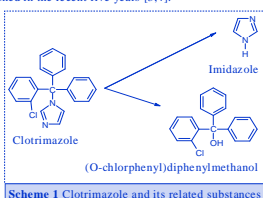
- (1) M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Electrophoresis* 22 (2001) 2542
- (2) S. Erturk, E.S. Aktas, L. Ersoy, S. Ficicioglu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1017
- (3) P. Solich, R. Hajkova, M. Pospisilova, J. Sicha, *Chromatographia* 56 (2002) S-181

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR8964-3/2006 and by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822

DETERMINATION OF CLOTRIMAZOLE AND ITS DEGRADATION PRODUCT IMIDAZOLE IN SPRAY SOLUTION BY CZE

INTRODUCTION

Clotrimazole (CLO) is an antifungal drug for dermatological use that is official in the valid editions of leading world Pharmacopoeias. Several papers dealing with HPLC and MEKC assays of CLO and its related compounds were published [1,2]. An overview of the recent trends in the development of HPLC or CE methods for the determination of impurities in drugs has been published in the recent five years [3,4].



THE PURPOSE OF THE WORK

- to investigate the feasibility of utilizing a simple and rapid CZE method for separation and determination of CLO and its degradation product imidazole (IMI)-(Scheme 1) in bulk drug and spray solution
- to find the simple way of sample preparation (from spray solution) and proper internal standard
- to validate the proposed CZE method

ELECTROPHORETIC SYSTEM

Capillary electrophoretic system P/ACETM MDQ, Beckman Coulter equipped by PDA and 32 Karat Software 4.01.

Sample

- Clotrimazole spray filling solution 1 % (CLO spray); Herbacos-bofarma Pardubice, Czech republic
- preparation before CZE:
 - dilution to $c = 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CLO (for determination of CLO)
 - 1.25 g of CLO spray diluted in 25 ml volumetric flask (for determination of IMI)
 - the solutions contained 50 % (V/V) of methanol and $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of IS = histidine (HIS)

RESULTS

Optimisation of electrophoretic conditions

The separations were optimised by examining a number of experimental conditions such as buffer type and concentration, pH, suitable internal standard, methanol content, separation temperature and voltage.

Table 1 Effect of buffer concentration (phosphate)

c [mmol·L ⁻¹]	IMI		CLO	
	time [min]	AU	time [min]	AU
100	x	x	x	x
75	4.3	9125	9.5	103908
50	4.2	7721	9.2	52937
30	4.1	8496	8.5	38195
25	3.9	8294	7.9	35644
20	3.9	7872	7.8	34846
10	3.5	6859	6.4	22202

x – poor repeatability

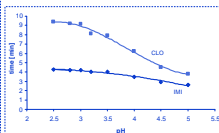


Fig. 1 Effect of pH

Electrophoregrams

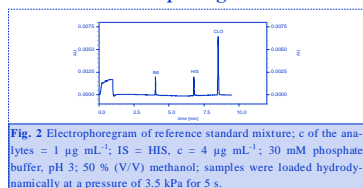


Fig. 2 Electrophoregram of reference standard mixture; c of the analytes = $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; IS = HIS, $c = 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 30 mM phosphate buffer, pH 3; 50 % (V/V) methanol; samples were loaded hydrodynamically at a pressure of 3.5 kPa for 5 s.

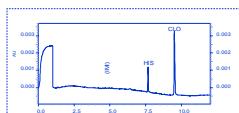


Fig. 3 Determination of CLO (Clotrimazole spray sample). Result: The preparation contained 96.15 % of declared amount of CLO.

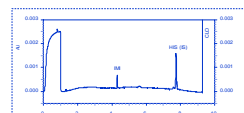


Fig. 4 Determination of IMI in real sample (spiked with potential impurity). Result: The preparation contained 0.021 % of IMI relative to the active compound (limit < 0.2 %)

Method validation

Table 2 Analytical and validation parameters of the CZE method

SST - parameters	CLO	IMI
Number of theoretical plates (N) ¹	140737	130534
Peak asymmetry	1.21	1.15
Resolution ¹	HIS-CLO=29.1	IMI-HIS=60.2
Repeatability – migration time (Intra-day RSD, %) ¹¹	0.59	0.17
Repeatability – migration time (Inter-day RSD, %) ¹¹	0.78	0.64
Repeatability – peak area (Intra-day RSD, %) ¹¹	2.69	1.69
Repeatability – peak area (Inter-day RSD, %) ¹¹	3.20	1.85
Validation data		
Precision (RSD, %) ¹²	1.29	1.58
Linearity – slope; SD of the slope	2.96; 0.16	0.2252; 0.0050
Linearity – intercept; SD of the intercept	-0.52; 0.42	0; 0.0063
Linearity – correlation coefficient	0.9954	0.9993
Accuracy (% recovery); (c=2/1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	98.0	102.9
Accuracy (RSD, %); (c=2/1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.62	1.50
Selectivity	No interference	No interference
LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.010	0.059
LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.032	0.198

¹ n = 3; ¹¹ n = 6; ¹² 4 real samples, each analyzed in triplicate; Linearity evaluated at 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for CLO and 0.2, 0.5, 1.0, 1.6 and 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for IMI, each calibration point measured in three replicates; Accuracy: n = 3, each measurement carried out in duplicate

CONCLUSIONS

A CZE method for determination of clotrimazole (CLO) and its degradation product imidazole (IMI) was developed. For the CZE separations, background electrolyte consisting of 30 mM phosphate buffer of pH 3 was used. The CZE analysis was carried out at 25 kV, 25°C, with 60 cm x 0.075 mm ID fused silica capillary (effective length 50 cm) and UV detection at 210 nm.

The calibration curves were rectilinear ($r > 0.995$) for 0.1 – 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLO and 0.2 – 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of IMI (with histidine as internal standard). Precision of peak areas was 2.7% and 1.7% (n=6) for CLO and IMI respectively. The method was employed for the assay of CLO and IMI in clotrimazole spray solution during stability test. The RSD values ranged between 1.3% and 1.6% when determining 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each analyte (n=4). The separation took = 8 min and the recoveries ranged between 98 to 102%.

REFERENCES

- M. Lin, N. Wu, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 945
- P. Solich, R. Hajkova, M. Pospisilova, J. Sicha, Chromatographia 56 (2002) S-181
- M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Electrophoresis 22 (2001) 2542
- S. Erturk, E.S. Aktas, L. Ersoy, S. Ficioglu, J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 1017

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR8964-3/2006 and by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822

M. Pospíšilová, J. Šafra, M. Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 (Hradec Králové) Czech Republic

VYUŽITÍ PŘECHODNÉ IZOTACHOFORÉZY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE PRO ANALÝZU LÁTEK S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM

ŠAFRA JIŘÍ, URBÁNEK MAREK, POSPÍŠILOVÁ MARIE

UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je progresivní analytická metoda, která nachází uplatnění v různých oborech. Přes výhody jako je vysoká separační účinnost, ekonomický provoz a environmentální šetrnost, má některé nevýhody, zejména nízkou citlivost při spektrofotometrické detekci. Tento nedostatek se dá řešit různými způsoby, jako jsou off-line předúpravy vzorku (např. SPE), které negativně ovlivňují některé validační parametry a prodlužují trvání analytické procedury. Je proto výhodné využít kombinaci kapilární zónové elektroforézy s další elektroforetickou technikou – kapilární izotachoforézou (ITP). Tento elektroforetický systém umožňuje během analýzy cíleně zakoncentrovat analyzované látky a podstatně zvýšit citlivost analýzy až o 2 řády, odstranit nežádoucí interakce s matricí a přispět ke stabilitě základní linie. Kombinaci těchto dvou elektroforetických technik lze uskutečnit dvěma způsoby, a to v dvoukolonovém (cITP) a jednokolonovém uspořádání (tITP, přechodná, transient-izotachoforéza). cITP je technika náročná na čas, zkušenost a zručnost analytika a proto lze těžko předpokládat rutinní využití v laboratoři. tITP je technika jednodušší, rychlá a efektivní a proto je žádoucí vývoj této techniky zakončené aplikací v analytické praxi složitých směsí (1-2).

Je žádoucí vyvinout potentní tITP-CZE metodu pro analýzu vybraných rostlinných konstituentů, kdy přechodnou ITP lze v elektroforetickém kapiláře indukovat řízeným složením vzorku nebo elektrolytového systému. Uvedená technika nebyla dosud pro analýzu rostlinného materiálu použita. V úvodní studii byly testovány parametry, které mohou vyvolat a ovlivňovat přechodnou ITP v CZE. Separace probíhaly v borátovém tlumivém roztoku v nepotažené křemenné kapiláře s normální polaritou nebo s obráceným elektroforetickým tokem (EOF) a negativní polaritou. Pro otočení EOF byly testovány cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a hexadimethrin bromid (HDB). Dále byl testován vliv methanolu na rychlost EOF a kapilára s vnitřním pokrytím polyvinylalkoholem. Přechodná ITP byla indukována přidávkou chloridu do vzorku. Směs modelových látek obsahovala kyselinu gentisovou, kávovou, p-kumarovou, o-kumarovou, ferulovou, syringovou a rutin. Dosažené výsledky vykazují jasné zvýšení citlivosti metody a jsou dobrým předpokladem pro potenciální aplikaci tITP-CZE pro kvalitativní a kvantitativní analýzu fenolických kyselin a flavonoidů ve farmaceutických rostlinných drogách.

- (1) URBÁNEK M., KRÍVÁNKOVÁ L., BOČEK P. : *Electrophoresis* **24**, 466-485 (2003)
- (2) URBÁNEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., POLÁŠEK, M. : *Electrophoresis* **23**, 1045-1052 (2002)

Problematika byla řešena za podpory GAUK, gr. č. 306/2005 BCH, IGA MZ ČR, gr. č. NR8964-3/2006 a Výzkumného záměru MSM 01021620822.

VYUŽITÍ PŘECHODNÉ IZOTACHOFORÉZY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE PRO ANALÝZU LÁTEK S ANTIOXIDAČNÍM ÚČINKEM

Úvod

Cílové látky

Cílové látky patří do skupiny fenolických kyselin a flavonoidů. Umenovitě se jedná o kyselinu gentisovou, kávovou, p-kumarovou, o-kumarovou, ferulovou, syringovou a flavonoidy rutin, kvercetin, narigenin a katechin.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Použitý přístroj

Práce probíhala na elektroforetickém analyzátoru od firmy Prince Technologies s DAD a ovládným softwarem DAX-3D od firmy Van Mierlo Software Consultancy.

Analýzy probíhají v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μ m a efektivní délkou 60 cm.

Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty pro analysis.

VÝSLEDKY A DISKuze

Kvalitativní složení pufru

Při výběru pufru bylo nutné zohlednit dva aspekty. Zaprve mobilita použitého pufru musela být nižší než mobilita jednotlivých analytů, aby tento pufr mohl hrát zároveň roli terminátoru v přechodné izotachoforetické fázi (indukované přidávkou vhodného vedoucího iontu, v našem případě Cl⁻). Z druhé vzhledem k pKa flavonoidů (9-11) by bylo nutné pracovat v silně bazickém prostředí, což by mělo nepříznivý vliv na analýzu. Jako ideální se proto k tomuto účelu ukázal borátový pufr, jehož ionty jsou méně pohyblivé než analyty, navíc vykazují komplexaci s vicinálními hydroxylovými skupinami flavonoidů (asykromu i cukerné části) a tím zlepšuje jejich migraci. Pro úpravu pufru byl použit amoniak, který dokáže neutralizovat rychle migrující OH ionty, což je podmínka pro TTP (1).

Systém s normální polaritou

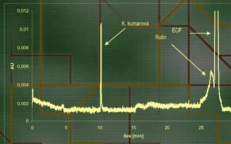
Systém s normální polaritou (pufr: 50mM borát upravený amoniakem na pH 9,0) se ukázal jako ne příliš vhodný. V uspořádání s normální polaritou docházelo k rychlému úniku chlořidů na inletu a tím byla znemožněna indukce TTP, přestože lze najít práce, kde toto uspořádání bylo funkční (2) Proto jsme se rozhodli pracovat v systému s otočeným tokem a reverzní polaritou.

