

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

TESTOVÁNÍ POTENCIÁLNÍHO VYUŽITÍ CHIRÁLNÍCH IONTOVÝCH KAPALIN
S DLOUHÝM ŘETĚZCEM PRO CHIRÁLNÍ SEPARACE V KAPILÁRNÍ
ELEKTROFORÉZE II

Školitel diplomové práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Kateřina Müllerová

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

V Hradci Králové dne 13. května 2021

Kateřina Müllerová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych velmi poděkovat zejména svému školiteli panu PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za všechnen čas, který mi věnoval, za pomoc při měření a za obrovskou trpělivost při sepisování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Miroslavu Poláškovvi, CSc. za konzultaci. Poděkování patří také všem mým blízkým, kteří mě celé studium podporovali.

ABSTRAKT

Katedra: Katedra analytické chemie

Kandidát: Kateřina Müllerová

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D

Název diplomové práce: Testování potenciálního využití chirálních iontových kapalin s dlouhým řetězcem pro chirální separace v kapilární elektroforéze II

Chirální iontová kapalina (–)-N-dodecyl-N-methylephedrinium bromid (DMEB) byla testována jako selektor pro chirální separace vybraných léčiv (chinolonová antibiotika, ketoprofen a flurbiprofen) pomocí kapilární elektroforézy (CE). Byl zkoumán vliv několika parametrů na enantioseparaci: (i) typ a pH pufru, (ii) typ a množství organického modifikátoru a (iii) koncentrace DMEB. Při použití tohoto chirálního selektoru byla pozorována enantioseparace pouze u ofloxacinu, u zbylých chirálních léčiv separace za daných podmínek neproběhla.

Jako další krok byla vyvinuta CE metoda pro stanovení levofloxacinu, aby bylo možné předvést potenciál DMEB jako chirálního selektoru v kontrole kvality chirálně čistých léčiv. Nejlepší separace bylo dosaženo se základním elektrolytem o složení: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 se 100 mM DMEB a 20 % (v/v) acetonitrilu. Separace probíhala v křemenné kapiláře (80,5 cm / 72 cm) s vnitřním průměrem 50 μ m při –30 kV s UV detekcí při 291 nm. Rozlišení mezi píky *S*- a *R*-ofloxacinu bylo $4,22 \pm 0,02$ ($n = 3$). Linearita metody byla prokázána v rozsahu 10 až 100 μ g/ml levofloxacinu ($y = 0,0305x - 0,0107$, $R^2 = 0,9975$); s použitím gatifloxacinu (40 μ g/ml) jako vnitřního standardu. Metoda byla aplikována na analýzu tablet s obsahem 500 mg levofloxacinu. Stanovený obsah byl $100,1 \pm 4,6$ % ($n = 3$) deklarovaného množství levofloxacinu. Podruhé byla linearita ověřena ve stejném rozsahu se stejným vnitřním standardem ($y = 0,0332x - 0,087$, $R^2 = 0,9993$) a následně byla metoda aplikována na analýzu očních kapek s koncentrací 5 mg/ml levofloxacinu. Stanovený obsah byl 91,56 % ($n = 2$) deklarovaného množství levofloxacinu.

ABSTRACT

Department: Department of Analytical Chemistry

Candidate: Kateřina Müllerová

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Testing of potential capability of chiral ionic liquids with long alkyl chain in capillary electrophoresis chiral separations II

Chiral ionic liquid (–)-N-dodecyl-N-methylephedrinium bromide (DMEB) was tested as a selector for chiral separations of selected drugs such as chiral quinolones, ketoprofen, and flurbiprofen by capillary electrophoresis (CE). The effect of several parameters on enantioseparation was examined: (i) type and pH of the separation buffer, (ii) type and amount of organic modifier, and (iii) the concentration of DMEB. When using this chiral selector, only the separation of ofloxacin enantiomers was observed, while the enantio-recognition of other chiral model analytes was not successful under the conditions tested.

As a next step, a CE method for the assay of levofloxacin was developed to demonstrate the potential of DMEB as a chiral selector in quality control of single-isomer drugs. The best separation was achieved with 20 mM tris buffer of pH 8.5 containing 100 mM DMEB and 20 % (v/v) of acetonitrile as the background electrolyte. The separation took place in 50 μ m id fused silica capillary (80.5 cm / 72 cm) at –30 kV with UV detection at 291 nm. The resolution between the peaks of ofloxacin enantiomers was 4.22 ± 0.02 (n = 3). Linearity of the method was proved for the range 10 to 100 μ g/ml of levofloxacin ($y = 0.0305x - 0.0107$, $R^2 = 0.9975$); gatifloxacin (40 μ g/ml) was employed as internal standard. The method was applied to the analysis of tablets containing 500 mg of levofloxacin. The content determined was 100.1 ± 4.6 % (n = 3) of the declared amount of levofloxacin. Later, the linearity was proved again for the same range and with the same internal standard ($y = 0.0332x - 0.087$, $R^2 = 0.9993$) and the method was applied to the analysis of eye drops containing 5 mg/ml of levofloxacin. The content determined was 91.56 % (n = 2) of the declared amount of levofloxacin.

POUŽITÉ ZKRATKY

ACN	acetonitril
BGE	základní elektrolyt
CA	korigovaná plocha
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CIL	chirální iontová kapalina
CMC	kritická micelární koncentrace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMEB	(-)- <i>N</i> -dodecyl- <i>N</i> -methylephedrinium bromid
DP	diplomová práce
EOF	elektroosmotický tok
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL	iontová kapalina
IS	vnitřní standard
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie/spektrometr
N	počet teoretických pater
NSAID	nesteroidní protizánětlivé látky
PAL	povrchově aktivní látka
pI	isoelektrický bod
pKa	ionizační konstanta
RSD	relativní směrodatná odchylka

SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
USP	Americký lékopis
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	ultrafialové a viditelné záření
ZR	zásobní roztok

Obsah

1. Úvod	11
2. Cíl a zadání práce	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Kapilární elektroforéza	13
3.1.1. Princip	13
3.1.2. Elektroosmotický tok	14
3.1.3. Kapilára.....	16
3.1.4. Detektory.....	17
3.1.5. Instrumentace	17
3.1.6. Micelární elektrokinetická chromatografie	18
3.1.7. Chirální separace.....	19
3.2. Iontové kapaliny.....	20
3.2.1. Iontové kapaliny a možnosti jejich využití v analytické chemii	20
3.2.2. Chirální iontové kapaliny	20
3.2.3. (–)- <i>N</i> -Dodecyl- <i>N</i> -methylephedrinium bromid.....	21
3.3. Chinolonová antibiotika.....	23
3.4. Nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID)	26
4. Praktická část.....	28
4.1. Použité chemikálie	28
4.1.1. Standardy	28
4.1.2. Základní chemikálie	28
4.1.3. Chirální iontová kapalina	28
4.1.4. Registrované léčivé přípravky.....	28
4.2. Přístroje a pomůcky	29
4.3. Podmínky CE analýz.....	29
4.3.1. Podmínky CZE analýz v achirálním BGE	30
4.3.2. Podmínky CE analýz pro separace s chirálním selektorem DMEB	30

4.3.3.	Podmínky CE analýz pro ověření linearity	30
4.4.	Příprava základních elektrolytů pro achirální separace.....	31
4.4.1.	Příprava 50mM fosfátového pufru o pH 2,0	31
4.4.2.	Příprava 60mM octanového pufru o pH 5,0.....	31
4.4.3.	Příprava 50mM fosfátového pufru o pH 7,5	31
4.4.4.	Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5.....	31
4.4.5.	Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % MeOH	31
4.4.6.	Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % ACN.....	31
4.5.	Příprava základních elektrolytů pro chirální separace	32
4.5.1.	Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB.....	32
4.6.	Příprava roztoků standardů	32
4.6.1.	Příprava roztoku ofloxacinu v MeOH [30]	32
4.6.2.	Příprava roztoku ofloxacinu ve 20% ACN	33
4.6.3.	Příprava roztoků chinolonových antibiotik	33
4.6.4.	Příprava roztoku ketoprofenu.....	33
4.6.5.	Příprava roztoku flurbiprofenu.....	33
4.6.6.	Příprava roztoku vnitřního standardu (IS).....	34
4.6.7.	Příprava kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 1	34
4.6.8.	Příprava kalibračních roztoků pro kalibrační křivky č. 2 a 3	34
4.7.	Příprava vzorků z registrovaných LP	34
4.7.1.	Příprava roztoku vzorku z tablet Levofloxacin Mylan 500 mg.....	34
4.7.2.	Příprava roztoku vzorku z očních kapek Oftaquix 5 mg/ml	35
4.8.	Vyhodnocení separace	35
4.8.1.	Elektroforetická pohyblivost.....	35
4.8.2.	Účinnost separace [31].....	35
4.8.3.	Rozlišení [31].....	36
4.8.4.	Korigovaná plocha	36
4.8.5.	Směrodatná odchylka.....	36

4.8.6.	Relativní směrodatná odchylka	36
5.	Výsledky a diskuse	37
5.1.	Separace za achirálních podmínek	37
5.2.	Chirální separace – screening	38
5.2.1.	Opakovatelnost	42
5.3.	Chirální separace dalších chinolonových antibiotik	43
5.4.	Vliv koncentrace DMEB na selektivitu chirální separace enantiomerů ofloxacinu..	44
5.5.	Ověření linearity	48
5.6.	Regenerace kapiláry po použití DMEB	50
5.7.	Vliv charakteru organického modifikátoru a jeho koncentrace na selektivitu	52
5.8.	Vliv prodloužení délky kapiláry	54
5.9.	Ověření linearity za optimálních podmínek a analýza léčivých přípravků s obsahem levofloxacinu	58
5.9.1.	Stanovení levofloxacinu ve vzorku tablet Levofloxacin Mylan 500 mg	61
5.9.2.	Stanovení levofloxacinu ve vzorku očních kapek Oftaquix 5 mg/ml	62
6.	Závěr	64
7.	Seznam použité literatury	65

1. Úvod

Tato diplomová práce (DP) navazuje na DP Mgr. Veroniky Mrázové [1]. Ve zmíněné práci byly použity nově syntetizované chirální iontové kapaliny (CIL) na testování jejich využití pro chirální separace pomocí kapilární elektroforézy (CE). Pomocí testovaných CIL se nepovedlo žádné enantiomery rozseparovat.

V této práci byla použita komerčně dostupná CIL (-)-*N*-dodecyl-*N*-methylephedrinium bromid (DMEB), jejíž využití v chirálních separacích bylo již dříve publikováno pro separaci atropizomerů metakvalonu [2].

Iontové kapaliny jsou soli s teplotou tání pod 100 °C. Chirální iontové kapaliny ve své struktuře obsahují alespoň jedno centrum chiralidy.

CE je separační metoda probíhající v úzkých křemenných kapilárách naplněných základním elektrolytem. Na separaci se podílí rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli a elektroosmotický tok (EOF), který je hybnou silou v CE separacích, a díky kterému je možná separace jak kationtů, tak i aniontů v rámci jedné analýzy.

Při chirálních separacích pomocí CE je použit přírůdek chirálního selektoru k základnímu elektrolytu. Chirální selektor vytváří s opticky aktivními analyty labilní diastereomerní komplexy, které při rozdílných konstantách asociace nebo při rozdílných pohyblivostech umožňují chirální separace. Nejčastěji používané chirální selektory jsou cyklodextriny. V této práci byl jako chirální selektor použit DMEB, který je příkladem CIL. Použití CIL jako chirálních selektorů není příliš běžné.

Většina nových léčivých látek je chirální, a některé se vyrábí pouze ve formě čistého izomeru; v tomto případě je druhý izomer považován za nečistotu a jeho obsah je třeba kontrolovat pomocí vhodných analytických metod. K tomuto účelu se používají separační metody vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a často i CE.

2. Cíl a zadání práce

Diplomová práce má za cíl ověřit použitelnost chirální iontové kapaliny DMEB jako chirálního selektoru pro separaci chirálních léčiv pomocí CE. Navazuje na DP Mgr. Veroniky Mrázové, která používala jako chirální selektory syntetizované iontové kapaliny [1]. V této práci je použita iontová kapalina komerční, jejíž potenciál pro chirální separaci byl již prezentován v časopise Pharmazie [2].

Dílčí cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1) Screening chirální separace na příkladu vybraných chirálních léčiv jako modelových analytů.
- 2) Testování vlivu složení BGE na výslednou enantiosektivitu: různé typy a pH pufrů, přídavek organického modifikátoru, koncentrace DMEB.
- 3) Ověření linearit separace.
- 4) Aplikace na léčivý přípravek obsahující chirálně čisté léčivo.

3. Teoretická část

3.1. Kapilární elektroforéza

3.1.1. Princip

Kapilární elektroforéza je analytická separační metoda, která využívá elektroforetické pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli. Separace probíhá v kapilárách s vnitřním průměrem v řádu desítek mikrometrů (nejčastěji 50 až 100 μm). Při separaci jsou konce kapiláry a elektrody ponořené do malých nádobek (vialek) se základním elektrolytem (BGE). Elektrické pole vzniká vložením vysokého napětí mezi elektrody, prostředí mezi elektrodami je tvořeno BGE. Regulace teploty v systému je řízena termostatem [3, 4, 5].

Základní druhy kapilárních elektromigračních technik jsou: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární izoelektrická fokusace a kapilární izotachoforéza. Metody MEKC a CEC jsou vhodné jak pro separaci iontů, tak i neutrálních molekul [3].