Separace v systému s otočeným EOF

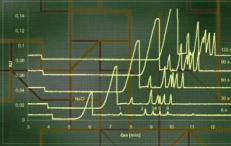
Jako první látka pro otočení EOF byl použit CTAB. Pro zpomalení EOF byl použit přídavek methanolu.

Zatímco pro fenolické kyseliny byl daný systém uspokojivý, pro flavonoidy se ukázal jako nevhodný, zejména vlivem interakcí negativních flavonoidů s pozitivními micelami CTABU došlo k tomu, že flavonoidy migrovaly v těsné blízkosti EOF (viz Obrázek 1).

Protože flavonoidy patří mezi významné antioxidanty, snažili jsme se pro otočení EOF najít takovou látku, se kterou by podobné interakce nevznikaly. Takovou látkou se ukázal být hexadimetrinbromid (HDB) v koncentraci 0,001%. EOF byl otočen a zpomalen opět přidávkou methanolu. Přechodnou izotachoforézu v tomto systému ilustruje obrázek 2 (zvětšení piků v závislosti na době dávkování; lineární odezva výšky piků na době dávkování v rozmezí 6-90 s, R² 0,99); s delším dávkováním se prodlužuje trvání TTP, zkracuje prostor



Obrázek 1 Migrace kyselin a flavonoidů v systému 50mM borát, 0,5mM CTAB, 30% MeOH, pH 9,0

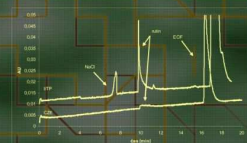


Obrázek 2 TTP v systému 50mM borát, 0,001% HDB, 30% MeOH, pH 9,0; 1-k.kávová, 2-k.pentisová, 3-k.p.kumarová, 4-k.o.kumarová, 5-k.ferulová, 6-k.syringová; c=50ug/mL, přídavek 100mM NaCl

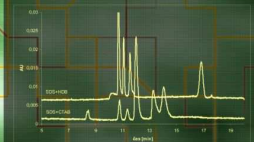
pro CZE a zhoršuje separaci).

V systému s HDB byly omezeny interakce mezi flavonoidy a činidlem otáčejícím tok. Vyskytl se však problém s jejich sorpcí na stěnu kapiláry (projevila se chvostujícími piky (viz Obrázek 3)).

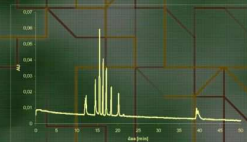
Tento problém jsme se rozhodli řešit použitím směsi kationického a anionického surfaktantu, která podle literatury otáčí tok, ale zároveň dojde ke změně struktury micel (3). Podle našeho předpokladu tak odpady interakce s flavonoidy. Začali jsme kombinaci SDS a CTAB. Poměr SDS a CTAB musí být 1:3, jinak dochází k vyražení surfaktantu. Výsledná koncentrace tenzidů byla 0,5mM. Stabilita pufru byla bohužel špatná, docházelo k vyražení micel, kalení pufru a urychlování EOF. Proto pro větší zpomalení EOF nešlo použít více SDS. Methanol šel použít do obsahu 30%, ale problém s reprodukovatelností EOF zůstal. Pozitivní bylo, že se vyřešil problém se sorpcí flavonoidů na stěnu. Reprodukovatelnost EOF jsme se rozhodli zlepšit zatím nepopsanou kombinací SDS a HDB. Koncentrace HDB byla konstantní (0,001%) a obsah SDS se zvyšoval od 0,5mM-2,5mM. Círost pufru se zvyšujícím se obsahem SDS jsme zajišťovali přidávkou methanolu. V tomto uspořádání jsme dosáhli výrazného zpomalení toku a zároveň se nám podařilo omezit sorpci flavonoidů (nedocházelo k chvostování z Obrázku 3). Srovnání kombinace



Obrázek 3 Chvostování rutinů v systému s HDB (podalinky viz. Obrázek 2)

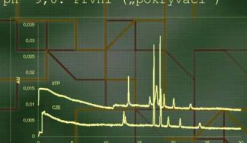


Obrázek 4 Srovnání eliminace sorpce pomocí přidávky SDS+CTAB a SDS+HDB do pufru 4 flavonoidů (rutin, kvercetin, narigenin a katechin) v systému tvořeném 100mM borátem, 50% MeOH, 2,5mM SDS a 0,001% HDB o pH 9,0. Přídavek 100mM NaCl ke vzorku.



Obrázek 5 Elektroforetický záznam směsi 4 kyselin (kumarová, ferulová, kávová a galová) a 4 flavonoidů (rutin, kvercetin, narigenin a katechin) v systému tvořeném 100mM borátem, 50% MeOH, 2,5mM SDS a 0,001% HDB o pH 9,0. Přídavek 100mM NaCl ke vzorku.

SDS+CTAB a SDS+HDB je na obrázku 4. Záznam klasické CZE pro směs flavonoidů a fenolických kyselin ilustruje obrázek 5. Pro zlepšení stability BGE (předcházení vyražení) a mobility EOF byla upravena procedura dynamického pokrývání kapiláry. Byly připraveny dva pufrů. Základ obou tvořil 100mM borát v 50% methanolu upravený amoniakem na pH 9,0. První („pokrývání“) pak obsahoval 0,001% HDB, druhý („separační“) obsahoval 2,5mM SDS. Vlastní dynamické potažení kapiláry proběhlo během promývání před analýzou, kdy byla kapilára promyta nejprve „pokrývacím“ a až poté „separačním“ pufrům. Tato procedura byla použita pro analýzu směsi 4 kyselin a 4 flavonoidů (viz obrázek 5) a to jak pouhou CZE tak TTP. Výsledky je uveden na obrázku 6. Oproti kombinaci SDS+CTAB zde bylo možné použít daleko vyšší obsah methanolu (zkoušeli jsme až 70%).



Obrázek 6 Elektroforetický záznam směsi flavonoidů a kyselin získaný klasickou CZE (c analytů = 40 ug/mL) a s indukovanou TTP (c analytů = 10 ug/mL; přídavek 100mM NaCl, díky TTP však jsou piky přibližně stejné velké).

LITERATURA

- (1) KRIVÁNKOVÁ, L., BŘEZKOVÁ, M., GEBAUER, P., BOČEK, P. : Electrophoresis 2004, 25, 3406-3415
- (2) WANG, C., LUCY, C.A. : Electrophoresis 2004, 25, 825-832
- (3) RIAZ, A., CHUNG, D.S. : Electrophoresis 2005, 26, 668-673

PODEKOVÁNÍ

Problematika je řešena za podpory:
 . GAUK, grantu č. 306/2005 ECH,
 . IGA MZ ČR, grantu č. NR964-3/2006 a
 . Vyzkumného záměru MSM 01021620822 ...

Jiří Šafa, Marek Urbánek,
 a Marie Pospíšilová

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta
 Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Pharmaceutical Analytics

A008

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS IN CZECH REPUBLIC

Šafra J.¹, Pospíšilová M.¹, Pospíšil M.²

¹Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Hradec Králové, Czech Republic

²Pharmacy "U Anděla Strážce", Jaroměř, Czech Republic

Capillary electrophoresis is a powerful technique, highly valued for its separation efficiency, short analysis time and low operating costs.

An overview mapping the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of bioactive compounds in Czech Republic covers period between 2000 and 2005. Instrumentation and various detection techniques of the basic electrophoretic methods – isotachopheresis (ITP), capillary zone electrophoresis (CZE), isoelectric focusing (IEF) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) – are discussed as well as combined techniques such as ITP-CZE or CZE-MEKC.

CZE and MEKC are two of the techniques most commonly used (50 and 20 % of all articles). Application areas include the analysis of active compounds in formulations or biological fluids, compounds of natural origin (flavonoids, alkaloids) or CE analyses of DNA fragments, enzymes or hormones. The most distinguished Czech research teams and laboratories are presented. The advantages and drawbacks of CE methods relative to the corresponding HPLC techniques are also discussed.

Acknowledgements

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Project No. NR8964-3/2006), by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822 and by GAUK 306/2005 BCH.

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS IN CZECH REPUBLIC

INTRODUCTION

Electrophoresis has become a powerful and widespread tool for various kind of analysis. It disposes of basic techniques (CZE etc.), advanced techniques (combination of several methods) and there are also some theoretical approaches for the prediction of the most suitable electrophoretic system.

Many different analytes are possible to analyze by capillary electrophoresis. This standpoint is discussed in the work as well as running commentary.

The poster brings an overview of electrophoretic methods used in Czech Republic in the year period 2000-2006.

USED METHODS

Capillary zone electrophoresis (despite of some disadvantages, like lower sensitivity) is widely used electrophoretic method. It is easy to operate, fast and ecological. Most of published methods (almost 60 %) performed simple CZE. The second most frequent method is MEKC (about 20 %). 10 % of published papers investigated relatively complicated technique ITP-CZE. Other techniques didn't exceed 5 %.



BASIC METHODS

CZE

- check of quality of pharmaceuticals
 - thiazidine derivatives [1] with UV detection at 200 nm
 - chiral separation of rivastigmine [2] (UV detection at 200 nm)
 - determination of bupropion and nortriptylin [3] (UV detection at 232 nm)
- monitoring of active compounds in biological material
 - doxorubicin and daunorubicin in human plasma [4] (fast-scanning UV/VIS, 210 nm)
 - estradiol in pig blood [5] (UV detection at 222 nm)
 - thiopurinate in human serum, urine and plasma [6] (UV detection at 200 nm)
 - ethylglucuronide in human serum [7] (UV detection at 214 nm)
- aminoacids
 - L-histidin, study of sample preparation for trace analysis [8] (UV detection at 214 nm)
 - 20 essential aminoacids were analyzed in beer, urine, yeast, saliva and plant extracts by CZE equipped by CCD and DAD, for the selection of suitable BGE was used software PeakMaster [9]
 - PeakMaster was used also for the prediction in the analysis of 22 aminoacids in model solution [10], for determination of limiting mobilities and dissociation constants of aminoacids [11]. These predictions were verified also by experiments then.
 - aminoacids were also determined in amniotic fluid [12] and human plasma [13], both with contactless conductometric detection (CCD)
 - method for determination of D-serine and its application for monitoring of serine racemase activity [14]; authors employed UV detection at 230 nm
- other organic acids
 - separation of phenolic acids with indirect CCD like verification of previous theoretical calculation [15]
 - phenolic acids are discussed in part of Advanced techniques
- alkaloids
 - chiral separation of isurid and determination of L-enantiomer [16] in pharmaceuticals; UV detection at 230 nm
 - separation and determination of four main compounds of silymarin using UV detection at 254 nm [17]
 - study of electrochromic properties of sanguinarin and cheilerythrin isolated from *Macleaya cordata* using CZE with UV detection at 280 nm [18-19]
 - determination of sanguinarin in biological matrices (like human fibroblasts, plasma of pig etc.), using UV detection in the range 240-320 nm, compared with HPLC [20]
- other kinds of analyses
 - Enzymes and hormones; study of activity of enzyme *rhodanese* from bovine livers; UV detection at 200 nm [21] determination of synthetic derivatives of peptide hormones (CZE, UV at 206 nm) [22]
 - pollen allergens and organic pollutants in the air; study of usability of CZE with UV detection at 206 nm [23]
 - fragments of DNA; UV detection [24]
 - biogenic amines in food; CZE with conductometric detection [25]
 - plant extracts; Salvia officinalis [26]; Ginkgo biloba [27]

ITP

Isotachopheresis offers some interesting advantages. The biggest of them are the concentrating and focusing effects. Although it is more often used in a combination with other techniques (especially CZE), it can be used as a single technique. In the monitored period there occurred some papers dealing with ITP in pharmaceuticals analysis

- analysis of bopindolol in two different preparations; conductometric detection [28]
- determination of bromhexine and amoxazol in pharmaceuticals; conductometric detection [29]

MEKC

Micellar electrokinetic chromatography is just after CZE the most popular electromigration method. Its usage might be divided into the three parts.

- analysis of pharmaceuticals
 - ampicilline and related compounds; the purity verification; UV detection at 200 nm [30]
 - analysis of isothiazolones with antibacterial activity; DAD detection (wavelength not specified) [31]
 - the purity verification of phenoxymethylpenicillin; UV detection at 200 nm [32]
- natural compound in plants
 - determination of quercetin in apples, cabbage and cauliflower; SPE extraction; UV detection at 270 nm [33]
 - analysis of lignans in plant extract, pharmaceuticals and human serum; UV detection at 200 nm [34]
 - biogenic amines in spinach, tomatoes and other foodstuffs; detection techniques was not mentioned [35]
 - nine anaracids from cashew nuts were analyzed by conventional MEKC as well as by reversed flow MEKC; detection was performed by MS; [36]
- drug monitoring in biological material
 - clearance monitoring of diltiazemolite in pig livers and its usage during biochemical experiments; UV detection at 200 and 343 nm [37]

- homocysteine in human plasma was analyzed using on-capillary reaction with DPDS for specific detection; UV detection at 343 nm [38]
- cystein in human urine; UV detection at 343 [39]

Some MEKC methods were developed simultaneously with CZE methods mentioned above [9,22,23]

CEC

Capillary electrochromatography is a hybrid technique. During the last six years it was used just once for the study of interaction between drugs (e.g. acetylsalicylic acid, ketoprofen, warfarine etc.) and liposomes. UV detection was performed, wavelength not specified. [40]

IEF

Isoelectric focusing is a minor techniques in Czech Republic. It was performed for the analysis of proteins (e.g. cytochrom c, bovine serum albumin, myoglobin etc.) from biological matrix. UV detection at the range 260-360 nm and fluorometric detection (excitation at 365 nm, emission at 418 nm) was employed. [41]

ADVANCED TECHNIQUES

Advanced techniques pose effective way to improve some limitations of the simple techniques. detection limits most of compounds and sample purification. Often they are performed by different techniques combination.

ITP-CZE

ITP is often combined with CZE. It brings many advantages such as sample concentration and focusing of analytes and elimination of ballast compounds.

- phenolic acids and flavonoids in plant material (*Sambucus nigra*, *Crataegus*) were analyzed in BGE-S-BGE mode; UV detection at 254 nm [42]
- the same mode was used for the determination of flavonoids in the extract from *Hypericum perforatum*; UV detection at 254 nm [43] and for the determination of phenolic acids in *Herba epilobi*; UV detection at 270 nm [44]
- analysis of chlorides in potable water without any sample preparation; T-S-T mode; conductometric detection [45]
- domoic acid in shellfish and algae was analyzed in T-S-T mode; UV detection at 242 nm [46]
- lutein, the synthetic analogue of luteinizing hormone, was analyzed in BGE-S-BGE mode; UV detection at 220 and 254 nm and conductometric detection were employed [47]

Polarity switching

Another approach for concentration increasing is based on injection of large volume of sample. It is followed by removal of the bulk of the low conductivity sample matrix and polarity switching. It was applied for the analysis of phenolic acids (UV detection at 200 nm) and resulted into the 40 fold sensitivity enrichment [48].

Off-line HPLC – CZE

The coupling of these methods was employed to discover minor changes in the structure of collagen caused by posttranslational modifications by sugars. The collagen mixture was separated by RP-HPLC and the eluate from this separation was analyzed by CZE [49].

PREDICTIVE TECHNIQUES

Sometimes it is possible to use the theoretical background for the prediction of analysis parameters and suitable buffer selection (without previous experiments). Usually this prediction is verified consequently.

PeakMaster is original software developed by group of prof. Gaš from Faculty of Science of Charles University in Prague. Its usage was described at several papers. Some of them were mentioned above [9-10].

Artificial neural network was used for developing and optimizing of the capillary electrophoretic method for the determination of active components of *Ginkgo biloba* [27].

WORKING GROUPS

Most of all the research is provided by academic institutions like universities or research institutes by health organizations. Much less the private companies publish in scientific journals (e.g. *IVAX Pharmaceuticals*, *Opava*, *Czech Republic*).

INSTRUMENTATION

Capillaries

Uncoated, fused silica capillaries are the most frequent choice of CE researchers. The inner diameter of 50 µm is often used; 75 µm when the higher sensitivity is required. The average effective length is 70 cm.

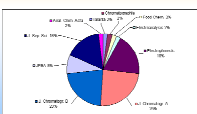
Instruments

- The instruments used:
 - Beckman Coulter (Fullerton, USA)
 - Hewlett Packard (Palo Alto, USA)
 - Spectrophoresis (Thermo Separation Products, Fremont, USA)
 - Villa Labeco (Spáská Nová Ves, Slovak republic)

Detection

As evident from overview mentioned above, the UV spectrophotometric detection is the most popular technique. The conductometric detection and contactless conductometric detection are marginal and supplementary.

JOURNALS



REFERENCES

- MATALOVÁ, R., JEJLÍNEK, I., PUMERA, M., BARBE, J.; *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 129-132
- KAVÁLÍKOVÁ, A., POSPÍŠILOVÁ, M., KARLÍČEK, R.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 42-51
- HAMOUDOVÁ, R., POSPÍŠILOVÁ, M., JPBÁ 2006, 41(4), 1463-1476
- GAVENDA, A., ŠEVČÍK, J., PŠOTOVÁ, J., BEDNÁR, P., BARTÁK, P.; *Electrophoresis* 2001, 22, 2762-2765
- MALOVANÁ, S., GAJDOŠOVÁ, D., BENEŠLÍK, J., HAVEL, J.; *J. Chromatogr. B* 2001, 760, 37-43
- ŠÁZELOVÁ, P., KAŠIČKA, V., KOVAL, D., PRUSÍK, Z., PELTRE, G.; *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 303-311
- KRIVÁNKOVÁ, L., ČASLAVSKÁ, J., MALÁŠKOVÁ, H., GEBAUER, P., THORMANN, W.; *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 2-8
- KRIVÁNKOVÁ, L., GEBAUER, P., PANTUČKOVÁ, P., BOČEK, P.; *Electrophoresis* 2002, 23, 1833-1843
- COŠPAL, P., ZUSKA, J., VAN DE GOOR, T., SMITH, V., GAŠ, B.; *Electrophoresis* 2003, 24, 671-677
- VČELÁKOVÁ, K., ZUSKOVÁ, I., KENNELER, E., GAŠ, B.; *Electrophoresis* 2004, 25, 309-317
- ZUSKOVÁ, I., NOVOTNÁ, A., VČELÁKOVÁ, K., GAŠ, B.; *J. Chromatogr. B* 2006, 841 (1-2), 129-134
- TUMA, P., SAMCOVÁ, E., ANDELOVÁ, K.; *J. Chromatogr. B* 2006, 839(1-2), 12-18
- SAMCOVÁ, E., TUMA, P.; *Electroanalysis* 2006, 18 (2), 152-157
- KOVAL, D., JŘÁŠKOVÁ, J., ŠTRÍŠKOVSKÝ, K., KOVALINKA, J., KAŠIČKA, V.; *Electrophoresis* 2006, 27(13), 2558-2566
- KUBÁN, P., ŠTERBOVÁ, D., KUBÁN, V.; *Electrophoresis* 2006, 27(7), 1305-1375
- KVASNÍČKA, J., BĚBA, B., ČVAK, L.; *J. Chromatogr. A* 2005, 1066, 255-258
- KVASNÍČKA, J., BĚBA, B., ŠEVČÍK, R., VOLDRICH, M., KRÁTĚK, J.; *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 239-246
- VĚLKOVÁ, M., BARTÁK, P., KUBÁN, V.; *J. Chromatogr. A* 2004, 1040, 141-145
- VĚSPALÉČ, R., BARTÁK, P., ŠIMÁNEK, V., VLČKOVÁ, M.; *J. Chromatogr. B* 2003, 797, 357-366
- KOSINA, P., ŠEVČÍK, J., MODRIANSKY, M., GAVENDA, A., BEDNÁR, P., BARTÁK, P., WALTEROVÁ, D., ULIRCHOVÁ, J.; *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 679-685
- NOVÁKOVÁ, S., TELNAROVÁ, M., GLATZ, Z.; *J. Chromatogr. B* 2003, 990, 189-195
- SOLINOVÁ, V., KAŠIČKA, V., KOVAL, D., BARTH, T., CIENCIALOVÁ, A., ŽÁKOVÁ, L.; *J. Chromatogr. B* 2004, 808, 75-82
- ŠÁZELOVÁ, P., KAŠIČKA, V., KOVAL, D., PRUSÍK, Z., PELTRE, G.; *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 303-311
- KABÁTEK, Z., KLEPÁRNÁK, K., GAŠ, B.; *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 305-310
- KVASNÍČKA, F., VOLDRICH, M.; *J. Chromatogr. A* 2006, 1103(1), 145-149
- HAMEĐA, A. B., GAJDOŠOVÁ, D., HAVEL, J.; *J. Sep. Sci.* 2006, 29(8), 1188-1192
- ŠHABAN, E., DINGMAR, G., JOSEF, H.; *J. Sep. Sci.* 2006, 29(8), 1174-1178
- URBÁNEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., POLÁŠEK, M.; *JPBÁ* 2002, 28, 509-515
- POSPÍŠILOVÁ, M., POLÁŠEK, M., JOKL, V.; *JPBÁ* 2001, 24, 421-428
- DOLEŽALOVÁ, M., KUNTEOVÁ, B., JOBÁNEK, R.; *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 560-568
- BARTÁK, P., BEDNÁR, P., FRIEĐECKÝ, D., HAVIGER, A., ŠEVČÍK, J.; *J. Chromatogr. B* 2001, 768, 323-325
- DOLEŽALOVÁ, M., ČAPOVÁ, H., JOBÁNEK, R.; *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 701-708
- DADÁKOVÁ, E., PROCHÁZKOVÁ, E., KRÍZEK, M.; *Electrophoresis* 2001, 22, 1573-1578
- ŠTERBOVÁ, H., ŠEVČÍKOVÁ, P., KVASNÍČKOVÁ, L., GLATZ, Z., SLANINA, J.; *Electrophoresis* 2002, 23, 252-259
- KALÁČ, P., ŠEVČÍKOVÁ, S., FELKÁNKOVÁ, T.; *Food Chem.* 2002, 77, 349-351
- CESLA, P., BLOMBERG, L., HAMBERG, M., JANDERA, P.; *J. Chromatogr. A* 2006, 1115(1-2), 253-269
- GLATZ, Z., ŠEVČÍKOVÁ, P.; *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 237-241
- ŠEVČÍKOVÁ, P., GLATZ, Z., TOMANĎL, J.; *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 197-204
- ŠEVČÍKOVÁ, P., GLATZ, Z.; *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 734-738
- MANETTO, G., BELLINI, M.S., DAY, Z.; *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 281-289
- HORKÁ, M., WILLMANN, T., BLUM, M., NORDING, P., FRIEDL, Z., ŠLAIS, K.; *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 65-71
- URBÁNEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., POLÁŠEK, M.; *Electrophoresis* 2002, 23, 1045-1052
- URBÁNEK, M., BLECHTOVÁ, L., POSPÍŠILOVÁ, M., POLÁŠEK, M.; *J. Chromatogr. A* 2002, 988, 261-272
- ŠAFRA, J., POSPÍŠILOVÁ, M., ŠPIKOVÁ, J.; *Chromatographia* 2006, 64(1-2), 37-43
- PRÁUS, P.; *Talanta* 2004, 62, 977-982
- KVASNÍČKA, F., ŠEVČÍK, R., VOLDRICH, M.; *J. Chromatogr. A* 2006, 1113(1-2), 255-259
- ŠÁZELOVÁ, P., KAŠIČKA, V., ŠOLINOVÁ, V., KOVAL, D.; *J. Chromatogr. B* 2006, 841(1-2), 145-151
- ŠAFRA, J., POSPÍŠILOVÁ, M., KAVÁLÍKOVÁ, A.; *JPBÁ* 2006, 41(3), 1022-1024
- MIKULÍKOVÁ, K., ECKHARDT, A., MIKŠÍK, I.; *J. Sep. Sci.* 2006, 29(8), 1126-1131

ACKNOWLEDGEMENTS

- This work was supported by
- the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Project No. NR6964-92006)
 - by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822
 - and by GAUK 306/2005 BCH.