Výhodou CE je velmi malá spotřeba činidel a vzorku, a s tím spojené malé množství organického odpadu. Metoda má vysokou separační účinnost – počet teoretických pater N bývá větší než 10^5 . Detekce může probíhat přímo na kapiláře (tzv. on-capillary detection). Jednoduchý je také vývoj metody. Mezi nevýhody patří nižší citlivost a horší opakovatelnost, při porovnání s kapalinovou chromatografií [3, 4].

Vlivem elektrického proudu, který prochází kapilárou, dochází k zahřívání jejího vnitřního obsahu. Kapilára tak musí být pro zajištění stálých podmínek chlazená, což se provádí buď proudem vzduchu, nebo chladicí kapalinou. Generovaný elektrický proud by se měl pohybovat pod 100 μA , aby nedocházelo k přehřívání kapiláry. Typická vkládaná napětí jsou 5-30 kV. Roztok BGE je tvořen pufrům pro zachování konstantního pH v průběhu separace [3].

Principem separace je rozdílná rychlost v (m/s) pohybu analytů v elektrickém poli. Ta je závislá dle rovnice 3-1 na intenzitě elektrického pole E (V/m) a elektroforetické pohyblivosti iontu μ (m^2/Vs).

$$v = \mu E \quad (3-1)$$

Výsledný pohyb iontů závisí na působení síly elektrického pole, proti které působí třecí síla prostředí – tu definuje Stokesův zákon [4]. Elektroforetická pohyblivost konkrétního iontu je závislá dle rovnice 3-2 na jeho celkovém náboji q (C) a poloměru r (m), a zároveň na dynamické viskozitě η (kg/ms) BGE.

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3-2)$$

Z rovnice 3-2 vyplývá, že malé ionty s velkým nábojem se pohybují rychleji než velké ionty s malým nábojem. Elektroforetickou pohyblivost lze ovlivnit změnou pH BGE nebo přidáním organických modifikátorů či tenzidů [3, 4].

Pomocí migračních časů můžeme podle rovnice 3-3 spočítat zdánlivou elektroforetickou pohyblivost μ_a (cm²/Vs). Ta je závislá na efektivní délce kapiláry l (cm), migračním čase iontu t_a (s) a intenzitě elektrického pole E (V/cm). Místo E lze dosadit poměr napětí U (V) a celkové délky kapiláry L (cm).

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t_a U} \quad (3-3)$$

Pro μ_a platí zároveň i rovnice 3-4, kde μ_{EOF} (cm²/Vs) je pohyblivost elektroosmotického toku vypočtená dle rovnice 3-5, t_{EOF} (s) je migrační čas EOF [4]. Z rovnice 3-4 lze také jednoduchou úpravou vypočítat efektivní elektroforetickou pohyblivost μ_e (cm²/Vs) (rovnice 3-6).

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (3-4)$$

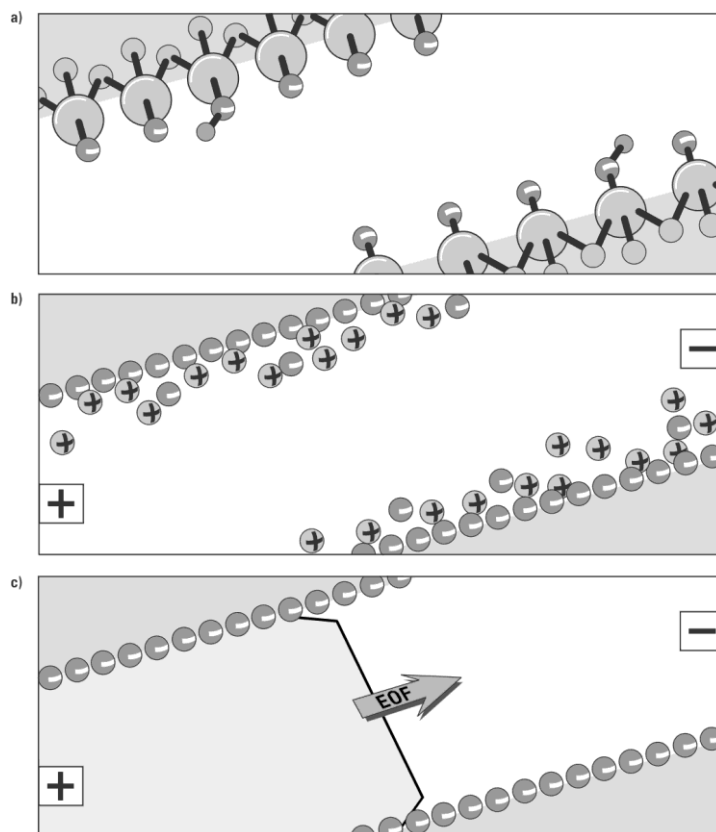
$$\mu_{EOF} = \frac{l}{t_{EOF} E} = \frac{lL}{t_{EOF} U} \quad (3-5)$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} \quad (3-6)$$

3.1.2. Elektroosmotický tok

EOF je transportní jev, který je typický pro křemenné kapiláry a který umožňuje současnou separaci aniontů i kationtů v průběhu separace v křemenných kapilárách. Vlivem EOF se směrem ke katodě pohybují i anionty, jelikož pohyblivost EOF je za vhodně zvolených podmínek větší než pohyblivost aniontů.

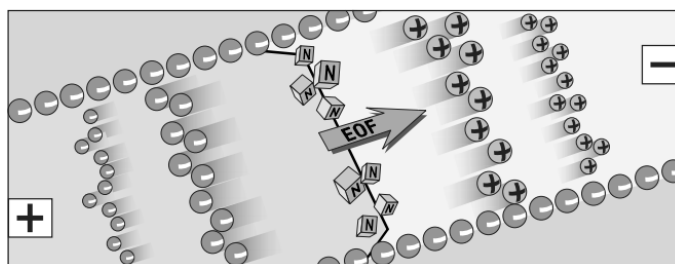
Vznik EOF v křemenných kapilárách je možný z důvodu disociace volných silanolových skupin (viz obrázek 1a) na vnitřním povrchu kapiláry ($\text{SiOH} \rightarrow \text{SiO}^- + \text{H}^+$) při vhodném pH BGE. Na záporně nabitém povrchu se vytvoří dvojvrstva kationtů (viz obrázek 1b). Vlivem elektrického pole nastane v kapiláře mechanický pohyb kationtů obalených molekulami vody, veškerý obsah kapiláry se pohybuje s nimi, a tím vzniká EOF (viz obrázek 1c), který se při základním uspořádání pohybuje směrem ke katodě.



Obrázek 1: Vznik EOF, převzato a upraveno ze zdroje [4]

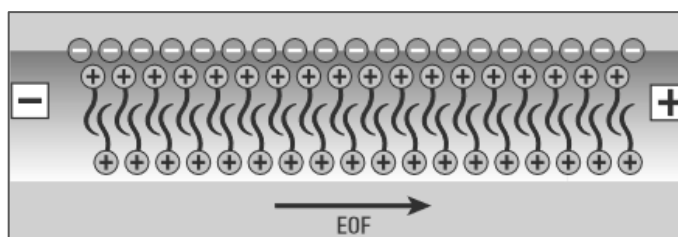
Disociace silanolových skupin je při pH pod 4 malá a EOF je tak velmi slabý, nejsilnější je při pH nad 9. Rychlost EOF závisí nejen na pH, ale i na teplotě a koncentraci BGE. Se zvyšující se koncentrací BGE se EOF zpomaluje [4, 5].

EOF zároveň unáší nenabitě částice, které se pohybují stejnou rychlostí jako EOF. Tok EOF má plochý rychlostní profil, díky tomu se zóny analytů rozmývají jen minimálně, což zvyšuje separační účinnost; píky jsou oproti HPLC analýze užší. EOF se v nemodifikované křemenné kapiláře pohybuje od anody ke katodě. Jak můžeme vidět na obrázku 2, při tomto uspořádání migrují jako první malé kationty a jako poslední malé anionty. Mezi kationty a anionty je zóna nerozdělených neutrálních látek [4].



Obrázek 2: Pořadí migrace analytů, převzato a upraveno ze zdroje [4]

Změnou pH nebo přidáním aditiv do BGE může dojít k potlačení až obrácení EOF. K obrácení EOF dochází přidáním kationaktivního tenzidu do BGE, tento tenzid modifikuje vnitřní stěnu kapiláry, jak můžeme vidět na obrázku 3. Na kladně nabitým povrchu se poté utvoří dvojvrstva aniontů, které se vlivem elektrického pole pohybují směrem k anodě. Pro tyto separace je nutné vkládat záporné napětí, aby EOF směřoval k detektoru na anodickém konci kapiláry [4].



Obrázek 3: Obrácení EOF, převzato a upraveno ze zdroje [4]

3.1.3. Kapilára

Kapilára je nejčastěji vyrobena z taveného křemene, což je prakticky čistý oxid křemičitý, který je lépe prostupný pro UV záření než sklo, což je výhodné pro UV/VIS detekci prováděnou přímo na kapiláře. Další materiály používané pro výrobu kapilár jsou teflon a sklo. Křemenná kapilára je velmi křehká a manipulace s ní je umožněna díky polyimidovému potahu, který kapiláře dodává pružnost a mechanickou odolnost.

Délka kapiláry se rozlišuje na celkovou a efektivní. Efektivní délka kapiláry je měřena od místa nástřiku vzorku, po detekční okno. Efektivní délka bývá o pět až deset centimetrů kratší než délka celková. Pro detektory, které se nachází mimo kapiláru, se efektivní délka rovná délce celkové [3, 4].

Po každé analýze musí být kapilára řádně promyta, aby byla připravena k další analýze.

3.1.4. Detektory

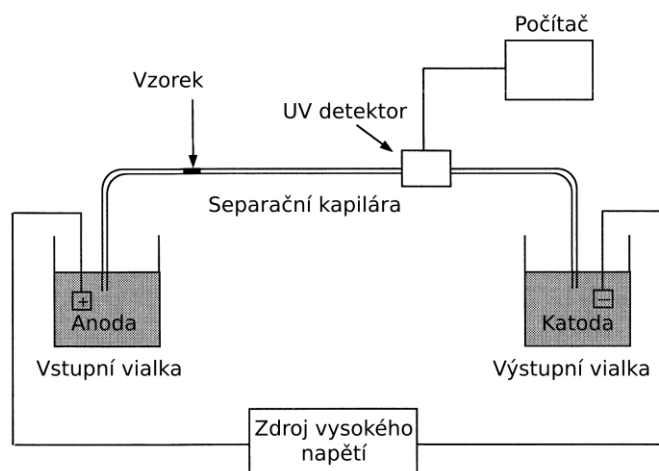
Nejčastěji používaný detektor pro CE je spektrofotometrický, který měří absorbanci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UV/VIS). Je umístěn v blízkosti výstupního konce kapiláry, paprsek prochází skrz kapiláru v místě detekčního okna, které je třeba vytvořit odstraněním polyimidového potahu [3].

Dále se používají detektory fluorescenční, vodivostní, elektrochemický, hmotnostní (MS) a radioaktivní [6]. MS detektor je napojen za kapilárou.

3.1.5. Instrumentace

Instrumentace CE je poměrně jednoduchá. Jak vidíme na obrázku 4, konce kapilár jsou spolu s elektrodami ponořeny do zásobníků (vialek) se BGE. Kapilára je stejným BGE také naplněna. Dávkování vzorku probíhá automaticky po výměně vstupní vialky se BGE za vialku se vzorkem. Po nadávkování se na vstupní konec kapiláry vrátí vialka se BGE a mezi elektrody je vloženo vysoké napětí. Vzorek poté prochází kapilárou, kde probíhá separace na jednotlivé složky. Obsah kapiláry nakonec projde přes detektor. Výstupem analýzy je elektroferogram, který dokumentuje závislost odezvy detektoru na čase. Záznam má tvar píků, jejichž migrační čas určuje totožnost analytu, oproti tomu plocha píků určuje jeho obsah ve vzorku [4, 5].

Dávkování vzorku probíhá nejčastěji tlakem (hydrodynamické dávkování). Dalšími možnostmi jsou rozdíl hladin, založený na principu spojených nádob, nebo elektrokinetické dávkování, jehož nevýhodou je následné rozdílné složení vzorku ve vialce a v kapiláře, jelikož pohyblivějších iontů do kapiláry migruje více. Signály z detektoru jsou zpracovány počítačem s vhodným softwarem [3, 4].



Obrázek 4: Schéma CE, převzato a upraveno ze zdroje [7]

3.1.6. Micelární elektrokinetická chromatografie

Tato metoda byla vyvinuta zejména pro analýzu nenabitých molekul, které se při CZE nedělí. Při MEKC se BGE skládá nejen z pufru, ale je v něm také přídavek povrchově aktivní látky (PAL) – nejčastěji je využíván anionaktivní dodecylsírán sodný (SDS). PAL v pufru po překročení kritické micelární koncentrace (CMC) tvoří micely. CMC je pro každou PAL a prostředí specifická. Pro SDS je 8 až 9 mM ve vodě, ale v běžně používaných pufrech je CMC nižší, kolem 3 mM [4]. Ve vodném BGE je uvnitř micel prostředí hydrofobní a může tam docházet k rozpouštění nepolárních látek. Každý analyt se takto rozděluje dle své polaritě mezi vodnou a hydrofobní micelární fázi. PAL je obvykle nabitá, což dává náboj i micelám, a ty díky tomu migrují k opačně nabitě elektrodě. Pro MEKC se používají BGE o vysokém pH, pro zajištění dostatečně silného EOF [4, 5]. Micely a všechny analyty jsou pomocí EOF unášeny směrem ke katodě. Čím silnější je interakce mezi analytem a micelou, tím déle je zadržován analyt v micelách, a tím je ovlivněn jeho migrační čas. Tato interakce mezi micelou a analytem způsobí rozdělení i nenabitých částic dle jejich polaritě. Micely se v tomto případě chovají podobně jako stacionární fáze v HPLC, ale kvůli jejich vlastnímu pohybu se označují jako pseudostacionární fáze [3].