Jiří Šafra¹, Marie Pospíšilová¹, Miroslav Pospíšil²

¹Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Heyrovského 1203,

500 05 Hradec Králové, Czech Republic

²Pharmacy "U Anděla Strážče", Jaroměř, Czech Republic

**DEVELOPMENT OF CD-MEKC METHOD FOR THE ANALYSIS OF
FLAVONOIDS IN COMMERCIAL GINKGO PHYTOPHARMACEUTICALS**

J. Šafra, M. Pospíšilová, M. Kočí

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy of Charles University,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

Selected flavonoids (catechin, epicatechin, rutin, quercetin, luteolin, hesperetin, apigenin, kaempferol and isorhamnetin) were analyzed by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using SDS as surfactant and hydroxypropyl- γ -cyclodextrine as modifier.

The analyses were performed using a fused silica capillary (50 cm effective length, 75 μ m I.D., applied voltage 30 kV, the temperature 20°C, hydrodynamic sample injection at a pressure of 50mBar for 6 s) with UV detection at 210 nm.

The optimization of the method has been focused on the type and concentration of the running buffer (borate, phosphate) and surfactant (SDS, cholate, tween), the effect of addition of organic solvent (methanol, ethanol, acetonitrile, 1-propanol, 1-butanol) and the effect of various cyclodextrine derivatives (α -cyclodextrine, β -cyclodextrine, γ -cyclodextrine, hydroxypropyl- γ -cyclodextrine etc.). The optimal electrolyte system consisted of 5mM phosphate, 30mM borate, 60mM SDS, 8mM hydroxypropyl- γ -cyclodextrine, 20 % methanol (v/v) and 5 % 1-butanol (v/v). The pH* = 7.6 was adjusted with NH₄OH. Propylparaben was used as the internal standard. Overall run time was 20 min.

Calibration curves were rectilinear in the ranges 1-40 μ g·mL⁻¹ for catechin, epicatechin, quercetin, luteolin and hesperetin and 2.5-100 μ g·mL⁻¹ for rutin, kaempferol, apigenin and isorhamnetin; R=0.9976-0.9999. Detection limits (0.475-1.453 μ g·mL⁻¹), quantification limits (1.567-4.795 μ g·mL⁻¹) and good repeatability of peak areas (RSD: 1.87-4.72 %; n=6) and migration times (RSD: 0.80-1.45 %; n=6) were achieved.

The method was applied to evaluate the levels of selected Ginkgo biloba components in phytopharmaceuticals including optimization of SPE as a sample pretreatment clean-up step.

Acknowledgement: This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3, by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.



Jiří Šafra

Jiří Šafra, born in 1981, obtained his M.Sc. in 2004 at the Charles University of Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 5-Year undergraduate "Master" course Pharmacy. He is currently a Ph.D. student at the Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Postgraduate studies in the field of Drug control, Studies presumed finished in 2007.

DEVELOPMENT OF CD-MEKC METHOD FOR THE ANALYSIS OF FLAVONOIDS IN COMMERCIAL GINKGO PHYTOPHARMACEUTICALS

JÍŘÍ ŠAFRA, MARIE POSPÍŠILOVÁ, MARTINA KOČÍ

DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, FACULTY OF PHARMACY OF CHARLES UNIVERSITY, HEYROVSKÉHO 1203, 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ, CZECH REPUBLIC

INTRODUCTION

Ginkgo leaves (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) are used to produce an extract containing 24% of flavonoids and 6% of ginkgolides and bilobalide. Several clinical trials showed the benefit of ginkgo extract on the symptom of "cerebral insufficiency" in the elderly [1]. The new analytical methods are therefore desirable for the extract standardization.

AIM OF THE WORK

The aim of the work was to develop a method based on micellar electrokinetic chromatography for the separation and determination of nine flavonoids (catechin, epicatechin, rutin, quercetin, luteolin, hesperetin, apigenin, kaempferol and isorhamnetin) in phytopharmaceuticals containing the standardized extract of *Ginkgo biloba* leaves.

EXPERIMENTAL

Compounds under Study

All compounds under study belong to the group of flavonoids. The flavonoids are an important group of natural compounds with antioxidant action. Rutin is a glycoside, other flavonoids studied are as the aglycones.

Instrumentation

Capillary electrophoretic system P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter equipped by PDA was used. Communication with PC and analysis control was supported by 32 Karat Software 5.

The analyses were performed using a fused silica capillary (50 cm effective length, 75 µm I.D., applied voltage 30 kV, the temperature 20°C, hydrodynamic sample injection at a pressure of 50mBar for 6 s) with UV detection at 210 nm.

Chemicals

All chemicals were of analytical grade quality. The chemicals, organic solvents and flavonoid standards were provided by Sigma Aldrich.

RESULTS AND DISCUSSION

Background Electrolyte Selection

- Considering the fact that the pK_a values of phenolic groups of flavonoids range between 9 and 11 [2] and taking into account the presence of ortho-dihydroxyphenyl moieties and their ability to form complexes with borate, borate buffer was used as background electrolyte.
- Due to very low solubility of flavonoids (especially isorhamnetin) in water it was necessary to add organic solvent into the running buffer. Ethanol, methanol and acetonitrile were tested. Acetonitrile was not suitable by reasons of unacceptable baseline drift and high current generation. Either ethanol or methanol showed good baseline and the current was acceptable. 25% (v/v) of methanol was used in further optimization.
- Improvement of a quality of the separation was observed when mixed borate-phosphate buffer was employed. The combinations of different phosphate (5-15 mM) and borate (20-60 mM) concentrations were tested but no further improving of separation was obtained. 5 mM phosphate and 30 mM borate was selected.

Surfactant Selection

- Different surfactants were tested using the buffer composed of 5 mM phosphate, 30 mM borate, 25% methanol, pH* ~ 8.0 (adj. by NH₄⁺)
- SDS, cholate, various mixture, possibly with non-ionic surfactant Tween 20
- SDS was chosen as an optimal surfactant for compounds of our interest
- number of peaks, their shape and migration times were monitored
- The concentration of SDS were tested in the range 10-70 mM
 - as known, higher concentration of SDS resulted in prolongation of migration times
 - partial separation of two first peaks (catechin, epicatechin) was observed above 50 mM SDS
 - full separation of these two peaks to the base line was obtained with 70 mM SDS but the total time of analysis was unacceptable (> 60 min)
 - 60 mM SDS was chosen as an optimal concentration

Effect of pH*

- effect of pH* was tested in the range 7.61 – 8.99
- data obtained at pH* < 7.61 were unsatisfactory
- higher pH* resulted into prolongation of migration times
 - caused by higher ionization of SDS micelles
 - also ionization degree of flavonoids increased and thus the interaction with micelles was getting worse
 - this fact resulted in poor separation of epicatechin and catechin
 - pH* 7.61 - these two compounds were fully separated
 - pH* 8.16 - the separation was partial; they co-migrated in pH* 8.35
 - pH* 7.61 was chosen as an optimum value

Effect of Cyclodextrine Addition

- several uncharged cyclodextrines were examined for improving of separation selectivity
 - α-cyclodextrine, 2-hydroxypropyl-α-cyclodextrine, β-cyclodextrine, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine, heptakis(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrine, γ-cyclodextrine and 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine
- all CDs caused a little worse separation of epicatechin and catechin
- 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine improved the selectivity of the method
 - obtained electropherogram consisted of 10 fully separated (excepting epicatechin – catechin) peaks
 - as shown later the higher number of peaks was a result of the unexpected chiral

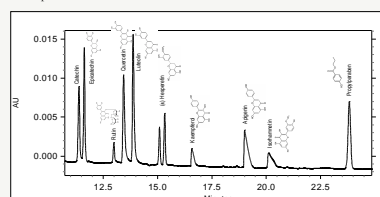
separation of hesperetin enantiomers

- concentration of 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine was optimized in the range 3-10 mM; 8mM was found to be an optimal concentration

- the quality of separation of epicatechin and catechin was improved by addition of 5% (v/v) of 1-butanol into the running buffer

Optimal conditions

- The optimum running buffer consisted of
 - 5 mM phosphate – 30 mM borate buffer
 - 60 mM SDS
 - 20% (v/v) methanol, 5% (v/v) butanol
 - 8 mM 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine
 - pH* 7.60



METHOD VALIDATION

Calibration Parameters

- calibration parameters were calculated with IS (propylparaben)

	concentration (µg/mL)	calibration curve $y = ks + q$	s_k	s_q	r	s_{low}
Catechin	1.07 - 42.80	$y = 0.0991x - 0.0223$	0.0020	0.0479	0.9992	0.0725
Epicatechin	1.00 - 40.00	$y = 0.1058x + 0.0076$	0.0032	0.0711	0.9982	0.1076
Rutin	2.59 - 103.60	$y = 0.0346x - 0.0593$	0.0005	0.0304	0.9995	0.0460
Quercetin	1.07 - 42.80	$y = 0.0763x - 0.0220$	0.0005	0.0114	0.9999	0.0173
Luteolin	1.12 - 44.80	$y = 0.0859x - 0.0528$	0.0014	0.0361	0.9994	0.0547
Hesperetin	1.10 - 44.00	$y = 0.0799x - 0.0361$	0.0012	0.0298	0.9995	0.0450
Kaempferol	2.59 - 103.60	$y = 0.0560x + 0.0492$	0.0014	0.0813	0.9988	0.1229
Apigenin	2.53 - 101.20	$y = 0.0769x + 0.1133$	0.0027	0.1526	0.9976	0.2308
Isohamnetin	2.50 - 100.00	$y = 0.0565x + 0.0825$	0.0014	0.0806	0.9987	0.1219

y is peak area, x the concentration in µg/mL, s_k the standard deviation, and r the correlation coefficient

LOD, LOQ

- the values were calculated according to ICH guideline Q2(R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*
- the approach based on Signal-to-Noise ratio (3:1 for LOD, 10:1 for LOQ) was performed

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Catechin	0.51	1.69
Epicatechin	0.48	1.58
Rutin	1.45	4.84
Quercetin	0.66	2.20
Luteolin	0.59	1.95
Hesperetin	0.63	2.10
Kaempferol	0.91	3.02
Apigenin	0.66	2.21
Isohamnetin	0.90	3.00

Repeatability

	n=6	c (ng/mL)	time (%)	area/IS (%)
Catechin	21.4	0.85	2.91	3.00
Epicatechin	20.0	0.80	3.00	3.00
Rutin	51.8	0.88	1.84	4.72
Quercetin	21.4	1.28	3.78	3.78
Luteolin	22.4	1.21	3.78	3.78
Hesperetin	22.4	1.02	3.47	3.47
Kaempferol	51.8	1.37	1.87	1.87
Apigenin	50.6	1.45	2.53	2.53
Isohamnetin	50.0	1.34	3.67	3.67

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVE

- the MEKC method is selective for nine flavonoids
 - chiral separation of hesperetin enantiomers was also achieved
- basic validation parameters (calibration parameters, LOD, LOQ, repeatability) were satisfactory for all analytes
- the proposed method is intended for the identification and assay of the tested flavonoids in herbal medicinal product containing the extract of *Ginkgo biloba* leaves (Several commercial ginkgo preparations on the Czech market were analysed: Ginkgo® roztok and Ginkgo tablety (Hexanel s.r.o.), Ginkgo biloba tablety (Health Link), GinkgoPrim (Walmark), Tanakin (Ipsen), Ginkgo biloba kapky (Aromatica)), and the flavonoid contents were evaluated using the method described. In order to check the efficiency of the extraction procedure a fourth extraction was performed. Many commercial preparations containing *G. biloba* extract only declare a requirement of 24% of ginkgolignol glycosides in the standardized extract but no distribution of individual flavonoids is given.)