Analyt, který není zadržovaný micelami, migruje v čase t_0 . Příkladem takové sloučeniny může být MeOH. Čas, za který urazí tu samou dráhu micela je t_{mc} . Jako indikátor t_{mc} se často používá barvivo Sudan III. Neutrální analyty migrují vždy mezi t_0 a t_{mc} , toto rozmezí se nazývá migrační okno [6].

PAL používané k MEKC mohou být anionaktivní, kationaktivní, amfolytické nebo neionogenní. Mezi anionaktivní PAL řadíme již zmíněný SDS nebo kyselinu cholovou. Často používané kationaktivní tenzidy jsou dodecyltrimethylamonium bromid, tetradecyltrimethylamonium bromid nebo hexadecyltrimethylamonium bromid. Neionogenní tenzid je například Triton X-100 [3, 4].

Anionaktivní PAL vytváří záporně nabitě micely, které podobně jako SDS migrují k anodě, tedy proti EOF. Kationaktivní PAL mají micely nabitě kladně, a ty migrují ke katodě. Ovšem kationaktivní PAL mění náboj na vnitřní stěně kapiláry a tím obrací směr EOF. Tudíž i kladně nabitě micely migrují proti EOF. Při takovýchto separacích se používá záporné napětí, aby EOF směřoval směrem k detektoru, který je na anodické straně kapiláry. Rychlost EOF je obvykle větší než rychlost micel, tudíž i ty migrují směrem k detektoru [3, 4].

Chirální PAL, např. CIL s dlouhým alkylovým řetězcem nebo tenzidy odvozené od žlučových kyselin jako je např. cholát sodný, mohou sloužit při chirálních separacích jako chirální selektory [4].

V MEKC se podobně jako v chromatografii používají organické modifikátory např. methanol (MeOH), acetonitril (ACN) nebo 2-propanol. Po jejich přidavku do BGE mohou oslabit interakce mezi analytem a micelami, a tím změnit selektivitu separace [4].

3.1.7. Chirální separace

Chiralita léčiv je v současnosti důležitý problém, protože se stereoizomery mohou lišit v účinnosti a toxikologickém profilu. Kvůli tomu je třeba stále vyvíjet analytické metody pro kontrolu stereochemické čistoty chirálních léčiv. Nejčastěji používaná technika je HPLC, ale i CE je velmi účinná. Chirální CE se používá u některých zkoušek na čistotu (např. zkouška enantiomerní čistota galantaminu) v Českém lékopise [8]. Ve farmaceutickém průmyslu je ovšem častěji používána HPLC, která je považována za metodu s vyšší robustností. Největší využití CE je v akademických laboratořích [9].

Pomocí CE lze provádět chirální separace zejména přidavkem chirálních selektorů do BGE. Nejčastěji jsou takto používány makromolekuly na cukerné bázi, mezi něž patří cyklodextriny (nativní nebo modifikované), dále streptomycin, nebo polysacharidy (maltodextrin, glukosaminoglykany). Také jsou používány chirální PAL, které tvoří micely [4, 10].

Pokud jeden stereoizomer interaguje silněji s chirálním selektorem, je tím více ovlivněna doba jeho migrace kapilárou v porovnání se stereoizomerem, který s ním vykazuje slabší interakci. Při dostatečně rozdílné míře této interakce dochází k chirální separaci [9].

3.2. Iontové kapaliny

3.2.1. Iontové kapaliny a možnosti jejich využití v analytické chemii

Iontové kapaliny (IL) jsou definované jako chemické sloučeniny tvořené kationtem a aniontem, s teplotou tání pod 100 °C. Iontová struktura určuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, mezi které patří netěkavý charakter, nehořlavost, vysoká teplotní stabilita, chemická stabilita, vysoká polarita, vysoká vodivost a schopnost rozpouštět anorganické i organické sloučeniny. IL s dlouhým alkylovým řetězcem jsou zároveň PAL. Jejich struktura může být navržena tak, aby měla požadované fyzikálně-chemické vlastnosti [11]. Na přelomu tisíciletí začaly být iontové kapaliny komerčně dostupné ve vysoké kvalitě a za přijatelnou cenu. Tím se staly dostupnými i pro výzkumné skupiny, které neměly možnost vlastní syntézy IL, a díky tomu se rozšířilo jejich všeobecné používání [10].

IL jsou použitelné mj. i pro velké množství aplikací v analytické chemii, například jako náhrada za těkavá organická rozpouštědla nebo jako stacionární fáze v plynové chromatografii (GC). V HPLC se IL dají použít jako stacionární fáze, ale také jako aditiva do mobilní fáze pro zvýšení rozlišení. V MS mohou být součástí matic pro laserovou desorpci/ionizaci za účasti matrice. Používají se i v CE jako aditiva do BGE, jsou schopné obrátit EOF. Pokud tvoří micely, mohou se využívat jako pseudostacionární fáze [12, 13, 14, 15].

Mimo analytickou chemii se IL používají také. V posledních letech se například zkoumá využití IL jako protiplísňových látek pro ochranu dřeva [16].

3.2.2. Chirální iontové kapaliny

CIL jsou podskupina IL, mají alespoň jedno chirální centrum na kationtu, na aniontu, nebo na obou iontech. V posledním desetiletí se vyvíjejí nové metody syntézy stabilních chirálních iontových kapalin a roste jejich využití v různých separačních technikách. Vlastnosti iontových kapalin mohou být upraveny změnou struktury. Syntézy CIL jsou dobře popsány ve zdroji [13]. Velká rozmanitost chirálních iontů a jejich kombinace dávají vznik velké pestrosti struktur CIL, která zároveň zvyšuje šanci na jejich různorodé

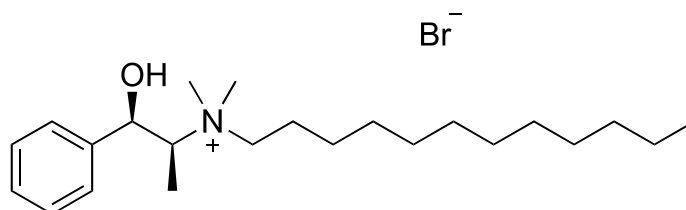
uplatnění. Odhaduje se, že je možné připravit až 10^{18} různých IL, což umožňuje obrovskou variabilitu jejich vlastností [11].

CIL se dají použít jako chirální selektory, jako reagentia pro asymetrické syntézy, své uplatnění najdou také v biologii a fyzice [11, 17]. Pro uplatnění v chirálních separacích pomocí CE se využívá buď synergického efektu CIL v přítomnosti jiného chirálního selektoru, nebo je CIL použita jako samotný chirální selektor [17]. Duální systémy s přidavkem CIL k jinému chirálnímu selektoru mohou výrazně zlepšit enantioseparaci, například při chirálních separacích pomocí cyklodextrinů má přidavek IL do BGE synergický efekt a zlepšuje separaci. Použití CIL jako samostatného chirálního selektoru je dle množství publikovaných prací výrazně méně časté. Pro enantioseparaci musí mít CIL vhodnou strukturu s dostatečným počtem míst pro interakci s enantiomery [11, 14, 17].

CIL v GC tvoří nový typ stacionární fáze, jejich výhodou je hlavně vysoká termální stabilita a nehořlavost. V HPLC se dají použít jako stacionární fáze nebo jako chirální selektory v mobilní fázi [18, 19].

3.2.3. (-)-*N*-Dodecyl-*N*-methylephedrinium bromid

DMEB je komerčně dostupná CIL a zároveň kationaktivní PAL. Jak můžeme vidět na obrázku 5, v jeho struktuře se nachází dvě centra chiralidy. Systematický název této látky je (1*R*,2*S*)-dodecyl(2-hydroxy-1-methyl-2-fenylethyl)dimethylamonium bromid. Molekulová hmotnost DMEB je 428,49 g/mol. Je to bílý prášek s teplotou tání 80-82 °C. Skladuje se v uzavřených nádobách na suchém místě, například v exsikátoru.



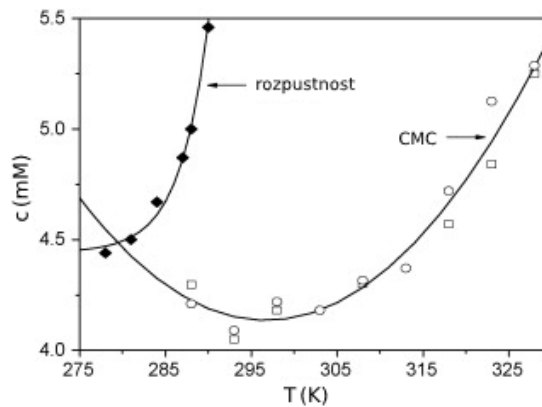
Obrázek 5: Struktura DMEB

První publikace o použití této CIL v analytické chemii vyšla v roce 1997. DMEB byl použit k separaci atropizomerů metakvalonu pomocí CE. Separace byla úspěšná, ale viditelná pouze při vyšších koncentracích DMEB, nejlépe při koncentraci 20 mM DMEB ve 150mM borátovém pufru o pH 9,4 a 50mM fosfátovém pufru o pH 8,0. Ovšem za těchto podmínek nebylo dosaženo rozlišení enantiomerů až na základní linii, zároveň byl

velmi dlouhý čas analýz. S borátovým pufrům probíhala analýza přes hodinu, s fosfátovým kolem 30 minut [2].

DMEB byl později použit také na chirální separace nesteroidních protizánětlivých látek (karprofen, flurbiprofen, fenoprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, naproxen, suprofen) pomocí MEKC. Šlo o teprve druhý publikovaný pokus o využití DMEB při MEKC. Vzorčky byly rozpuštěny ve směsi MeOH a vody (1:1, v/v), s koncentracemi mezi 100-200 $\mu\text{g/ml}$. K separaci byly použity racemické směsi analytů. Iontová síla všech pufrů byla upravena na 0,05 pomocí přídatku 0,5M roztoku NaCl. CMC DMEB byla v rámci tohoto výzkumu naměřena 1,8 mM ve 20mM fosfátovém pufru o pH 7,0. Při konstantní iontové síle je CMC nezávislá na pH. Koncentrace DMEB byla použita v rozmezí 5-20 mM, chirální separace probíhala nejlépe při koncentracích 10 mM. Při vyšších koncentracích separace neproběhla, nebo se nezměnila, což mohlo být způsobeno změnou struktury micel při vyšších koncentracích DMEB. Rozlišení píků bylo nejlepší u ketoprofenu a naproxenu, časy separací se pohybovaly okolo 28 minut. Chirální separace závisela na pH BGE, optimum bylo podle konkrétního analytu 7,4 nebo 7,9. Enantioseparace probíhala díky elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitými micelami a záporně nabitým analytem. Migrační časy záleží také na intenzitě hydrofobních interakcí mezi analytem a micelou. Dosažené výsledky dokazují, že DMEB lze jako chirální selektor použít a hodí se k dalšímu výzkumu. Dokonce se podařilo uskutečnit chirální separaci pěti různých NSAID v rámci jedné analýzy [20].

Další výzkum DMEB se týkal jeho rozpustnosti a CMC ve vodě. Na obrázku 6 můžeme vidět závislost rozpustnosti a CMC na teplotě. Při pokojové teplotě (20 °C = 293,15 K) se CMC nachází v minimu. Můžeme také vidět Krafftovu teplotu T_K (neboli kritickou micelární teplotu), což je teplota, kdy je shodná CMC s koncentrací nasyceného roztoku. Pro vodný roztok DMEB je hodnota T_K 280 K a rozpustnost při této teplotě činí 4,5 mM. Od Krafftovy teploty rozpustnost velmi rychle stoupá díky tvorbě micel [21].



Obrázek 6: Závislost rozpustnosti a CMC na teplotě, převzato a upraveno ze zdroje [21]

3.3. Chinolonová antibiotika

Chinolonová antibiotika jsou skupina baktericidních antibiotik. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA gyrázy a topoisomerasy IV. Jde o enzymy zodpovědné za správné řetězení bakteriální DNA během replikace. Původně se používaly na infekce močových cest, ale s vývojem nových struktur se z nich staly jedny z nejpoužívanějších antibiotik na světě. S tím se bohužel také pojí vysoké riziko vzniku rezistencí. Chinolonová antibiotika se řadí do čtyř generací.

Chinolony první generace se používají k léčbě močových infekcí, působí na enterobakterie a gonokoky. Ze zástupců sem patří například kyselina nalidixová a oxolinová. Chinolony druhé generace mají vyšší účinnost vůči gramnegativním bakteriím. Působí i na obligátně intracelulární patogeny jako jsou mykoplazmata a chlamydie. Používají se proti stafylokokům. Ze zástupců sem patří ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin a lomefloxacin. Chinolony třetí generace označované také jako „respirační chinolony“, jsou účinnější proti grampozitivním bakteriím, zejména pneumokokům, také vůči mykoplazmatům a chlamydiím. Jsou použitelné na téměř všechny bakteriální patogeny vyvolávající respirační onemocnění, ale jejich hromadné používání nese riziko vzniku rezistence. Levofloxacin má významný účinek proti pneumokokům. Ze zástupců sem patří sparfloxacin, temafloxacin, levofloxacin a gatifloxacin (zařazení levofloxacinu se liší dle zdroje – buď 2. [22] nebo 3. generace [23]). Chinolony čtvrté generace mají velmi široké spektrum účinku, jsou účinné na grampozitivní i gramnegativní bakterie, na intracelulární patogeny i na anaeroby. Ze zástupců sem patří moxifloxacin, gemifloxacin a gatifloxacin [23, 24].

Základem struktury chinolonů je chinolinový skelet. Nejčastěji používané jsou fluorochinolony, které mají navázaný atom fluoru v poloze 6 chinolinového jádra, a případně i na dalších místech struktury. Většina chinolonů je chirálních a syntetizují se ve formě racemických směsí. Pokud je farmakologická aktivita vázaná pouze na jeden enantiomer (druhý může být neaktivní až toxický), je žádoucí podávat pouze čisté enantiomery [24].

Nejčastější nežádoucí účinky chinolonů jsou nauzea, průjem, bolest hlavy, závratě, fototoxicita a poruchy jater. Některé nežádoucí účinky mohou být vázané u chirálních chinolonů pouze na jeden izomer, těm se dá zabránit užíváním čistého izomeru. Například u molekuly ofloxacinu je eutomerem *S*-izomer, který se vyrábí pod názvem levofloxacin. *R*-ofloxacinu (distomer) jsou přisuzovány neurotoxické nežádoucí účinky [22].

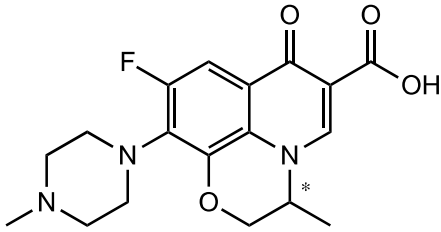
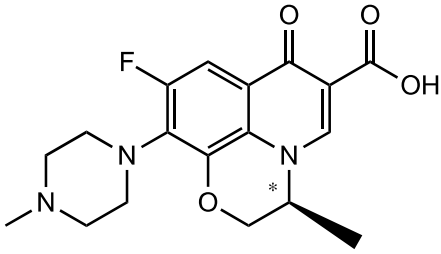
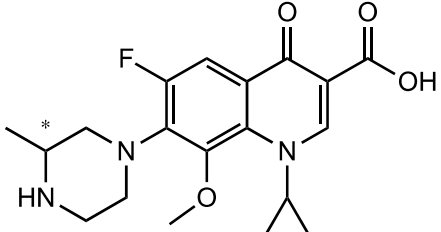
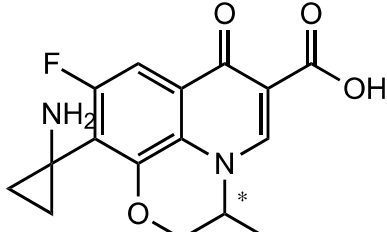
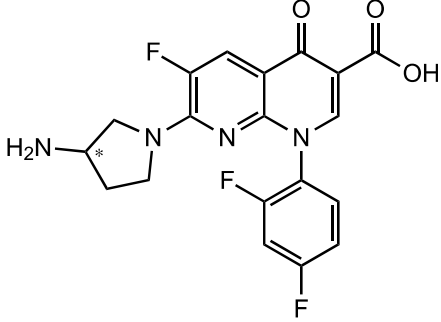
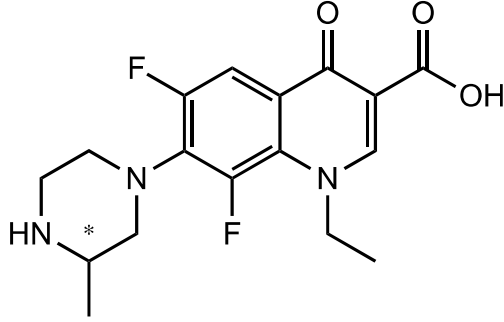
Z těchto důvodů je třeba vyvíjet analytické metody pro hodnocení totožnosti, čistoty a stanovení obsahu chirálně čistých chinolonových antibiotik. K těmto analýzám lze použít HPLC nebo CE, jejichž přehled byl publikován v roce 2017. Nejčastěji se jako chirální selektory využívají cyklodextriny. V CE se také používají vankomycin nebo chirální crown ethery [24].

V Americkém lékopise (USP) můžeme najít nejen monografie účinných látek, ale zároveň také léčivých přípravků, např. roztoku a tablet s levofloxacinem. Ke stanovení levofloxacinu se používá chirální HPLC metoda na bázi výměny ligandů. *R*-izomer je považován za nečistotu a jeho povolený obsah je maximálně 0,8 %. Pro stanovení levofloxacinu v tabletech se jako rozpouštědlo používá 20% ACN (v/v). Mobilní fáze se skládá ze síranu měďnatého (874 mg/l), *L*-isoleucinu (918 mg/l) a octanu amonného (5,94 g/l) rozpuštěných ve směsi vody a MeOH (7:3). Předepsaná stacionární fáze je tvořena oktadecylsilanem s velikostí částic 5 μ m. Analýza probíhá po dobu dvojnásobku retenčního času levofloxacinu. Zásobní roztok (ZR) vzorku se připravuje z minimálně pěti tablet s použitím 20% ACN tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 5 mg/ml. Do odměrné baňky se vloží tablety levofloxacinu, baňka se do tří čtvrtin doplní 20% ACN a nechá se 15 minut stát. Poté se 30 minut intenzivně míchá a nakonec se doplní stejným roztokem po rysku. Část obsahu baňky se přefiltruje vhodným filtrem o velikosti pórů 0,45 μ m, první 1-2 ml filtrátu se odstraní. Později se ZR naředí na pracovní roztok o koncentraci 0,2 mg/ml, opět s použitím 20% ACN. Pro analýzu je použita UV detekce při 360 nm. Tablety musí obsahovat 90,0-110,0 % deklarovaného množství levofloxacinu [25].

V Českém lékopise se pro stanovení levofloxacinu používá bezvodá titrace 0,1M kyselinou chloristou za potenciometrické indikace ekvivalenčního bodu. Pro zkoušku na příbuzné látky je předepsána HPLC metoda, *R*-ofloxacin je definován jako nečistota A. Jako mobilní fáze je použita směs MeOH a tlumivého roztoku (30:70, v/v). Tlumivý roztok se skládá ze síranu měďnatého pentahydrátu R (1,25 g/l), isoleucinu R (1,3 g/l) a octanu amonného R (8,5 g/l) rozpuštěných ve vodě pro chromatografii R. Stacionární fáze je tvořena silikagelem pro chromatografii (oktadecylsilylovaný se stíněnými silanolovými skupinami deaktivovaný pro bazické látky R), s velikostí částic 5 μm [26].

Struktury a vlastnosti vybraných chinolonů jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Struktury vybraných chinolonových antibiotik

ofloxacin	levofloxacin (<i>S</i> -ofloxacin)
	
gatifloxacin	pazufloxacin
	
tosufloxacin	lomefloxacin
	

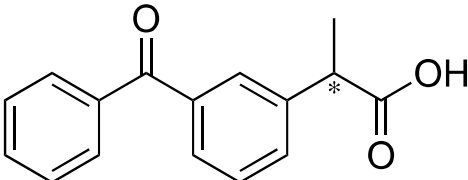
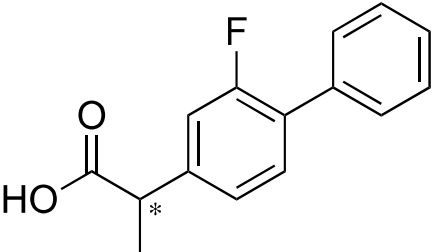
Tabulka 2: Vlastnosti vybraných chinolonových antibiotik [24, 27]

	ofloxacin	levofloxacin	gatifloxacin
Vzhled	žlutý krystalický prášek	světle žlutý krystalický prášek	bílý krystalický prášek
M (g/mol)	361,37	361,37	375,39
pKa	6,05; 8,22	6,05; 8,22	5,97; 9,13
pI	7,14	7,14	7,55
λ detekce (nm)	291	291	291
	pazufloxacin	tosufloxacin	lomefloxacin
Vzhled	bílý krystalický prášek	bílý krystalický prášek	bílý krystalický prášek
M (g/mol)	318,90	576,54	351,35
pKa	5,7; 8,6	5,22; 9,80	5,49; 8,78
pI	7,15	7,14	7,14
λ detekce (nm)	245	274	274

3.4. Nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID)

Jako modelové analyty byla použita také léčiva ze skupiny NSAID – ketoprofen a flurbiprofen. Jejich struktury a vlastnosti jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3: Struktury ketoprofenu a flurbiprofenu

ketoprofen	flurbiprofen
	

Tabulka 4: Vybrané vlastnosti ketoprofenu a flurbiprofenu [8, 28, 29]

	ketoprofen	flurbiprofen
Vzhled	bílý, krystalický prášek	bílý, krystalický prášek
<i>M</i> (g/mol)	254,28	244,26
Teplota tání (°C)	94-97	114-117
Rozpustnost ve vodě	prakticky nerozpustný	prakticky nerozpustný
pK_a	4,45	4,27
Absorpční maximum (nm)	255	247

4. Praktická část

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Standardy

- Ofloxacin, > 99%, šarže BCBQ5434V a BCCB4624V, Sigma-Aldrich.
- Levofloxacin, > 98%, šarže BCBK5832V a 089M4779V, Sigma-Aldrich.
- Ketoprofen, > 98%, šarže BCBG9546V, Sigma-Aldrich.
- (S)-(+)-Ketoprofen, 99%, šarže 03908KO, Sigma-Aldrich.
- Flurbiprofen, Sigma-Aldrich.
- Pazufloxacin, $\geq 98,0\%$, šarže BCBZ5177, Sigma-Aldrich.
- Gatifloxacin seskvihydrát, $\geq 98,0\%$, šarže BCBS8983V, Sigma-Aldrich.
- Lomefloxacin hydrochlorid, $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich.
- Tosufloxacin, $\geq 98,0\%$, šarže BCBS8983V, Sigma-Aldrich.

4.1.2. Základní chemikálie

- Ultračistá voda (dále jako voda) produkovaná systémem Milli-Q, Millipore, USA.
- Kyselina fosforečná, 85%, Merck.
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, 99%, Sigma-Aldrich.
- Trizma® base [tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid], > 99,9%, Sigma-Aldrich (dále jako trizma).
- Methanol pro HPLC, > 99,9%, Sigma-Aldrich.
- ACN pro HPLC, > 99,9%, Sigma-Aldrich.
- Kyselina boritá, Kulich, Hradec Králové, Česká republika.
- Kyselina octová, 99%, Sigma-Aldrich.

4.1.3. Chirální iontová kapalina

- (-)-*N*-dodecyl-*N*-methylephedrinium bromid, 99%, šarže 1374932 a 001451818, Sigma-Aldrich.

4.1.4. Registrované léčivé přípravky

Levofloxacin Mylan 500 mg, tablety, šarže 8097787, expirace 10/21.

Pomocné látky: mikrokryсталická celulóza, krospondon, hyprolóza, magnesium-stearát, makrogol 400, makrogol 3350, oxid titaničitý.

Oftaquix 5 mg/ml, oční kapky, roztok, šarže 1803723, expirace 11/22.

Pomocné látky: benzalkonium chlorid, NaCl, NaOH nebo HCl, voda na injekci.

4.2. Přístroje a pomůcky

Separace byly prováděny na elektroforetickém analyzátoru CE 7100, Agilent Technologies, Německo. UV spektrofotometr HP 8453 (Agilent Technologies, Německo) byl použit k proměření UV spektra DMEB. Úprava pH základních elektrolytů byla provedena na pH metru Sentron SI400 vybaveném MicroFET elektrodou (Sentron, Leek, Nizozemsko).

4.3. Podmínky CE analýz

Separace byly provedeny v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 50 μm , (Polymicro technologies, Phoenix, USA). Byly použity dvě šarže: BORJ0GA a BRVN01A.

Kapiláry byly použity o dvou délkách. První kapilára měla celkovou délku 48,5 cm a efektivní délku 40 cm. Před prvním použitím byla kapilára vždy propláchnuta 30 minut 1M NaOH, dalších 30 minut 0,1M NaOH a nakonec 30 minut H_2O . Každý den před začátkem měření byla kapilára promyta 10 minut 0,1M H_3PO_4 , následně 10 minut 0,1M NaOH a nakonec 10 minut H_2O .

Druhá kapilára byla použita o délce celkové 80,5 cm a efektivní 72 cm. Po nainstalování a každý den před prvním měřením byla kondicionována za stejných podmínek jako kapilára kratší.

Všechny elektrolyty a roztoky na promytí byly po přípravě přefiltrovány přes nylonové stříkačkové filtry Captiva Econofilter (velikost pórů 0,45 μm , poloměr 25 mm, Agilent) a poté odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. BGE byl vždy připravován do tří stejných vialek, z nichž jedna byla určena na promytí a naplnění kapiláry a zbylé dvě na samotnou analýzu – jako vstupní a výstupní vialka.

Roztoky vzorků nebo standardů nebyly filtrovány. K CE analýze bylo vždy odebráno 200 μl roztoku standardu či vzorku do mikrovialky. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky, tlakem 50 mbar po dobu pěti sekund.