REFERENCES

1. Bruneton, J.: Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier, 1999
2. Morin, P., Villard, F., Dreux, M., André, P. J.: *Chromatogr.* 1993, 628, 153-160

ACKNOWLEDGEMENT

Acknowledgement: This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3, the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

ANALYSIS AND SEPARATION OF CLOTRIMAZOLE AND ITS DEGRADATION PRODUCT IN PHARMACEUTICAL PREPARATION BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

M. Pospíšilová, J. Šafra, L. Vančura

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Effective impurity profiling requires separation techniques with high separation power and sufficient sensitivity (1, 2). Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) can be employed when charged and neutral compounds must be separated (3). The MEKC method with UV detection was developed and validated for determination of active pharmaceutical ingredient clotrimazole (CL) and its degradation product, (2-chlorophenyl) diphenylmethanol (CH) in a spray solution. The effects of buffer type and concentration, buffer pH, surfactant concentration, type and concentration of organic modifier and internal standard, applied voltage, temperature and injection time were investigated. Optimum separation was achieved with 15 mM phosphate buffer of pH 8.2 and 10mM β -CD containing mixture of 20 mM SDS and 30 mM sodium cholate (NaC); the separation was performed using a fused silica capillary (75 μ m ID, 50 cm effective length, applied voltage + 25 kV, hydrodynamic sample injection at a pressure of 3.45 kPa for 7 s) with UV detection at 210 nm. Overall run time was ~ 12 min, resolution of the analytes >3. Calibration curves were rectilinear in the range 0.15 – 12 μ g/ml for CL with $R > 0.9970$ and from 0.2 to 2.0 μ g/ml for CH ($R = 0.9993$), the internal standard was diclofenac sodium. The repeatability (RSD) of the retention times (peak areas) for the compounds was <1 % (<4 %), $n = 6$. The method was employed for the assay of CL and CH in Clotrimazole spray solution during stability test.

(1) U. Holzgrabe, D. Brinz, S. Kopec, CH. Weber, Y. Bitar, *Electrophoresis* 27 (2006) 2283-2292.

(2) N. Rahman, S. N. H. Azmi, H. F. Wu, *Accred. Qual. Assur.* 11 (2006) 69-74.

(3) M. J. Hilhorst, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *Electrophoresis* 22 (2001) 2542-2564.

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR8964-3/2006, by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822 and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

ANALYSIS AND SEPARATION OF CLOTRIMAZOLE AND ITS DEGRADATION PRODUCT IN PHARMACEUTICAL PREPARATION BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

M. POSPIŠILOVÁ, J. ŠAFRA, L. VANČURA

DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, FACULTY OF PHARMACY, CHARLES UNIVERSITY, HRADEC KRÁLOVÉ, CZECH REPUBLIC

INTRODUCTION

Clotrimazole (CL) is an antifungal drug for dermatological use that is official in the valid editions of leading world Pharmacopoeias. Effective impurity profiling requires separation techniques with high separation power and sufficient sensitivity [1,2]. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) can be employed when charged and neutral compounds must be separated [3]. A simple RP-HPLC method was developed for the simultaneous analysis of parabens, clotrimazole and its impurities in bulk drug and topical creams [4].

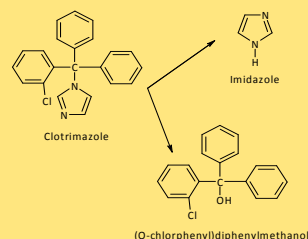
THE PURPOSE OF THE WORK

- to investigate the feasibility of utilizing a simple and rapid MEKC method with UV detection at 210 nm for separation and determination of CL and its degradation product (2-chlorophenyl) diphenylmethanol (CH) in a bulk drug and a spray solution

STRATEGY OF THE WORK

- Testing of qualitatively different buffers and surfactants
- Optimization of operating conditions
- Finding out fundamental qualitative electrophoretic characteristics for the drug standards
- Devising optimum procedure for sample pre-treatment before the MEKC measurements
- Investigation of selected validation parameters of MEKC method
- Application of MEKC for checking pharmaceuticals

CLOTRIMAZOLE AND ITS RELATED SUBSTANCES



ELECTROPHEROGRAMS

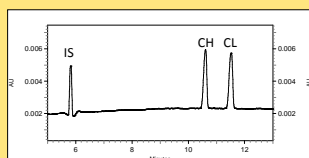


Fig. 2 Electropherogram of reference standard mixture; c of the analytes = 1 µg mL⁻¹; IS = sodium diclofenac (4 µg mL⁻¹)

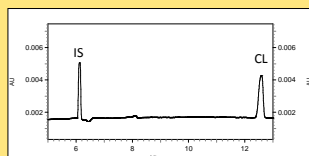


Fig. 3 Electropherogram of the real sample, Clotrimazole spray solution 1% (the conditions for the assay of CL); recovery 104,8%

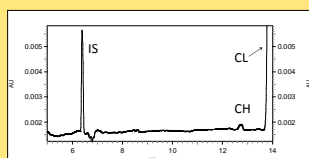


Fig. 4 Electropherogram of the real sample, Clotrimazole spray solution (the conditions for the assay of the impurity CH); stability testing (6 months); recovery 95,6%

ELECTROPHORETIC SYSTEM

Capillary electrophoretic system P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter equipped by PDA and 32 Karat Software 4.01.

SAMPLE

- Clotrimazol spray filling solution 1 % (CL spray); Herbacos-bofarma Pardubice, Czech republic
- preparation before MEKC:
 - dilution to c = 5 µg mL⁻¹ of CL with buffer (for determination of CL)
 - 1.0 g of CL spray diluted in 10 ml volumetric flask (for determination of CH)
 - the solutions contained 25 µg mL⁻¹ of IS = diclofenac sodium (DS)

OPTIMISATION OF ELECTROPHORETIC CONDITIONS

The separations were optimised by examining a number of experimental conditions such as buffer type (phosphate; phosphate-borate; ACES-Tris; MES-Tris; MOPSO-Tris; HEPES-Tris) and buffer concentration; buffer pH; suitable internal standard (terbinafin; pindolol; trolox; ethylparaben; propylparaben; chloroxine, ketoprofen; ibuprofen; sodium diclofenac); methanol content; separation temperature; voltage and injection time. SDS and sodium cholate (SCH) with different concentrations were tested as surfactants and α, β and γ-CDs as selectors.

Table 1 Effect of buffer concentration (phosphate), x – poor repeatability

mM	CH		CL	
	t (min)	AU	t (min)	AU
10,0	13,3	76198	14,6	67334
15,0	13,5	74718	14,8	73116
20,0	13,0	71745	14,3	69366
30,0	14,4	68412	16,1	69139
50,0	X	X	X	X

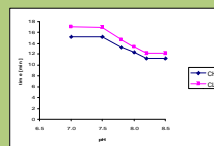


Fig. 1 Effect of pH of the buffer

Table 2 LOD and LOQ

	CH	CL
LOD (µg mL ⁻¹)	0,048	0,031
LOQ (µg mL ⁻¹)	0,148	0,102

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CLOTRIMAZOLE SPRAY 1%

The preparation contained 97.50 % of declared amount of CL; RSD=2.41%
The preparation contained 0.045 % of CH relative to the active compounds (limit < 0.2 % according to the Czech Pharmacopoeia 2005); stability after 6 months

CONCLUSIONS

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with UV detection was developed and validated for determination of active pharmaceutical ingredient clotrimazole (CL) and its degradation product, (2-chlorophenyl) diphenylmethanol (CH) in a spray solution. Optimum separation was achieved with 15 mM phosphate buffer of pH 8.2 and 10mM β-CD containing mixture of 20 mM SDS and 30 mM sodium cholate (NaC); the separation was performed using a fused silica capillary (75 µm ID, 50 cm effective length, applied voltage + 25 kV, hydrodynamic sample injection at a pressure of 3.45 kPa for 7 s) with UV detection at 210 nm. Overall run time was ~ 12 min, resolution of the analytes > 3. Calibration curves were rectilinear in the range 0.15 – 12 µg/ml for CL with R>0.9970 and from 0.2 to 2.0 µg/ml for CH (R=0.9993), the internal standard was diclofenac sodium. The repeatability (RSD) of the retention times (peak areas) for the compounds was <1% (<4%), n=6. The method was employed for the assay of CL and CH in Clotrimazole spray solution during stability test.

REFERENCES

- U. Holzgrabe, D. Brinz, S. Kopec, CH. Weber, Y. Bitar, Electrophoresis 27 (2006) 2283-2292.
- N. Rahman, S. N. H. Azmi, H. F. Wu, Accred. Qual. Assur. 11 (2006) 69-74.
- M. J. Hilhorst, G. W. Somsen, G. J. de Jong, Electrophoresis 22 (2001) 2542-2564.
- P. Solich, R. Hajkova, M. Pospisilova, J. Sicha, Chromatographia 56 (2002) 5-181

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR8964-3/2006, by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822 and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

SEPARATION AND DETERMINATION OF KETOPROFEN, METHYLPARABEN AND PROPYLPARABEN IN PHARMACEUTICAL PREPARATION BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

J. Šafra, M. Pospíšilová

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy of Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

The simple micellar electrokinetic chromatographic method (MEKC) was developed for the determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in a pharmaceutical preparation. Separation was carried out with a fused silica capillary (50 cm effective length x 75 μm I.D.) at 30 kV and UV detection at 200 nm. Optimized background electrolyte was 50 mM tricine buffer (pH* 8.3, adjusted with NaOH) containing 30 mM sodium dodecyl sulfate as a surfactant and 15 % (v/v) of methanol. Sodium diclofenac was used as an internal standard. The single separation took about 13 min.

Rectilinear calibration ranges were 100-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ketoprofen, 2-40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for methylparaben and 1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for propylparaben with correlation coefficients 0.9969 for ketoprofen, 0.9999 for methylparaben and 0.9944 for propylparaben. Repeatability of the MEKC method was satisfactory, the RSD values ranged between 0.77-2.15 % for peak areas and 0.52-0.73 % for migration times. The limit of detection at a S/N of 3 was 0.82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ketoprofen, 0.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for methylparaben and 0.53 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for propylparaben.

The MEKC method was applied to the determination of the active compounds in pharmaceutical preparation Ketoprofen gel 2.5 %, Herbacosbofarma Ltd., Bochemie Group (Pardubice, Czech Republic). No interferences from excipients present in the gel were observed. The recoveries ranged from 96.6 % to 103.9 % using the standard addition technique. No significant differences were found when statistically compared with results of RP-HPLC method reported in literature.

Acknowledgement: This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3, by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF.

SEPARATION AND DETERMINATION OF KETOPROFEN, METHYLPARABEN AND PROPYPARABEN IN PHARMACEUTICAL PREPARATION BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Jiří Šafař, Marie Pospíšilová

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy of Charles University,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

AIM OF THE WORK

- the development of capillary MEKC method with UV detection
 - for the simultaneous determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in a multicomponent pharmaceutical formulation.
 - commercially available gel containing KP, MP and PP (Ketoprofen gel 2.5 % from Herbacos-bofarma Ltd., Bochemie Group, Pardubice, Czech Republic)

EXPERIMENTAL

Instrumentation

- computer-controlled P/ACE MDQ electrophoretic analyzer equipped with a photo diode array detection system (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) was employed
- electrophoretic separations were performed in fused silica capillaries
 - effective length 50 cm with I.D. 75µm
 - temperature at 20 °C
 - constant voltage of 30 kV
 - hydrodynamic injection at a pressure of 50 mbar for 6 s
 - was used
 - detection was carried out at 200 nm

Compounds under Study

- Ketoprofen (KP)
 - a propionic acid derivative [2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid]
 - a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)
 - anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity
- Methylparaben (MP) and propylparaben (PP)
 - antibacterial and anti-fungal agents
 - commonly used as preservatives in foods, beverages, cosmetics and pharmaceuticals
 - to use together they prove a synergistic effect

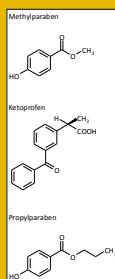


Figure 1 Structure of Compounds of interest

Sample Preparation

- ~ 2 g of the Ketoprofen gel 2.5 % was weighed and treated with 25 ml of 30 % (v/v) methanol
- the mixture was stirred intensively for 5 min and thereafter it was sonicated for 15 minutes at 40 °C.
- the resultant mixture was centrifuged at 3000 rpm for 15 min.
- 5 ml of supernatant was diluted with water to 10.0 ml and injected into the system

RESULTS

- MEKC as a potent modified electrophoretic method allowing excellent separations of neutral, hydrophobic or water insoluble species has been used

Method Optimization

- the time of analysis, a resolution of the analytes and the generated current was considered
- several electrolyte systems were examined: borate buffer, phosphate buffer, borate-phosphate buffer, TRIS adjusted by different sulfonic acids (MOPSO, HEPES, MES, BES, ACES and TAPS), tricine, bicine and glycylglycine buffers.
- Tricine buffer was selected for further optimization
- sodium diclofenac – migrating between KP and PP – was chosen as an internal standard
- tested pH* values ranged between 7.7 and 8.9
 - best results were achieved at pH* 8.3
- the tested SDS concentrations were between 10 and 60 mM
 - the optimal concentration of SDS was 30 mM.
- different concentrations (20–60 mM) of tricine were tested
 - the best results were obtained with 50mM tricine
- the effect of organic modifier in BGE
 - the content of methanol in the range 0-30 % (v/v) was tested
 - the optimum was found to be 15% (v/v) of methanol
- effect of α- and β-cyclodextrin was studied, no improvement was attained
 - non of cyclodextrins was used for the further optimization
- the optimum buffer composition for the separation was:
 - 50mM tricine buffer (pH* 8.3) with the addition of 30mM SDS and 15 % (v/v) of methanol
- The electrophoregram of standard mixture in optimal system is shown in Figure 2.