Kapilára byla temperována na 25 $^\circ\text{C}$. UV/VIS detekce probíhala při vlnových délkách uvedených pro konkrétní analyty v tabulkách 2 a 4.

4.3.1. Podmínky CZE analýz v achirálním BGE

Tyto podmínky byly použity pro separace v BGE bez přídavku chirálního selektoru. Kratší kapilára byla před každou analýzou promývána 3 minuty 0,1M NaOH, 3 minuty H₂O a 4 minuty BGE. Delší kapilára byla před každou analýzou promývána 6 minut 0,1M NaOH, 6 minut H₂O a 8 minut BGE.

Vkládané napětí bylo u pufru fosfátového (pH 2,0), octanového (pH 5,0), trizmového (pH 8,5) a borátového (pH 9,0) +30kV. Vkládané napětí u fosfátového pufru (pH 7,5) bylo +20kV.

Délka analýzy byla nastavena na 20 minut, později byla zkracována dle konkrétních podmínek a zkušeností.

4.3.2. Podmínky CE analýz pro separace s chirálním selektorem DMEB

Kratší kapilára byla před každou analýzou promývána 3 minuty 0,1M H₃PO₄, 3 minuty H₂O a 4 minuty BGE.

U analýz s přídavkem MeOH nebo ACN v BGE bylo přidáno na začátek promývání po dobu 2 minut 20% (v/v) vodným roztokem MeOH (dále jen 20% MeOH) nebo ACN (dále jen 20% ACN).

Delší kapilára byla před každou analýzou promývána 6 minut 20% ACN, 6 minut 0,1M H₃PO₄, 6 minut H₂O a 8 minut základním elektrolytem.

Vkládané napětí bylo u pufru trizmového (pH 8,5) a borátového (pH 9,0) -30kV, u fosfátového pufru (pH 7,5) -20kV. U analýz s fosfátovým pufrem, kde BGE obsahoval organický modifikátor (MeOH nebo ACN), bylo napětí upraveno na -25kV.

4.3.3. Podmínky CE analýz pro ověření linearity

Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Pro analýzu byla použita vždy jedna sada tří vialek BGE na maximálně 12 analýz. Linearita byla ověřena ve dvou BGE. Prvním byl 20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % MeOH a 50 mM DMEB v kapiláře o délce 48,5/40 cm (kalibrační křivka č. 1). Druhým BGE byl 20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB v kapiláře o délce 80,5/72 cm (kalibrační křivka č. 2 a 3). Vkládané napětí bylo -30 kV.

4.4. Příprava základních elektrolytů pro achirální separace

BGE byly uchovávány v uzavřených nádobách při teplotě 2-8 °C maximálně 14 dní.

4.4.1. Příprava 50mM fosfátového pufru o pH 2,0

V kádince bylo rozpuštěno 340 μ l 85% kyseliny fosforečné v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 2,0 pomocí 1M NaOH, roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.2. Příprava 60mM octanového pufru o pH 5,0

V kádince bylo rozpuštěno 347 μ l 99% kyseliny octové v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 5,0 pomocí 1M NaOH, roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.3. Příprava 50mM fosfátového pufru o pH 7,5

Na analytických vahách bylo do kádinky naváženo 780,0 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, který byl následně rozpuštěn v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 7,5 pomocí 1M NaOH, roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.4. Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5

Na analytických vahách bylo do kádinky naváženo 242,0 mg trizmy, která byla následně rozpuštěna v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 8,5 pomocí 1M HCl, roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.5. Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % MeOH

Na analytických vahách bylo do kádinky naváženo 242,0 mg trizmy, která byla následně rozpuštěna v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 8,5 pomocí 1M HCl, roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky, k roztoku bylo přidáno 20 ml MeOH a roztok byl doplněn vodou po rysku.

4.4.6. Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % ACN

Na analytických vahách bylo do kádinky naváženo 242,0 mg trizmy, která byla následně rozpuštěna v přibližně 50 ml vody. Hodnota pH byla upravena na 8,5 pomocí 1M HCl,

roztok byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky, k roztoku bylo přidáno 20,0 ml ACN a roztok byl doplněn vodou po rysku.

Obdobným postupem byly připraveny i ostatní BGE s přidavkem organického modifikátoru.

4.5. Příprava základních elektrolytů pro chirální separace

BGE s přidavkem DMEB byly připraveny vždy čerstvé pro každou analýzu.

4.5.1. Příprava 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB

Do 25ml vialky bylo naváženo 428,5 mg DMEB, jež byl rozpuštěn na ultrazvukové lázni v 10,0 ml 20mM trizmového pufru o pH 8,5 s 20 % ACN (4.4.6).

Obdobným způsobem byly připraveny i ostatní BGE s přidavkem DMEB. V tabulce 5 jsou uvedeny navážky pro přípravy BGE s různými koncentracemi DMEB.

Tabulka 5: Teoretické navážky DMEB pro konkrétní koncentrace

Koncentrace DMEB (mM)	Navážka (mg)	Koncentrace DMEB (mM)	Navážka (mg)
10	42,8	60	257,1
25	107,1	70	299,9
35	150,0	75	321,4
45	192,8	80	342,8
50	214,2	100	428,5

4.6. Příprava roztoků standardů

4.6.1. Příprava roztoku ofloxacinu v MeOH [30]

Do první 10ml odměrné baňky bylo naváženo 10,0 mg levofloxacinu, do druhé 10,0 mg racemického ofloxacinu. Obě látky byly rozpuštěny v přibližně 5 ml MeOH a potom byly baňky doplněny po rysku stejným rozpouštědlem. Takto vznikly dva ZR, každý o koncentraci 1 mg/ml. Do třetí 10ml odměrné baňky bylo napipetováno 400 μ l ze ZR ofloxacinu, 200 μ l ze ZR levofloxacinu a baňka byla doplněna po rysku vodou. Takto byl získán pracovní roztok o koncentraci 40 μ g/ml levofloxacinu a 20 μ g/ml R-ofloxacinu.

4.6.2. Příprava roztoku ofloxacinu ve 20% ACN

Do první 10ml odměrné baňky bylo naváženo 10,0 mg levofloxacinu, do druhé 10,0 mg racemického ofloxacinu. Obě látky byly rozpuštěny v přibližně 5 ml 20% ACN a potom byly baňky doplněny po rysku stejným rozpouštědlem. Takto byly připraveny dva ZR, každý o koncentraci 1 mg/ml. Do třetí 10ml odměrné baňky bylo napipetováno 400 μ l ze ZR ofloxacinu, 200 μ l ze ZR levofloxacinu a baňka byla doplněna po rysku 20% ACN. Takto byl získán pracovní roztok o koncentraci 40 μ g/ml levofloxacinu a 20 μ g/ml *R*-ofloxacinu.

4.6.3. Příprava roztoků chinolonových antibiotik

Na mikrovahách byl do zkumavky Eppendorf navážen standard konkrétního chinolonu (cca 1 mg) a přesná navážka byla zaznamenána. Poté byl přidán 1,000 ml MeOH a vzorek byl rozpuštěn pomocí přístroje Vortex nebo ultrazvukové lázně. Nakonec byla spočítána přesná koncentrace a dle ní bylo dopočítáno potřebné ředění ZR ($c \sim 1$ mg/ml) tak, aby měl výsledný pracovní roztok koncentraci 60 μ g/ml. K přípravě pracovních roztoků byl použit 50% (v/v) MeOH. Pro přípravu pracovního roztoku pazufloxacinu byl kvůli špatné rozpustnosti použit čistý MeOH.

Pro přípravu pracovního roztoku bylo při koncentraci ZR 1,054 mg/ml do zkumavky Eppendorf napipetováno 57 μ l ZR a 943 μ l 50 % MeOH.

4.6.4. Příprava roztoku ketoprofenu

Do první 10ml odměrné baňky bylo naváženo 10,0 mg ketoprofenu a do druhé 10,0 mg *S*-ketoprofenu. Obě látky byly rozpuštěny v přibližně 5 ml MeOH a potom byly baňky doplněny po rysku stejným rozpouštědlem. Takto byly připraveny dva ZR, každý o koncentraci 1 mg/ml. Do třetí 10ml odměrné baňky bylo napipetováno 500 μ l ze ZR ketoprofenu, 500 μ l ze ZR *S*-ketoprofenu a baňka byla doplněna po rysku 10% MeOH. Takto byl získán pracovní roztok o koncentraci 25 μ g/ml *R*- a 75 μ g/ml *S*-ketoprofenu.

4.6.5. Příprava roztoku flurbiprofenu

Do 10ml odměrné baňky bylo naváženo 10,0 mg flurbiprofenu. Látka byla rozpuštěna v přibližně 5 ml MeOH a potom byla baňka doplněna po rysku stejným rozpouštědlem. Takto byl připraven ZR o koncentraci 1 mg/ml. Do druhé 10ml odměrné baňky byl napipetován 1 ml ZR a baňka byla po rysku doplněna MeOH. Takto byl získán pracovní roztok racemické směsi flurbiprofenu o koncentraci 50 μ g/ml pro každý z enantiomerů.

4.6.6. Příprava roztoku vnitřního standardu (IS)

Do 5ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně přesně 5,00 mg gatifloxacinu. Látka byla rozpuštěna v přibližně 3 ml 20% ACN a poté byla stejným rozpouštědlem doplněna po rysku. Takto byl připraven ZR gatifloxacinu o koncentraci 1 mg/ml.

4.6.7. Příprava kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 1

Do zkumavky Eppendorf byl navážen přibližně přesně 1,000 mg racemického ofloxacinu, jež byl rozpuštěn v 1,000 ml MeOH. Tento ZR o koncentraci 1 mg/ml byl ředěn na jednotlivé kalibrační roztoky o koncentracích 2,5; 5; 10; 20; 40 a 80 µg/ml pro každý z izomerů.

Pro přípravu kalibračního roztoku o koncentraci 2,5 µg/ml pro každý z enantiomerů (tj. 2,5 µg/ml pro *S*- a 2,5 µg/ml pro *R*-ofloxacin) bylo 5 µl ZR smícháno s 995 µl vody a promícháno na přístroji Vortex. Obdobně byly připraveny i zbylé kalibrační roztoky. Na závěr byly dopočteny přesné koncentrace jednotlivých kalibračního roztoků podle skutečné navážky ofloxacinu.

4.6.8. Příprava kalibračních roztoků pro kalibrační křivky č. 2 a 3

Do 10ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně přesně 10,00 mg racemického ofloxacinu. Látka byla rozpuštěna v přibližně 5 ml 20% ACN a poté byla tím samým rozpouštědlem doplněna po rysku. Tento ZR o koncentraci 1 mg/ml byl nadále ředěn na kalibrační roztoky o koncentracích 10, 20, 30, 40, 50, 75 a 100 µg/ml pro každý z izomerů, vždy s přídatkem vnitřního standardu tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 40 µg/ml.

Pro přípravu kalibračního roztoku o koncentraci 10 µg/ml bylo do 10ml odměrné baňky napipetováno 200 µl ZR ofloxacinu, dále bylo přidáno 400 µl ZR IS a baňka byla doplněna po rysku 20% ACN. Obdobně byly připraveny i zbylé kalibrační roztoky. Na závěr byly dopočteny přesné koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků podle skutečné navážky.

4.7. Příprava vzorků z registrovaných LP

4.7.1. Příprava roztoku vzorku z tablet Levofloxacin Mylan 500 mg

Jedna tableta levofloxacinu byla vyjmuta z blistru, zvážena (712,230 mg) a následně rozmělněna v porcelánové třence, ze které byl do 10ml odměrné baňky odebrán adekvátní

podíl odpovídající 10,0 mg levofloxacinu (tj. 14,2 mg tabletoviny za předpokladu, že v jedné tabletě se nachází přesně 500 mg levofloxacinu).

Navážka tabletoviny byla smíchána s přibližně 5 ml 20% ACN, poté jí byla doplněna po rysku a dána na 5 minut do ultrazvukové lázně. Následně byl vzorek přefiltrován přes nylonový filtr (Captiva Econofiltr, Agilent) o velikosti pórů 0,45 μm . První 3 ml filtrátu byly odstraněny. Z filtrátu bylo do další 10ml odměrné baňky odebráno 400 μl , k němu bylo přidáno 400 μl ZR IS a pomocí 20% ACN byla baňka doplněna po rysku. Za předpokladu obsahu přesně 500 mg levofloxacinu v jedné tabletě byl připraven pracovní roztok o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ levofloxacinu.

Z jedné tablety byly takto připraveny tři vzorky, z nichž každý byl třikrát analyzován za optimalizovaných podmínek pomocí CE (4.5.1 a 5.8). Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky č. 2, která byla analyzována ve stejné sekvenci jako vzorky.

Příprava vzorku byla inspirována Americkým lékopisem (USP 39), viz kapitola 3.3. [25].

4.7.2. Příprava roztoku vzorku z očních kapek Oftaquix 5 mg/ml

Do 10ml odměrné baňky bylo přímo z léčivého přípravku napipetováno 80 μl očních kapek, k roztoku bylo přidáno 400 μl ZR IS a vzorek byl pomocí 20% ACN doplněn po rysku.

Takto byly oční kapky naředěny 125 \times . Za předpokladu koncentrace léčivého přípravku 5 mg/ml byl připraven pracovní roztok o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ levofloxacinu. Připraveny byly dva vzorky, z nichž každý byl analyzován třikrát za optimalizovaných podmínek pomocí CE. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky č. 3, která byla analyzována ve stejné sekvenci jako vzorky.

4.8. Vyhodnocení separace

4.8.1. Elektroforetická pohyblivost

Výpočet dle rovnic (3-3) až (3-6).

4.8.2. Účinnost separace [31]

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4-1)$$

N – počet teoretických pater, t_R – migrační čas (s), w_h – šířka píku v polovině výšky (s)

4.8.3. Rozlišení [31]

$$R_S = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (4-2)$$

R_S – rozlišení mezi dvěma píky, t_R – migrační čas, kde $t_{R2} > t_{R1}$, w_h – šířka píku v polovině výšky (s)

4.8.4. Korigovaná plocha

$$CA = \frac{A}{t_R} \quad (4-3)$$

CA – korigovaná plocha, A – plocha píku, t_R – migrační čas (s)

4.8.5. Směrodatná odchylka

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4-4)$$

SD – směrodatná odchylka, x – jednotlivá hodnota měření, \bar{x} – průměrná hodnota x , n – počet měření

4.8.6. Relativní směrodatná odchylka

$$RSD = 100 \cdot \frac{SD}{\bar{x}} \quad (4-5)$$

RSD – relativní směrodatná odchylka, SD – směrodatná odchylka, \bar{x} – průměrná hodnota x

5. Výsledky a diskuse

5.1. Separace za achirálních podmínek

Separacemi v BGE bez přídavku chirálního selektoru byla ověřována čistota standardů, jejich elektroforetické chování a případně účinnost odstranění DMEB z vnitřního povrchu kapiláry. Za těchto podmínek byl na výsledném elektroferogramu očekáván jen jeden pík analytu a případně pík EOF.

Pro separaci v achirálním prostředí byly použity jako BGE následující pufr: 50mM fosfátový (pH 2,0), 60mM octanový (pH 5,0), 50mM fosfátový (pH 7,5), 20mM trizmový (pH 8,5) a 20mM borátový (pH 9,0). Z analytů byly za těchto podmínek analyzovány ketoprofen (4.6.4), flurbiprofen (4.6.5), a ofloxacin (4.6.1). Všechny analýzy podle očekávání poskytovaly (vyjma píku EOF) jeden pík, což dokazuje čistotu standardů. Na obrázku 7 můžeme vidět elektroferogram separace ofloxacinu ve 20mM borátovém pufru o pH 9,0. V tabulce 6 je shrnut náboj analytů za daných podmínek a jejich migrace s ohledem na EOF.

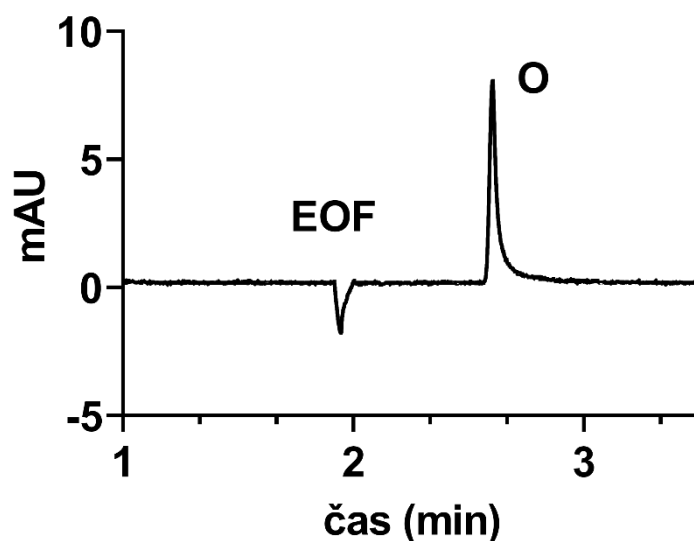
Tabulka 6: Náboje analytů v konkrétních BGE a jejich migrace vůči EOF

Pufr	ofloxacin	ketoprofen	flurbiprofen
Fosfátový pH 2,0	Kladný, migruje ke katodě	Neutrální, bez EOF, nemigruje	
Octanový pH 5,0	Kladný, migruje před EOF	Záporný, migruje po EOF	
Fosfátový pH 7,5	Záporný, migruje po EOF		
Trizmový pH 8,5	Záporný, migruje po EOF		
Borátový pH 9,0	Záporný, migruje po EOF		

Při separacích s použitím 50mM fosfátového pufru o pH 7,5 s vkládaným napětím +30 kV přesáhl indukovaný proud 100 μ A. Příliš vysoký proud může způsobit nadměrné zahřívání kapiláry, které se projeví neopakovatelnými výsledky. Z tohoto důvodu bylo u tohoto pufru dále pracováno s nižším napětím +20 kV.

Fosfátový pufr o pH 2,0 byl pro další experimenty vyřazen, a to zejména z důvodu nízkého pH, které potlačilo vznik EOF, bez kterého se nenabité analyty v elektrickém poli nepohybují. Octanový pufr o pH 5,0 byl vyřazen, protože neposkytoval opakovatelné

výsledky. Dále se pracovalo pouze se třemi zbývajícími pufrů, v nichž byly testované analyty záporně nabitě a zároveň byl přítomen silný EOF.



Obrázek 7: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM borátový pufr o pH 9,0; UV detekce při 291 nm, napětí +30kV

5.2. Chirální separace – screening

Před prvními experimenty s DMEB bylo u této látky změřeno UV/VIS spektrum ve vodě (koncentrace 10 mM). Jelikož byla hodnota absorbance od vlnové délky 225 nm minimální, tak byly pro UV/VIS detekci vždy použity vlnové délky nad touto hodnotou.

Do základního elektrolytu byl přidán chirální selektor. Tímto chirálním selektorem byla již dříve popsána chirální iontová kapalina DMEB. Pro přidavek DMEB byly vybrány pouze 50mM fosfátový pufr o pH 7,5; 20mM trizmový pufr o pH 8,5 a 20mM borátový pufr o pH 9,0. U těchto pufrů je díky vyššímu pH silný EOF. DMEB je strukturou kationaktivní tenzid, tudíž s jeho přidavkem do BGE došlo k obrácení EOF. Aby EOF směřoval směrem k detektoru, tyto analýzy s přidavkem DMEB probíhaly s vloženým záporným napětím (-20 kV u fosfátového pufru, -30 kV u pufru trizmového a borátového).

Screening probíhal na vybraných chirálních léčivech: ketoprofen, flurbiprofen a ofloxacin, s 10mM a 25mM přidavkem DMEB do BGE. U ofloxacinu byla ve všech třech pufrách viditelná separace jednotlivých enantiomerů. U flurbiprofenu a ketoprofenu nebyly patrné ani náznaky chirální separace bez ohledu na použitý BGE, což je v rozporu

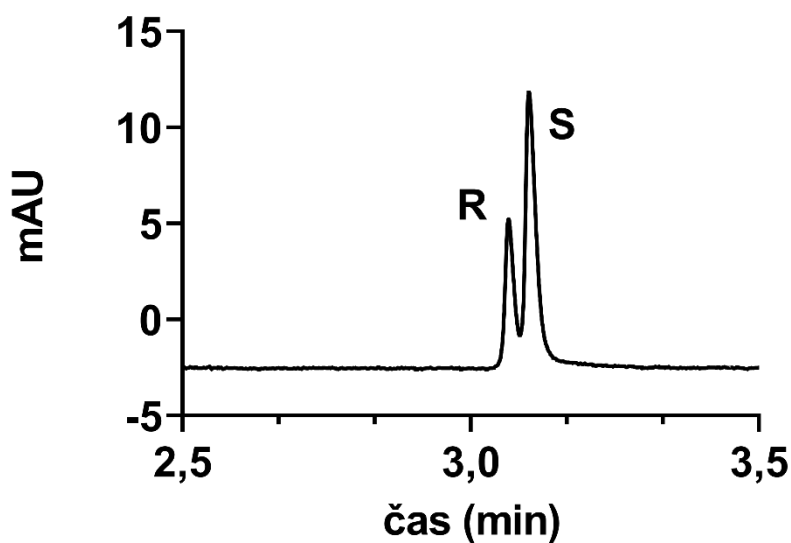
s výsledky Deye a kol., kteří za podobných separačních podmínek rozseparovali několik NSAID za použití BGE o složení: 20mM fosfátový pufr o pH 7,4 s 10 mM DMEB a iontovou silou upravenou na 0,05 [20]. V následující tabulce můžeme vidět porovnání chirální separace ofloxacinu v borátovém pufru se dvěma koncentracemi chirálního selektoru. S vyšším obsahem DMEB se prodloužily časy migrace, což může souviset se silnější interakcí ofloxacinu s micelami. Zároveň se zvýšila účinnost (N). Opakovatelnost (SD a RSD) byla počítána z μ_e ($n = 3$). Rozlišení separace nedosahuje až na základní linii ($R_S < 1,5$), což můžeme vidět na obrázku 8. Pro porovnání jsou uvedeny i elektroferogramy ze separací se zbylými BGE (obrázky 9 a 10), kdy v některých případech byla hodnota $R_S \geq 1,5$ (viz tabulka 8).

Tabulka 7: Souhrn výsledků chirální separace enantiomerů ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 10 mM/25 mM DMEB, napětí -30 kV , $n = 3$

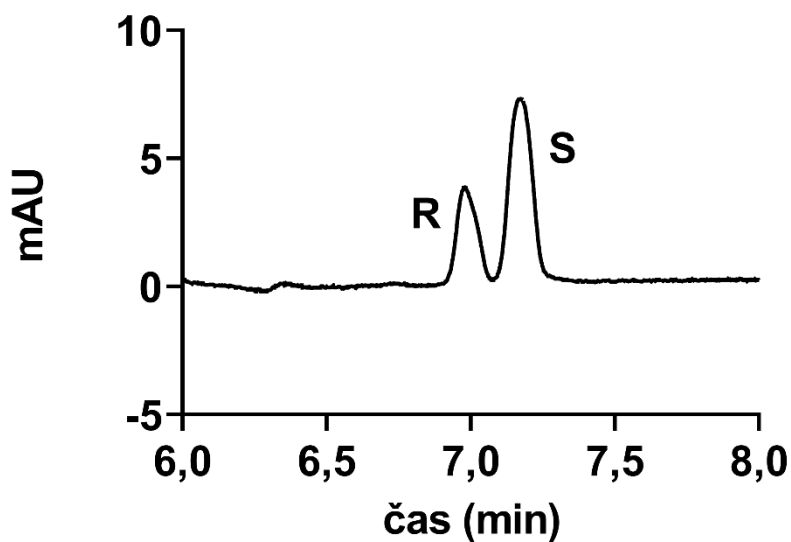
	R-ofloxacin	S-ofloxacin	R-ofloxacin	S-ofloxacin
$c_{(DMEB)}$ (mM)	10		25	
t_{EOF} (min)	1,66		1,80	
t_A (min)	2,83	2,88	3,55	3,59
μ_{EOF} (cm^2/Vs)	$-6,51 \times 10^{-4}$		$-6,00 \times 10^{-4}$	
μ_a (cm^2/Vs)	$-3,81 \times 10^{-4}$	$-3,75 \times 10^{-4}$	$-3,04 \times 10^{-4}$	$-3,00 \times 10^{-4}$
μ_e (cm^2/Vs)	$2,69 \times 10^{-4}$	$2,76 \times 10^{-4}$	$2,97 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$
SD (cm^2/Vs)	$3,93 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-7}$	$3,48 \times 10^{-6}$	$1,31 \times 10^{-6}$
RSD (%)	0,15	0,14	1,17	0,44
N	111800	50754	122373	97886
R_S	1,17		1,20	

Ofloxacin je při pH 9,0 negativně nabitý, a proto může být díky opačnému náboji zesílena interakce s kladně nabitými micelami DMEB. S těmi pravděpodobně tvoří labilní komplex, který migruje opačným směrem než EOF. Ovšem efektivní pohyblivost tohoto komplexu je nižší než μ_{EOF} a z tohoto důvodu ofloxacin migruje také směrem k detektoru, který je na anodickém konci kapiláry. R-izomer a S-izomer tvoří s DMEB komplexy o rozdílných konstantách asociace nebo o rozdílných μ_e , a díky tomu dochází k rozdílným

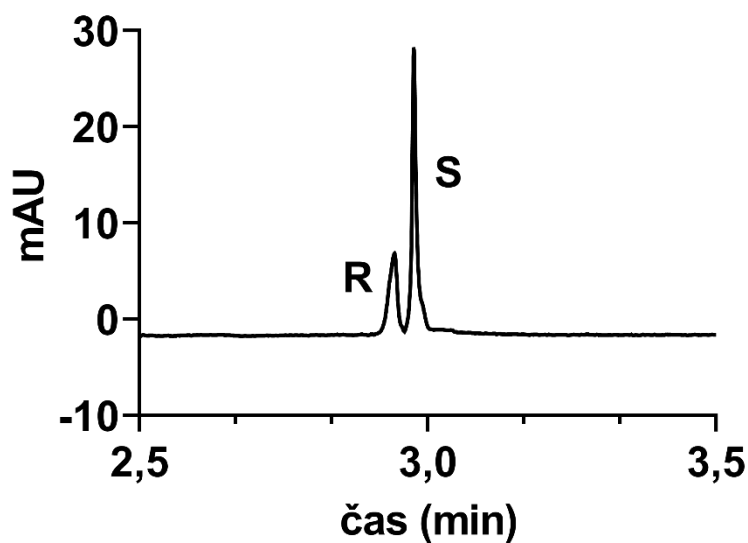
časům jejich migrace. Kromě elektrostatických interakcí mohou hrát roli další typy intermolekulárních interakcí jako jsou vodíkové můstky, π - π či hydrofobní interakce.