Method Validation

- calibration parameters presented in Table 1 were calculated with IS (diclofenac)
- the evaluation of the LOD and LOQ as a criterion of the method sensitivity was based on the signal-to-noise ratio (S/N) (according to the ICH guideline [1])
- the recovery has been checked by the standard addition technique
 - six real samples spiked with a known amount of analyte and six replicates of original non-spiked samples were analyzed

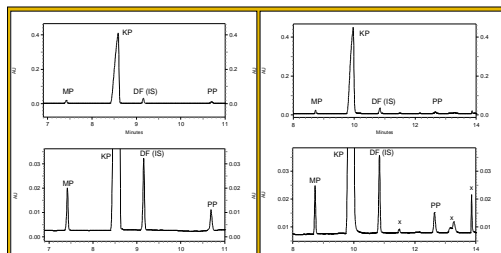


Figure 2 Electrophoregram of standard mixture of MP, KP and PP. MP – methylparaben (20 µg mL⁻¹), KP – ketoprofen (1000 µg mL⁻¹), DF – diclofenac (30 µg mL⁻¹), PP – propylparaben (10 µg mL⁻¹)

Figure 3 Electrophoregram of the pharmaceutical preparation Ketoprofen gel 2.5 %; MP – methylparaben, KP – ketoprofen, DF – diclofenac, PP – propylparaben, x – compounds of essential oil

Table 1 Analytical and validation parameters of the MEKC method; * n=6

	Methylparaben	Ketoprofen	Propylparaben
SST-parameters			
Number of theoretical plates	48971	8772	49064
Peak asymmetry	0.90	0.62	0.86
Resolution	MP–KP: 4.84	KP–DF: 2.28	DF–PP: 9.89
Repeatability – migration time ^a (RSD, %)	0.73	0.52	0.72
Repeatability – peak area ^a (RSD, %)	0.76	0.77	2.15
Validation data			
Linearity – slope; SD of the slope	0.2712 ± 0.0022	0.3087 ± 0.0140	0.3299 ± 0.0202
Linearity – intercept; SD of the intercept	0.0032 ± 0.0053	3.2690 ± 1.7285	0.0115 ± 0.0251
Linearity – correlation coefficient	0.9999	0.9969	0.9944
Linearity – Residual standard deviation	0.0064	2.0824	0.0302
Accuracy (% recovery)	103.86	96.56	102.35
Selectivity	No interference		
LOD (µg mL ⁻¹)	0.38	0.82	0.53
LOQ (µg mL ⁻¹)	1.28	1.78	2.74

DETERMINATION OF KP, MP AND PP IN THE FORMULATION KETOPROFEN GEL 2.5 % HBF

- the developed method was used for the determination of the three analytes in the pharmaceutical preparation.
- the quantitative results were in good agreement with their nominal content.
- the other constituents (e.g aromatic oil) of the gel did not interfere in the determination of the KP, MP and PP
- degradation products of the preservatives were not found.
- the electrophoregram of the real sample is shown in Figure 3

CONCLUSION

- the proposed MEKC method permits the quality control of pharmaceutical preparations containing KP, MP and PP in a single run
- the total analysis time was <13 min
- the method has been validated and the results obtained are precise and accurate
- the developed method was successfully applied to the qualitative analysis of active substances in Ketoprofen gel 2.5%
 - the results have been statistically compared with the HPLC method used in the Control Laboratory of Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic
 - Student's t-test was used and T-values indicated the absence of systematic errors at 95% confidence level.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3, by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education and by the Grant Agency of Charles University 107707/B/2007/FaF. Finally we would like to thank Zentiva (Prague, Czech Republic) for financial support.

REFERENCES

- International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Q2(R1). Fed. Reg. 60 (1995) 11260

Assay of Selected Antioxidants in Plant Extracts by On-line Coupling of Capillary Electrophoresis and Capillary Zone Electrophoresis

Pospíšilová Marie¹, Šafra Jiří¹, Honegr Jan¹, Spilková Jiřina²

¹Department of Analytical Chemistry, ²Department of Pharmacognosy, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Czech Republic

Purpose. To develop and validate capillary zone electrophoresis (CZE) with isotachophoretic (ITP) sample pre-treatment for selective assay of phenolic acids and flavonoids in methanolic plant extracts.

Methods. This ITP-CZE method utilized on-line column coupling configuration. The background electrolyte used in the CZE step was different from the leading and terminating ITP electrolytes but all electrolytes contained 20 % (v/v) of methanol. The optimal leading electrolyte was 10 mM HCl of pH* \approx 7.2 (adjusted with Tris) and the terminating electrolyte was 50 mM H₃BO₃ of pH* \approx 8.2 (adjusted with barium hydroxide). The optimum composition of the background electrolyte in the CZE step was 50 mM Tris buffer of pH* \approx 8.1 containing 25 mM β -hydroxy-4-morpholinopropanesulfonic acid as a co-ion and 40 mM H₃BO₃ as complex-forming agent. Active constituents were extracted from 1.0 g of pulverized plant material into methanol by sonication for 30 min and the supernatant was injected directly to the electrophoretic system after appropriate dilution with water.

Results. The ITP-CZE exhibited satisfactory linearity in the range 0.5-5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the individual analytes (correlation coefficients were from 0.9842 to 0.9988); apigenin was used as the internal standard. The preconcentrating and cleaning effect of the ITP step allowed injection of relatively large sample volumes (30 μl). The limits of detection ranged between 18-35 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (caffeic acid-quercitrin). The ITP-CZE method was employed for the assay of phenolic acids and quercitrin in real plant extracts. Acceptable repeatability for peak area with the RSD values 0.8 0-5.97 % (n=3) was observed when determining caffeic acid (0.17 %) and quercitrin (0.13 %). The total time of the analysis including the pre-separation step was \approx 35 min.

Conclusions. The proposed hyphenation ITP-CZE technique with UV detection at 320 nm is suitable for determining of the content of five phenolic acids (rosmarinic, p-coumaric, ferulic, caffeic and chlorogenic acids) and flavonoid quercitrin in methanolic extracts of *Mellisa officinalis* leaves.

Acknowledgement. The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

ASSAY OF SELECTED ANTIOXIDANTS IN PLANT EXTRACTS BY ON-LINE COUPLING OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

POSPÍŠILOVÁ MARIE¹, ŠAFRA JÍŘÍ¹, HONEGR JAN¹, SPILKOVÁ JÍŘINA²

¹ DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, ² DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY, CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ, CZECH REPUBLIC

OBJECTIVES

To device, optimise and validate a capillary isotachopheretic-capillary zone electrophoretic method (ITP-CZE) in the column coupling instrumentation for selective assay of selected constituents in methanolic extracts of *Melissae herba* (rosmarinic, p-coumaric, ferulic, caffeic and chlorogenic acids and flavonoid quercitrin).

COMPOUNDS UNDER STUDY

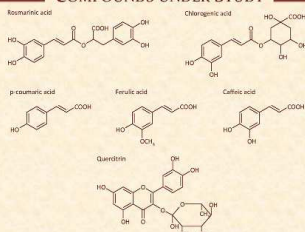


Fig.1 Structure of the investigated compounds. Two enantiomers of rosmarinic acid might occur. The total concentration of rosmarinic acid was determined at this work.

INSTRUMENTATION

- EA 100 Villa Labeco CS Isotachopheretic Analyzer (Spilská Nová Ves, Slovakia) equipped with a column-switching system and ITP Win Pro 32 software (KasComp, Slovakia)
- Pre-separation (90 mm x 0.8 mm I.D.) and analytical (160 mm x 0.3 mm I.D.) capillaries made from fluorinated ethylene-propylene (FEP) copolymer
- The pre-separation capillary equipped with a conductivity detector and the analytical capillary with an external LCD 2083 spectrophotometric detector (ECOM, Prague, Czech Republic) operated at 270 nm
- Samples injected with a sampling valve (30 µL)

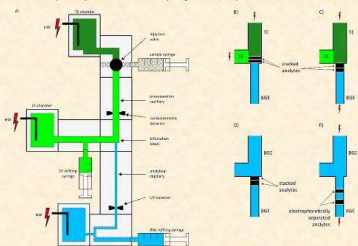


Fig. 2 (A) The scheme of apparatus for ITP-CZE; (B) the end of ITP step; analytes are stacked into the narrow zones at the bifurcation point; (C) analytes are transferred electrophoretically into the analytical capillary; (D) the pre-separation capillary is flushed hydrodynamically with BGE; (E) analytes are separated in the CZE mode.

METHODOLOGY

- Selection of BGS-S-BGS type, where leading electrolyte (LE), terminating electrolyte (TE) and background electrolyte (BGE) are mutually different; S=sample
- Testing of optimal system of operational electrolytes (LE and TE) in capillary isotachopheretic step (ITP)
- Testing of qualitative different buffers (BGE) in capillary zone electrophoretic step (CZE)
- Testing of exact timing of the transfer of isotachopheretically stacked analyte zones into CZE capillary for the control of the residual amount of the LE and TE electrolytes entering the CZE capillary together with the analytes
- Optimization of operating conditions (effect of pH*, boric acid, cyclodextrins, separation and detection currents)
- Finding out fundamentals qualitative electrophoretic characteristics for the compounds analysed
- Investigation of selected validation parameters of ITP-CZE method
- Devising single procedure for plant material pretreatment before the ITP-CZE measurements
- Application of ITP-CZE method for the determination of five phenolic acids and flavonoid quercitrin in methanolic extracts of pharmaceutically important plant drug

ELECTROLYTE SOLUTIONS

ITP step:

LE: 30 mM HCl of pH* = 7.2 adjusted with Tris; 0.2% HEC
TE: 50 mM H₂BO₃ of pH* = 8.2 adjusted with barium hydroxide

CZE step:

BGE: 50 mM Tris buffer of pH* = 8.1 containing 25 mM MOPSO as a co-ion and 40 mM H₃BO₃ as complex-forming agent

PREPARATION OF PLANT EXTRACT

Dried pulverized *Melissae herba* (1.0 g) was weighed into a 100-mL volumetric flask. 50.00 mL methanol was added and the mixture was sonicated for 30 min. The resulting suspension was filtered through dry paper filter and the supernatant was diluted with water to contain 20% (v/v) methanol before the ITP-CZE analysis

RESULTS

Table 1 Time and current regime of the analysis

Mode	Step	Current	Duration	Capillary
ITP	1	200 µA	until the voltage = 3kV was reached	Pre-separation
	2	100 µA	280-300 s from the step of CO ₂ ²⁻	
Current switching				
Transmigration	3	50 µA	220 s	pre-separation → analytical
Replacement of electrolytes				
CZE	4	50 µA	80 s	Analytical
	5	20 µA	to the end of	

Table 2 Calibration data for the analytes

Analyte	Calibration curve	S _k	S _c	R
Caffeic acid	y=0.4934x+0.1091	0.017	0.056	0.9988
Rosmarinic acid	y=0.3205x+0.0341	0.017	0.059	0.9971
p-Coumaric acid	y=0.2931x+0.0942	0.024	0.079	0.9935
Chlorogenic acid	y=0.2617x+0.0468	0.033	0.110	0.9842
Ferulic acid	y=0.4488x+0.0733	0.021	0.068	0.9979
Quercitrin	y=0.2325x+0.1231	0.016	0.053	0.9952

y, peak area ratio (analyte/internal standard); x, concentration in mg mL⁻¹; S_k, standard deviation of the slope of calibration curves; S_c, standard deviation of the intercept of the calibration curve; R, correlation coefficient.

Table 3 Determination of phenolic acids in *Melissae herba*

Compound	Compound content (mg g ⁻¹ pulverized drug ± RSD [%], n=3)
Caffeic acid	1.65 ± 0.80
Rosmarinic acid	43.54 ± 1.73
p-coumaric acid	1.00 ± 1.04
chlorogenic acid	0.30 ± 4.65
Ferulic acid	3.70 ± 2.17
Quercitrin	1.25 ± 2.97

CONCLUSIONS

- The proposed hyphenated ITP-CZE technique with UV detection at 320 nm is suitable for determining of the content of five phenolic acids (rosmarinic, p-coumaric, ferulic, caffeic and chlorogenic acids) and flavonoid quercitrin in methanolic extracts of *Melissa officinalis*
- The preconcentrating and cleaning effect of the ITP step allowed injection of relatively large sample volumes (30 µL). The limits of detection ranged between 18-35 ng mL⁻¹ (caffeic acid-quercitrin).
- Acceptable repeatability for peak area with the RSD values from 0.8 to 4.65% (n=3) when determining caffeic acid (1.7 mg g⁻¹ dry mass) and chlorogenic acid (0.3 mg g⁻¹ dry weight).
- The analytes migrated in order: caffeic acid (the fastest migration), rosmarinic, p-coumaric, chlorogenic, ferulic acid, quercitrin and apigenin (I.S.). p-Coumaric and chlorogenic acid were not fully resolved
- The total time of the analysis including the pre-separation step was = 35 min

ELECTROPHEROGRAMS

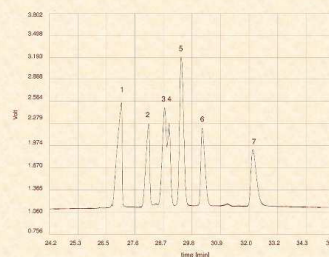


Fig. 3 Electropherogram of the standard mixture: 1 = caffeic acid, 2 = rosmarinic acid, 3 = p-coumaric acid, 4 = chlorogenic acid, 5 = ferulic acid, 6 = quercitrin, 7 = apigenin (I.S.; c = 2.5mg mL⁻¹); BGE consisted of 25mM MOPSO, 50mM Tris, 40mM H₃BO₃, 0.2% HEC, 20% (v/v) of methanol, pH* 8.1.

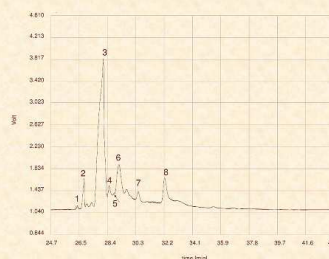


Fig. 4 Electropherogram of the plant extract: 1 = protocatechuic acid, 2 = caffeic acid, 3 = rosmarinic acid, 4 = p-coumaric acid, 5 = chlorogenic acid, 6 = ferulic acid, 7 = quercitrin, 8 = apigenin (I.S.; c = 2.5mg mL⁻¹); for conditions see Fig. 3.

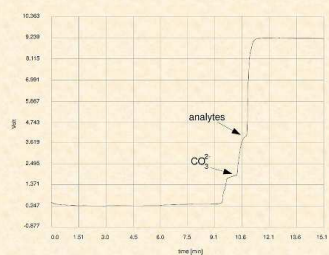


Fig 5 Isotachopherogram of the plant extract; analytes were not separated in this step. Boric acid solution of pH* 8.1 (adj. with barium hydroxide) was used as TE. The LE was hydrochloric acid with Tris and 0.2% HEC at pH* 7.2. Either LE or TE contained 20% (v/v) of methanol.

ACKNOWLEDGEMENT

The work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, No. NR/8964-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

6. Závěr

Předložená práce se zabývá využitím kapilárních elektroforetických metod pro analýzu farmaceuticky významných látek přírodního a syntetického původu.

V teoretické části jsou popsány principy základních technik (CZE, MEKC, ITP a další) i pokročilejších technik používaných pro zvýšení citlivosti (stacking, sweeping, ITP-CZE, tITP).

Úvodní část experimentální práce se zabývala vývojem metod používaných v kapilární zónové elektroforéze ke zvýšení citlivosti, jako je ITP-CZE a LVSS s přepínáním polarity:

1. Problematika separace fenolických kyselin odvozených od kyseliny benzoové a skořicové ve složité přírodní matrici (methanolický extrakt z vrbovkové natě) byla řešena metodou on-line kombinace ITP-CZE v dvoukolonovém uspořádání. Použitý typ uspořádání elektrolytů je označován jako BGE-S-BGE. Vedoucí elektrolyt obsahoval 0,01M HCl, 0,02 M imidazol, 0,2% HEC, *pH* 7,2. Koncový elektrolyt byl složen z 0,01 M HEPES, *pH* 8,2. Jako základní elektrolyt byl použit 25 mM MES, 50 mM TRIS, 30 mM kyselina boritá, 10mM α -cyklodextrin, 0,2% HEC, *pH* 8,3. Celková doba analýzy byla přibližně 25 minut. Vzorek nevyžadoval žádnou speciální úpravu.
2. „Stacking“ CZE metoda (zakoncentrování z velkého objemu vzorku s přepnutím polarity) byla aplikována na směs fenolických kyselin obsažených v methanolickém extraktu z vrbovky. Optimální základní elektrolyt obsahoval 50 mM borát, 2% α -cyklodextrin, *pH* 9,0. Dávkovaný objem zředěného vzorku představoval asi 70 % celkového objemu kapiláry a reverzní polarita byla přepnutá po 1,8 min. Bylo dosaženo 40-násobného zvýšení citlivosti CZE metody.
3. Pomocí ITP-CZE byla provedena separace fenolických kyselin odvozených od kyseliny skořicové a flavonoidu kvercitrinu v extraktu z meduňky lékařské. Opět bylo použito elektrolytové uspořádání BGE-S-BGE. Složení jednotlivých elektrolytů bylo: LE – 0,01M HCl, 0,2% HEC, *pH** 7,2 (upraveno pomocí TRIS); TE – 50mM kyselina boritá, *pH** 8,2; BGE – 25mM MOPSO, 50mM

TRIS, 40mM kyselina boritá, 0,2% HEC, pH* 8,1. Analýza trvala přibližně 35 minut.

Další část výzkumné práce byla věnována využití kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie ve farmaceutické analýze:

4. Polyoly sorbitol a mannitol, které jsou součástí infuzních roztoků, byly analyzovány pomocí CZE s využitím jejich komplexace s B(III). Separace probíhala v 50 mM tetraboritanu sodném s přidavkem 10 mM kyseliny *m*-nitrobenzoové pro nepřímou UV detekci. *pH* základního elektrolytu bylo upravené triethylaminem na hodnotu 9,3. Celková doba analýzy byla přibližně 13 minut.
5. Nesteroidní antiflogistikum ketoprofen a dvě konzervační látky (methylparaben a propylparaben) byly analyzovány pomocí MEKC v topickém přípravku Ketoprofen gel 2,5 %. Separace probíhala v základním elektrolytu se složením: 50mM tricin, 30mM SDS, 5mM β -cyklodextrin, 15 % (v/v) methanol. pH* bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 8,3. Celková doba analýzy byla přibližně 12 minut.

U všech vypracovaných metod byly vyvinuty původní elektrolytové systémy a předložené metody byly validovány v souladu s požadavky farmaceutických autorit.

7. Summary

The thesis deals with the use of electrophoretic methods in the analysis of pharmaceutically important compounds.

In the theoretical part, the principles of basic techniques (like CZE, MEKC, ITP etc.) as well as on-line preconcentration methods (stacking, sweeping, ITP-CZE, tITP) are described.

The first part of the experimental work deals with the use of on-line sample preconcentration techniques (ITP-CZE and LVSS with polarity switching) for the analysis of the complex matrices of plant origin.

1. The on-line ITP-CZE was used for the separation and quantification of phenolic acids derived from benzoic and cinnamic acids in methanolic extract of *Epilobium parviflorum*. BGE-S-BGE electrolyte system was used for the separation. The leading electrolyte in the ITP pre-separation step was 0.01M HCl, 0.02M imidazol, 0.2% HEC with pH 7.2; the terminating electrolyte was 0.01M HEPES with pH 8.2. The background electrolyte in the electrophoretic step contained 25mM MES, 50mM TRIS, 30mM boric acid, 10mM α -cyclodextrine, 0.2% HEC of pH 8.3. A single analysis took 25 min. No special sample pretreatment was required.
2. The next work focused on the application of a stacking-CZE method used for the separation and determination of eight phenolic acids in an extract of *Epilobium parviflorum*. Large-volume sample stacking technique with polarity switching mode was optimized. The optimal electrolyte system consisted of 50mM boric acid and 2% of α -cyclodextrine of pH 9.0. Injected sample volume represented 70 % of the capillary volume and the reverse polarity switching time was 1.8 minutes. A 40-fold sensitivity enhancement was attained.
3. The on-line ITP-CZE was used for the separation and quantification of phenolic acids and flavonoid quercitrin in *Melissa officinalis*. BGE-S-BGE system was used for the separation. The leading electrolyte in the ITP pre-separation step was 0.01M HCl, 0.02M TRIS, 0.2% HEC of pH* 7.2; the terminating electrolyte was 50mM boric acid of pH* 8.2. The background electrolyte in the

electrophoretic step contained 25mM MOPSO, 50mM TRIS, 40mM boric acid, 0.2% HEC of pH* 8.1. A single analysis took 35 min.

The second part of the scientific work deal with the use of CZE and MEKC in routine pharmaceutical analysis.

4. Capillary zone electrophoresis with indirect UV detection at 215 nm was applied for the separation and determination of mannitol and sorbitol in the form of anionic borate–polyol complexes. The background electrolyte consisted of 50mM borate (pH 9.3, adjusted with triethylamine) containing 10mM 3-nitrobenzoate as the chromogenic co-ion. The separation took about 13 min.
5. Non-steroidal anti-inflammatory drug ketoprofen and preservatives (methylparaben and propylparaben) in a pharmaceutical preparation were analysed by MEKC. The optimum background electrolyte was 50mM tricin, 40mM SDS and 5mM β -cyclodextrine of pH* 8.3. The content of methanol in BGE was 15 % (v/v). Single analysis took less than 12 minutes.

8. Seznam použitých zkratek

ACES	N-(acetamido)-2-aminoethan sulfonová kyselina
BES	N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonová kyselina
BGE	základní elektrolyt
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	diode array detector
EKC	elektrokinetická chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
FASI	Zakoncentrování s využitím elektrokinetického dávkování
FASS	Zakoncentrování vzorku zesílením pole
HEC	2-hydroxyethylcelulóza
HEPES	1-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
IEF	izoelektrická fokusace
ICH	International Conference on Harmonisation
ITP	izotachoforéza
LVSS	Zakoncentrování vzorku z velkého objemu
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MES	2-morpholinoethansulfonová kyselina
MOPSO	3-(N-morfolino)-2-hydroxypropansulfonová kyselina

NACE	nevodná kapilární elektroforéza
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAID	nesteroidní protizánětlivá látka
RSD	relativní směrodatná odchylka
TAPS	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonová kyselina
tITP	přechodná izotachoforéza
TRICIN	N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
TRIS	1,1,1-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