Obrázek 8: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 25 mM DMEB; UV detekce při 291 nm, napětí -30kV



Obrázek 9: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 50mM fosfátový pufr o pH 7,5 + 25 mM DMEB; UV detekce při 291 nm, napětí -30kV



Obrázek 10: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace *R*-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, *S*-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 25 mM DMEB; UV detekce při 291 nm, napětí -30kV

Trizmový a borátový pufr poskytovaly oproti fosfátovému pufru separace s vyšší účinností, což je na první pohled viditelné i na tvarech píků, které jsou užší a vyšší. Separace byly zároveň rychlejší. Určení pořadí migrace enantiomerů bylo možné díky složení roztoku standardu, kde byla koncentrace *R*-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$ a *S*-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$, tudíž byl očekávaný poměr ploch píků 1:2.

Hodnoty rozlišení nebyly opakovatelné, za stejných podmínek se mezi dny velmi lišily, jak můžeme vidět v tabulce 8. Mohlo by to být způsobeno vlivem různých šarží DMEB či přesunem na novou kapiláru (oboje od 2/5/19).

Tabulka 8: Hodnoty rozlišení mezi enantiomery ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), v různé dny, BGE vždy s přidavkem 25 mM DMEB, bez organického modifikátoru

	50mM fosfátový pufr o pH 7,5	20mM trizmový pufr o pH 8,5	20mM borátový pufr o pH 9,0
29/3/19	2,14; n = 2	1,84; n = 2	1,50; n = 2
5/4/19	-	1,05 ± 0,02; n = 3	1,20 ± 0,03; n = 3
11/4/19	1,91 ± 0,10; n = 3	-	1,60 ± 0,04; n = 3
2/5/19	1,32 ± 0,01; n = 3	1,75 ± 0,02; n = 3	1,19 ± 0,02; n = 3
3/5/19	1,55 ± 0,10; n = 3	-	1,03 ± 0,18; n = 3
Celkem	1,70 ± 0,32; n = 11	1,51 ± 0,39; n = 8	1,29 ± 0,23; n = 14

Byla testována chirální separace také s pufrů o pH 2,0 a 5,0. Ofloxacin je při pH 2,0 převážně kladně nabitý, v elektrickém poli se při záporném napětí pohybuje směrem od detektoru a bez dostatečného EOF nemigruje směrem k detektoru. EOF byl velmi slabý (t_{EOF} okolo 10 min) a během 15minutové analýzy nebyl detekován žádný jiný pík. Při pH 5,0 separace za zkoušených podmínek s vkládaným napětím -30 kV neprobíhá. Na záznamu byl pozorován pouze pík EOF a jeden pík ofloxacinu, který migroval po EOF. Za těchto podmínek k separaci nedochází nejspíše z důvodu, že ofloxacin je kladně nabitý, a tak zřejmě nedochází k dostatečně rozdílné interakci jednotlivých enantiomerů s kladně nabitým chirálním selektorem. Tento výsledek potvrdil klíčovou roli elektrostatické interakce na výslednou chirální separaci. Z těchto důvodů bylo od dalšího pokračování s těmito pufrů upuštěno.

Kvůli neúspěšné separaci ketoprofenu a flurbiprofenu byly tyto látky z dalšího testování vyřazeny a dále se pracovalo pouze s ofloxacinem, ke kterému byla přidána další chirální chinolonová antibiotika s cílem vyzkoušet, zda se za daných podmínek budou chirálně separovat podobně jako ofloxacin.

5.2.1. Opakovatelnost

V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty získané analýzou ofloxacinu v různé dny za stejných podmínek. BGE byl 20mM borátový pufr o pH 9,0 s 25 mM DMEB. První dva sloupce udávají výsledky separací na první kapiláře s první šarží DMEB (šarže 1374932), další dva sloupce na druhé kapiláře stejné šarže (šarže BORJ0GA) s jinou šarží DMEB

(šarže 001451818). Poslední dva sloupčky udávají hodnoty směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) dohromady ze všech čtyř dní (n = 12).

Tabulka 9: Chirální separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), BGE: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 25 mM DMEB, n = 3, pokud není uvedeno jinak

	5/4/19	11/4/19	2/5/19	3/5/19	SD n = 12	RSD n = 12
t_{EOF} (min)	1,80	1,74	1,65	1,69	0,06	3,49 %
t_R (min)	3,55	3,32	3,06	3,17	0,19	5,80 %
t_S (min)	3,59	3,36	3,10	3,20	0,19	5,74 %
$\mu_{e(R)}$ (cm ² /Vs)	2,97×10 ⁻⁴	2,96×10 ⁻⁴	3,03×10 ⁻⁴	2,99×10 ⁻⁴	3,12×10 ⁻⁶	1,04 %
$\mu_{e(S)}$ (cm ² /Vs)	3,00×10 ⁻⁴	3,00×10 ⁻⁴	3,07×10 ⁻⁴	3,03×10 ⁻⁴	3,02×10 ⁻⁶	1,00 %
N_R	122 373	401 760	200 341	130 841	120 475	56 %
N_S	97 886	215 597	152 740	121 289	47 971	32 %
R_S (%)	1,20	1,60	1,19	1,03	0,23	18,33 %

S nově nainstalovanou kapilárou a novou šarží DMEB se migrační časy mírně zkrátily. U efektivních pohyblivostí nejsou velké rozdíly, což značí, že dochází pouze k posunu migračních časů a efektivní pohyblivosti zůstávají relativně neměnné s RSD okolo 1 %. Největší RSD mezi těmito dny bylo zaznamenáno u účinnosti separace vyjádřené v počtu teoretických pater. Problémy s účinností nejspíše také souvisely s chvostováním píků. Z tabulky je také vidět, že velké rozdíly v účinnosti separace jsou bez ohledu na kapiláru nebo šarží DMEB.

Jelikož byly oba parametry měněny najednou, tak nelze přesně určit, který má větší podíl. Nová kapilára byla stejné šarže jako ta původní, naproti tomu DMEB byl jiné šarže, z čehož by se dalo předpokládat, že má větší podíl, ale k přesnému posouzení by bylo potřeba měnit parametry postupně.

5.3. Chirální separace dalších chinolonových antibiotik

Další testovaná léčiva byla pazufloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin a tosufloxacin.

Chirální separace byla zkoušena za stejných podmínek jako u ofloxacinu, s koncentrací DMEB 25 mM. Výsledkem analýz u těch látek byl vždy jen jeden pík, což značí, že u nich k chirální separaci za daných podmínek nedochází. Pokud chirální separace

ofloxacinu závisí na interakci s DMEB, potom je překvapivé, že ani nejvíce strukturně podobné látky tuto separaci neposkytují. Pazufloxacin je ofloxacinu strukturně nejpodobnější, mají chirální centrum ve stejné poloze, liší se pouze postranním řetězcem. Kvůli neúspěšným separacím bylo dále pracováno pouze s ofloxacinem a pazufloxacinem.

5.4. Vliv koncentrace DMEB na selektivitu chirální separace enantiomerů ofloxacinu

Testování pokračovalo pokusy o zvýšení selektivity separace. Do používaných pufrů byl přidán organický modifikátor. Nejprve bylo do testovaných pufrů přidáno 10 % (v/v), později 20 % MeOH. Samotným přidáním MeOH se zvýšilo rozlišení, jak můžeme vidět v tabulce 10. Zároveň díky organickému modifikátoru mohlo být v BGE rozpuštěno větší množství DMEB; bez něj se nedalo dosáhnout vyšší koncentrace než 25 mM. S 20 % MeOH v BGE bylo možné rozpustit DMEB až do koncentrace 50 mM.

Všechny tyto BGE byly testovány se standardem ofloxacinu. Porovnání analýz s 20mM borátovým pufrům o pH 9,0 s různým množstvím MeOH a DMEB můžeme vidět v tabulce 10. Rozlišení mezi píky enantiomerů ofloxacinu rostlo jak prostým přidáním organického modifikátoru, tak i se zvyšující se koncentrací DMEB. U všech níže zmíněných separací bylo pozorováno rozlišení až na základní linii ($R_S \geq 1,5$). Mígrační časy se vždy s přidavkem organického modifikátoru a s vyšší koncentrací DMEB prodlužovaly. Opakovatelnost ($n = 3$) byla počítána z μ_e . RSD se pohybovala do 0,19 %, což značí dobrou opakovatelnost μ_e .

Tabulka 10: Chirální separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), v různé dny, v níže specifikovaných BGE, napětí -30 kV, n = 3

	A	B	C	D	E
t_{EOF} (min)	1,74	2,15	2,28	2,75	2,97
t_R (min)	3,32	3,80	4,32	4,37	5,27
t_S (min)	3,36	3,86	4,38	4,46	5,36
$\mu_{e(R)}$ (cm ² /Vs)	2,96×10 ⁻⁴	2,18×10 ⁻⁴	2,24×10 ⁻⁴	1,45×10 ⁻⁴	1,58×10 ⁻⁴
$\mu_{e(S)}$ (cm ² /Vs)	3,00×10 ⁻⁴	2,23×10 ⁻⁴	2,27×10 ⁻⁴	1,5×10 ⁻⁴	1,62×10 ⁻⁴
N_R	401 760	395 916	729 408	306 223	648 747
N_S	215 597	226 014	489 983	199 099	470 362
R_S	1,60	2,20	2,71	2,50	3,32
SD_R (cm ² /Vs)	6,83×10 ⁻⁸	2,67×10 ⁻⁷	1,11×10 ⁻⁷	2,13×10 ⁻⁷	2,93×10 ⁻⁷
RSD_R (%)	0,02	0,12	0,05	0,15	0,18
SD_S (cm ² /Vs)	4,98×10 ⁻⁸	2,62×10 ⁻⁷	1,04×10 ⁻⁷	2,05×10 ⁻⁷	3,09×10 ⁻⁷
RSD_S (%)	0,02	0,12	0,05	0,14	0,19

A: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 25 mM DMEB (11/4/19); B: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 25 mM DMEB + 10 % MeOH (9/5/19); C: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 45 mM DMEB + 10 % MeOH (9/5/19); D: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 25 mM DMEB + 20 % MeOH (15/5/19); E: 20mM borátový pufr o pH 9,0 + 50 mM DMEB + 20 % MeOH (15/5/19); SD_R – směrodatná odchylka $\mu_{e(R)}$, RSD_R – relativní směrodatná odchylka $\mu_{e(R)}$, analogicky pro SD_S a RSD_S

V tabulce 11 můžeme vidět obdobné hodnoty získané analýzou s 20mM trizmovým pufrům o pH 8,5 a různým množstvím MeOH a DMEB. Hodnoty rozlišení jsou pro téměř všechny BGE se stejným množstvím MeOH a DMEB vyšší s použitím trizmového pufru. Časy analýz jsou srovnatelné. Z důvodu nejvyššího rozlišení, byl poslední BGE, tj. 20mM

trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % MeOH a 50 mM DMEB, vybrán pro ověření linearity (kapitola 5.5). Příslušný elektroferogram můžeme vidět na obrázku 11.

Tabulka 11: Chirální separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), v různé dny, v níže specifikovaných BGE, napětí -30 kV, n = 3

	A	B	C	D	E
t_{EOF} (min)	1,64	2,14	2,22	2,76	2,98
t_R (min)	2,95	3,63	3,93	4,24	5,10
t_S (min)	2,99	3,69	4,00	4,33	5,20
$\mu_{e(R)}$ (cm ² /Vs)	2,91×10 ⁻⁴	2,07×10 ⁻⁴	2,12×10 ⁻⁴	1,37×10 ⁻⁴	1,51×10 ⁻⁴
$\mu_{e(S)}$ (cm ² /Vs)	2,95×10 ⁻⁴	2,12×10 ⁻⁴	2,17×10 ⁻⁴	1,42×10 ⁻⁴	1,55×10 ⁻⁴
N_R	200 360	265 310	555 076	377 786	784 430
N_S	813 049	138 490	415 589	190 780	557 368
R_S	1,75 ± 0,02	2,02 ± 0,15	2,80 ± 0,10	2,58 ± 0,02	3,70 ± 0,05
SD_R (cm ² /Vs)	7,32×10 ⁻⁷	5,68×10 ⁻⁷	7,22×10 ⁻⁷	2,43×10 ⁻⁷	2,22×10 ⁻⁷
RSD_R (%)	0,25	0,27	0,34	0,18	0,15
SD_S (cm ² /Vs)	8,31×10 ⁻⁷	5,57×10 ⁻⁷	7,15×10 ⁻⁷	2,63×10 ⁻⁷	2,04×10 ⁻⁷
RSD_S (%)	0,28	0,26	0,33	0,19	0,13

A: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 25 mM DMEB (2/5/19), B: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 10 % MeOH + 25 mM DMEB (9/5/19), C: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 10 % MeOH + 35 mM DMEB (9/5/19), D: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % MeOH + 25 mM DMEB (15/5/19), E: 20mM trizmový pufr pH o 8,5 + 20 % MeOH + 50 mM DMEB (15/5/19); SD_R – směrodatná odchylka $\mu_{e(R)}$, RSD_R – relativní směrodatná odchylka $\mu_{e(R)}$, analogicky pro SD_S a RSD_S

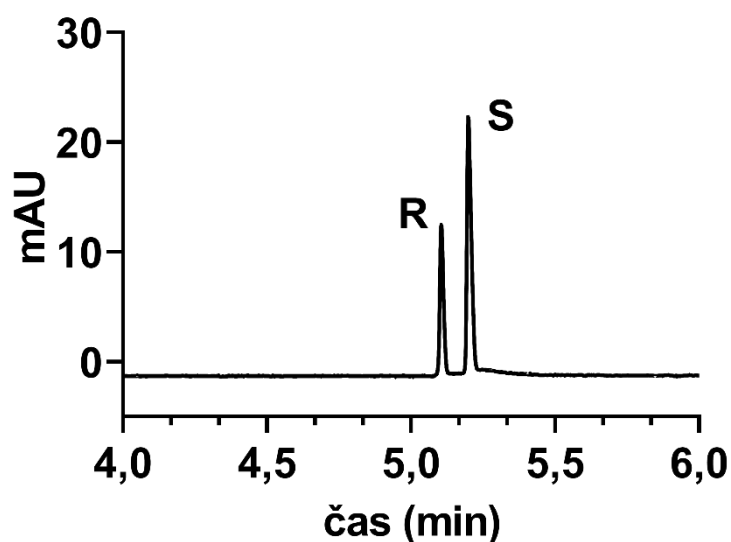
Separáčnı́ systémy se BGE na bázi trizmových a borátových pufrů vykazovaly vyšší separáčnı́ účinnost než pufr fosfátový, jak můžeme vidět v tabulce 12, separace v těchto pufrch jsou zároveň rychlejší. Pro další vývoj metody tak bylo pracováno pouze s trizmovým a borátovým pufrem.