9. Rejstřík

—A—

aditivum, 23, 24, 25, 27

—B—

bod

izoelektrický, 32

Bubble-cell, 16, 35

—Č—

číslo

agregační, 26

—D—

dávkování

elektrokinetické, 15, 39

hydrodynamické, 14, 15, 20, 36

délka

celková, 13, 20

efektivní, 13, 20

detekce

elektrochemická, 17

nepřímá, 16, 17, 65

spektrofotometrická, 13

difúze, 23, 25, 30, 32, 33

dimethylsulfoxid, 21

disperze, 32

elektromigrační, 23, 24, 35

dodecylsírán sodný, 27, 29, 68, 150, 153

dvojrstva

elektrická, 20, 21

—E—

efekt

diuretický, 64

samozaostřující, 30

sifonový, 15

elektroforeogram, 16, 24, 69

elektroforetické mobility, 18, 22

elektroforéza

kapilární

gelová, 33

nevodná, 34

kapilární zónová, 7, 10, 22, 23, 25, 26,

31, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,

51, 55, 56, 57, 58, 59, 63, 64, 66, 71,

72, 149, 150, 152, 155

elektrolyt

koncový, 30

vedoucí, 30

základní, 22, 24, 25, 33, 36, 37, 38, 39,

41, 42, 43, 44, 45, 52, 53, 54, 56, 60,

61, 62, 65, 68, 149, 152, 153, 155

—F—

fáze

micelární, 28

mobilní, 26, 32, 33
 pseudostacionární, 25, 26, 46
 polymerní, 28
 stacionární, 32, 33
 fokusace
 izoelektrická, 32, 155
 funkce
 regulační, 31
 —G—
 gel
 fyzikální, 33
 chemický, 33
 gradient
 pH, 32
 teplotní, 24
 —Ch—
 chromatografie
 elektrokinetická, 25
 micelární elektrokinetická, 10, 22,
 26, 27, 28, 35, 46, 68, 72, 149, 150,
 152, 153, 155
 mikroemulzní elektrokinetická, 26,
 29, 30, 155
 —I—
 inlet, 13, 39
 intenzita
 elektrického pole, 17, 23, 30, 31, 36,
 37, 38
 izotachoforegram, 31
 izotachoforéza, 7, 10, 22, 30, 31, 35, 39,
 40, 41, 42, 43, 44, 51, 53, 54, 59, 60,
 61, 63, 66, 71, 72, 149, 152, 155, 156
 přechodná, 43
 —K—
 kapilární elektrochromatografie, 32,
 155
 kartridge, 13
 koncentrace
 kritická micelární, 25, 26, 27, 155
 konstanta
 dielektrická, 34
 dielektrická, 21
 kyselina
 cholová, 27
 —L—
 limit
 detekční, 54, 56, 58, 62, 65, 66, 69
 —M—
 marker
 elektroosmotický, 28
 micela, 26, 27, 28, 29, 46
 anionická, 27

- polymerní, 29
- mobilita
- efektivní, 19
 - elektroforetická, 18, 19
 - elektroosmotická, 28
 - elektroosmotické toku, 22
 - zdánlivá, 22
- O—
- okno
- detekční, 13, 14
 - eluční, 26, 27, 28
- opakovatelnost, 55, 56, 58, 61, 62, 65, 69
- P—
- permitivita
- relativní, 34
- pohyblivost
- efektivní, 16, 18, 19, 30, 53, 61
 - elektroforetická, 19, 22, 33, 64
 - iontová, 18
 - skutečná, 18
- polarita
- reverzní, 26, 37, 38
- potenciál
- zeta, 21
- prekoncentrace, 35, 36, 46
- pufř
- mikroemulzní, 29
- S—
- síla
- elektrostatická, 18
 - frikční, 18
 - iontová, 18, 19, 21, 22, 37, 39
- síto
- molekulární, 33
- sorpce, 23, 24
- stacking, 8, 10, 35, 36, 37, 56, 57, 58, 72, 149, 152
- standard
- vnitřní, 62, 68
- stěna
- kapilární, 24
- stupeň
- disociační, 19
- surfaktant, 26, 27, 29, 46, 68
- amfoterní, 27
 - anionický, 27
 - kationický, 26
 - neionogenní, 27
- sweeping, 8, 35, 46, 149, 152

—T—

teplo

Jouleovo, 24

tok

elektroosmotický, 14, 20, 21, 22, 23,
25, 26, 27, 32, 33, 34, 38, 39, 45, 46,
155

hydrodynamický, 19

—V—

viskozita, 18, 21, 33, 34

dynamická, 35

vodivost, 36, 39, 46

vrstva

Gouy-Chapmanova, 20

Sternova, 20

—Z—

zákon

Ohmův, 31

zakoncentrování

s elektrokinetickým dávkováním,
38, 39, 155

z velkého objemu, 37, 38, 39, 55, 56,
59, 149, 152, 155

zesílením pole, 36, 155

Z-cell, 16, 35

10. Použitá literatura

- [1] The United States Pharmacopoeia 29/NF 23, US Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, 2005.
- [2] European Pharmacopoeia, 5th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2005.
- [3] D.N. Heiger, High performance capillary electrophoresis: An introduction. Hewlett Packard Co, Paris, 1992.
- [4] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis (Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 45). Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [5] R. Weinberger, Practical Capillary Electrophoresis. Academic Press, Boston, 2000.
- [6] M.L. Marina, M. Torre, Talanta 41 (1994) 1411-1433.
- [7] M.G. Khaledi, High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications. Wiley Press, New York, 1998.
- [8] F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Boček, J. Chromatogr. A 470 (1989) 299-308.
- [9] C. Johns, M. Macka, P. Haddad, Electrophoresis 24 (2003) 2150-2167.
- [10] P. Doble, P.R. Haddad, J. Chromatogr. A 834 (1999) 189-212.
- [11] M. Macka, C. Johns, P. Doble, P.R. Haddad, K.D. Altria, LC-GC North America 19 (2001) 38-47.
- [12] A. Jouyban, E. Kenndler, Electrophoresis 27 (2006) 992-1005.
- [13] V. Dolník, Úvod do kapilární elektroforézy. Ústav analytické chemie AV ČR a společnost Chromspec s.r.o., Brno, 1994.
- [14] J. Káš, M. Kodíček, O. Valentová, Laboratorní techniky biochemie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2005.
- [15] R. Majer, Analytická chémia. Osveta, Martin, 1989.
- [16] S. Lunte, D. Radzik, Pharmaceutical & Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis. Pergamon, Elsevier Science Ltd, Oxford, 1996.

- [17] DAX-3D PrinCE-C User Manual , Prince Technologies, Prince Technologies, Emmen, The Netherlands, 2003
- [18] P/ACE(TM) MDQ - Installation & Maintenance Guide, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Fullerton, USA, 2000
- [19] D. Crosby, Z. El Rassi, J. Liq. Chromatogr. 16 (1993) 2161-2168.
- [20] C.J. Sciacchitano, B. Mopper, J.J. Specchio, J. Chromatogr. B 657 (1994) 395-399.
- [21] D.E. Burton, M.J. Sepaniak, M.P. Maskarinec, J. Chromatogr. Sci. 25 (1987) 514-518.
- [22] P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelsen, R.N. Zare, Anal. Chem. 59 (1987) 44-49.
- [23] N. Matsubara, K. Koezuka, S. Terabe, Electrophoresis 16 (1995) 580-583.
- [24] C.P. Palmer, S. Terabe, J. Microcol. Sep. 8 (1996) 115-121.
- [25] N. Tanaka, T. Fukutome, K. Hosoya, K. Kimata, T. Araki, J. Chromatogr. A 716 (1995) 57-67.
- [26] H. Ozaki, S. Terabe, A. Ichihara, J. Chromatogr. A 680 (1994) 117-123.
- [27] P. Mahuzier, M. Prado, B. Clark, E. Kedor-Hackmann, K. Altria, LC-GC Europe 16 (2003) 22-24.
- [28] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 892 (2000) 171-186.
- [29] M. Broderick, S. Donegan, J. Power, K. Altria, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 877-884.
- [30] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 844 (1999) 371-386.
- [31] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 856 (1999) 443-463.
- [32] V. Kašička, Chem. Listy 91 (1997) 320-329.
- [33] K.D. Bartle, P. Myers, J. Chromatogr. A 916 (2001) 3-23.
- [34] L. Geiser, J. Veuthey, Electrophoresis 28 (2007) 45-57.
- [35] R.L. Chien, D.S. Burghi, Anal. Chem. 64 (1992) 1046-1050.

- [36] Z. Malá, L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 28 (2007) 243-253.
- [37] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466-485.
- [38] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.
- [39] L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 35-48.
- [40] D. Kanianský, J. Marák, J. Láštinec, J. Reijenga, F. Onuska, *J. Microcol. Separ.* 11 (1999) 141-153.
- [41] L. Křivánková, P. Boček, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 13-34.
- [42] L. Křivánková, P. Gebauer, W. Thormann, R. Mosher, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 638 (1993) 119-135.
- [43] J. Kim, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1625-1643.
- [44] J.P. Quirino, S. Terabe, *Chromatographia* 53 (2001) 285-289.
- [45] A. Escarpa, M.C. González, A.G. Crevillén, A.J. Blasco, *Electrophoresis* 28 (2007) 1002-1011.
- [46] D. Kanianský, M. Masár, R. Bodor, M. Žúborová, E. Olvecká, M. Johnck, B. Stanislawski, *Electrophoresis* 24 (2003) 2208-2227.
- [47] J. Grym, F. Foret, *Chem. Listy* 99 (2005) 915-921.
- [48] J. Spilková, M. Johánková, J. Dušek, *Česká a Slov. farm.* 44 (1995) 196-200.
- [49] I. Slacanin, A. Marston, K. Hostettmann, N. Delabays, C. Darbellay, *J. Chromatogr. A* 557 (1991) 391-398.
- [50] A. Hiermann, B. Radl, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 311-314.
- [51] SciFinder Scholar, Ed. Chemical Abstracts Service, American Chemical Society, Ohio, USA, 2004
- [52] M. Urbánek, L. Blechtová, M. Pospíšilová, M. Polášek, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 261-271.
- [53] M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, *Electrophoresis* 23 (2002) 1045-1052.

- [54] R. Hamoudová, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 281-287.
- [55] International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Q2(R1). Fed. Reg. 60 (1995) 11260
- [56] J. Šafra, M. Pospíšilová, A. Kavalírová, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1022-1024.
- [57] D. Štěrbová, J. Vlček, V. Kubáň, J. Sep. Sci. 29 (2006) 308-313.
- [58] J. Hernandez-Borges, T. Borges-Miquel, G. Gonzalez-Hernandez, M.A. Rodriguez-Delgado, Chromatographia 62 (2005) 271-276.
- [59] J. Hernandez-Borges, G. Gonzalez-Hernandez, T. Borges-Miquel, M.A. Rodriguez-Delgado, Food Chem. 91 (2005) 105-111.
- [60] Y. Iinuma, H. Herrmann, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 105-115.
- [61] J. Vlček, B. Klejdus, V. Kubáň, Chem. Listy 96 (2002) 39-44.
- [62] J. Jen, Y. Hsu, M. Lee, J. Chromatogr. A 734 (1996) 375-380.
- [63] G. Zgorka, K. Glowniak, J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 79-87.
- [64] W. Ding, C. Liu, J. Chromatogr. A 929 (2001) 143-150.
- [65] J. Šafra, M. Pospíšilová, J. Spilková, Chromatographia 64 (2006) 37-43.
- [66] B. Simonovska, I. Vovk, S. Andresek, K. Valentová, J. Ulrichová, J. Chromatogr. A 1016 (2003) 89-98.
- [67] A. Allahverdiyev, N. Duran, M. Ozguven, S. Koltas, Phytomedicine 11 (2004) 657-661.
- [68] J. Bruneton, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Intercept Lavoisier, Andover, 1999.
- [69] P. Morin, F. Villard, M. Dreux, J. Chromatogr. A 628 (1993) 153-160.
- [70] A. Caniová, E. Brandšteterová, J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 24 (2001) 2674-2659.

- [71] A. Žiaková, E. Brandšteterová, E. Bláhová, J. Chromatogr. A 983 (2003) 271-275.
- [72] A.P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, J.L. Lamaison, Pharm. Acta Helv. 72 (1998) 301-305.
- [73] G. Zgórka, K. Glowniak, J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 79-87.
- [74] S. Herodež, M. Hadolin, M. Škerget, Ž. Knez, Food Chem. 80 (2003) 275-282.
- [75] Mikro-verze Automatizovaného informačního systému léčivých přípravků (AISLP) 2004.1 pro MS Windows
- [76] Český lékopis 2005, Grada Publishing a.s., Praha, 2005.
- [77] M. Pospíšilová, M. Polášek, V. Jokl, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 387-392.
- [78] T. Soga, G.A. Ross, J. Chromatogr. A 837 (1999) 231-239.
- [79] D. Lincová, H. Farhgalí, Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Prague, 2002.
- [80] S. Ho Kang, H. Kim, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1359-1364.
- [81] M.D. Kreuz, A.L. Howard, D. Ip, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 725-735.
- [82] J. Dvořák, R. Hájková, L. Matysová, L. Nováková, M. Koupparis, P. Solich, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 625-629.
- [83] 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