Tabulka 12: Chirální separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), v níže specifikovaných BGE, $n = 3$

	t_{EOF} (min)	t_R (min)	t_S (min)	N_R	N_S	R_S
P	4,74	7,70	7,94	109 452	103 001	2,89 ± 0,61
T	2,22	3,93	4,00	555 076	415 589	2,80 ± 0,10
B	2,23	4,10	4,16	504 574	322 534	2,38 ± 0,13

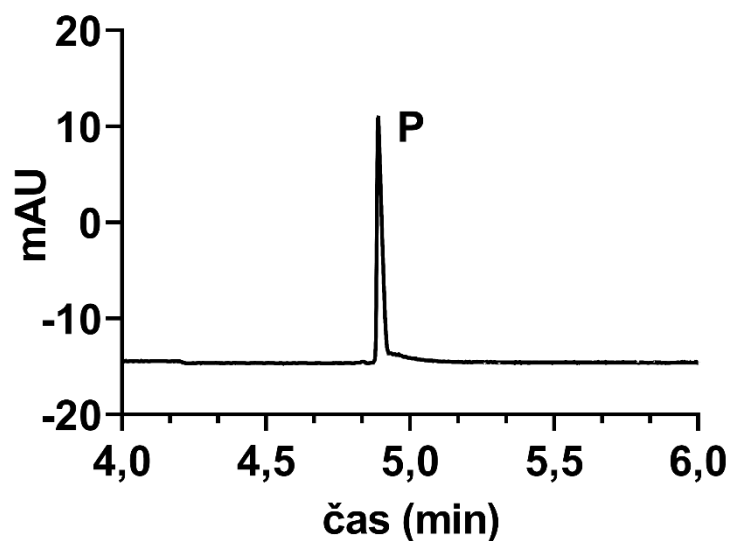
BGE: P = 50mM fosfátový pufr o pH 7,5; T = 20mM trizmový pufr o pH 8,5; B = 20mM borátový pufr o pH 9,0; vždy s přidavkem 10 % MeOH a 35 mM DMEB

S přidavkem 20 % MeOH do trizmového a borátového pufru byly připraveny také BGE o koncentraci 75 mM DMEB. Ovšem při této koncentraci se DMEB rozpouštěl špatně a při kratším stání opět krystalizoval, tudíž s tímto BGE dále nebylo pracováno.



Obrázek 11: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 50 mM DMEB + 20 % MeOH; UV detekce při 291 nm, napětí -30kV

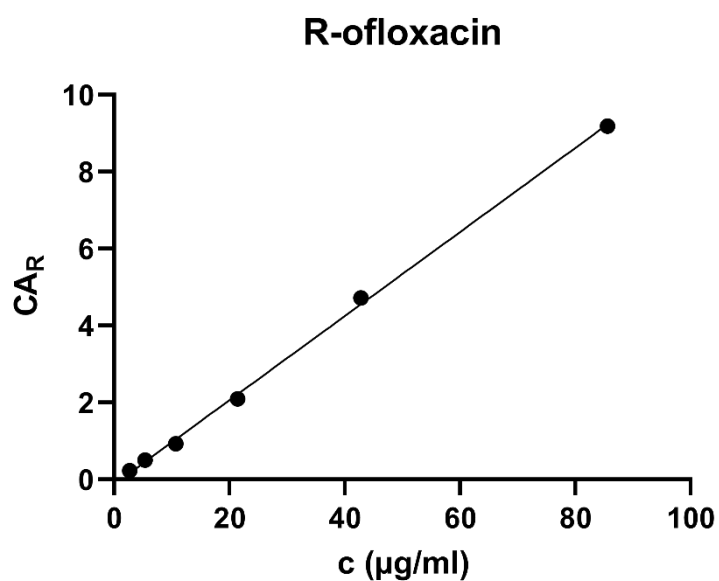
BGE s přidavkem organického modifikátoru a vyšší koncentrací DMEB byly použity také pro analýzy s roztokem racemického pazufloxacinu. Za těchto podmínek opět k chirální separaci nedošlo (viz obrázek 12).



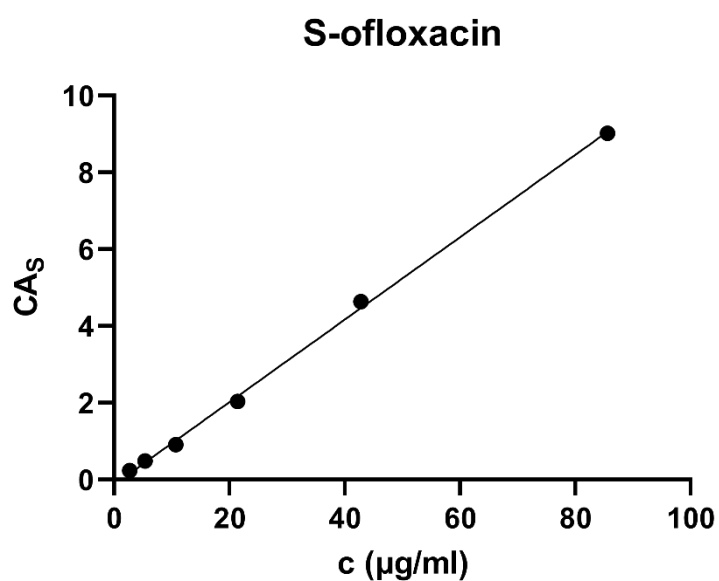
Obrázek 12: Elektroferogram separace pazufloxacinu (koncentrace 60 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 50 mM DMEB + 20 % MeOH; UV detekce při 245 nm, napětí -30kV

5.5. Ověření linearity

Chirální separace za podmínek 20mM trizmového pufru s 20 % MeOH a 50 mM DMEB poskytovala vysokou účinnost ($N_R = 784430$, $N_S = 557368$), dobré rozlišení ($3,70 \pm 0,05$) a v rámci jedné sekvence i dobrou opakovatelnost ($RSD_R = 0,15 \%$, $RSD_S = 0,13 \%$) a proto byla za těchto podmínek také ověřena linearita této separace. Kalibrační roztoky byly použity o koncentracích od 5 do 160 $\mu\text{g/ml}$ racemického ofloxacinu (4.6.7). Na obrázcích 13 a 14 můžeme vidět kalibrační křivky pro jednotlivé izomery. Pro vyhodnocení byly použity korigované plochy (CA) pro dosažení lepší opakovatelnosti, kvůli kolísání pohyblivosti EOF. CA se počítají vydělením plochy píku migračním časem. Rovnice přímek a korelační koeficienty jsou uvedeny v tabulce 13. Jelikož byly hodnoty korelačních koeficientů $\geq 0,99$, tak lze konstatovat, že byla prokázána linearita této metody v daném rozsahu.



Obrázek 13: Kalibrační křivka pro R-ofloxacin

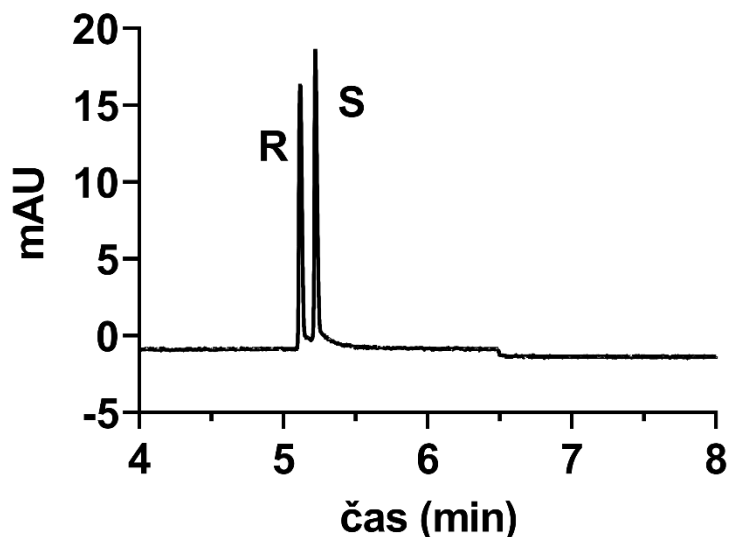


Obrázek 14: Kalibrační křivka pro S-ofloxacin

Tabulka 13: Rovnice přímky a korelační koeficient pro jednotlivé enantiomery ofloxacinu

	Rovnice přímky	R ²
R-ofloxacin	$y = 0,1093x - 0,1251$	0,9990
S-ofloxacin	$y = 0,1074x - 0,1266$	0,9988

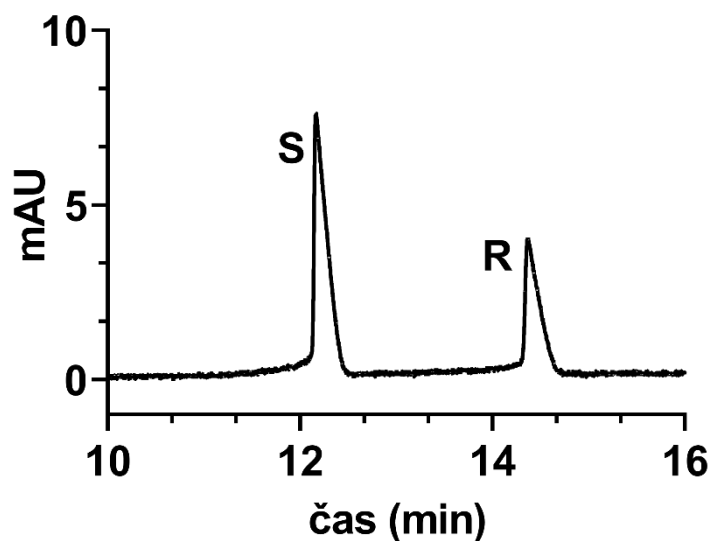
Na obrázku 15 můžeme vidět elektroferogram z analýzy kalibračního roztoku na koncentrační hladině 40 $\mu\text{g/ml}$. U obou píků je viditelné chvostování, a zároveň dochází i ke zvýšení základní linie, což stěžuje integraci a tím i následnou kvantifikaci.



Obrázek 15: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 50mM DMEB + 20 % MeOH

5.6. Regenerace kapiláry po použití DMEB

Po mnohých separacích s DMEB bylo nutné ověřit, zda DMEB pokryje vnitřní povrch kapiláry nenávratně či ho lze po separaci z vnitřního povrchu odstranit. Proto bylo vyzkoušeno promytí kapiláry 10 minut 20% MeOH, 30 minut 1M NaOH, 30 minut 0,1M NaOH a nakonec 30 minut H_2O . Následně byla provedena separace enantiomerů ofloxacinu v již dříve publikovaném separačním systému s chirálním selektorem sulfatovaným β -cyklodextrinem (β -CD). Jako BGE byl použit 50mM fosfátový pufr o pH 2,5 s 30 mg/ml sulfatovaného β -CD. Analyzován byl již dříve používaný roztok R- a S-ofloxacinu v poměru 1:2 [30]. Za těchto podmínek jako první migruje S-izomer (viz obrázek 16).



Obrázek 16: separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$) dle [30], BGE: 50mM fosfátový pufr o pH 2,5 s 30 mg/ml sulfatovaného β -CD, napětí -20kV , detekce při 291 nm

V následující tabulce je tato separace porovnána s výsledky uvedenými v DP Mgr. Veroniky Mrázové [1], která k měření využívala stejný přístroj a stejné délky kapilár.

Tabulka 14: Porovnání separací ofloxacinu dle protokolu ve zdroji [30] provedených Mgr. Veronikou Mrázovou (VM) [1] a v rámci této DP (KM), $n = 3$

	Analyt	t_m (s)	μ_a (cm^2/Vs)	N	SD	RSD (%)	R_s
VM	levofloxacin	641,4	$-1,01 \times 10^{-4}$	148 682	30,52	4,76	7,70
KM	levofloxacin	739,8	$-1,32 \times 10^{-4}$	36 390	9,42	1,27	8,40
VM	R-ofloxacin	721,8	$-0,90 \times 10^{-4}$	195 282	38,53	5,34	
KM	R-ofloxacin	875,4	$-1,11 \times 10^{-4}$	43 388	13,15	1,50	

Separace je pomalejší v porovnání se zdrojem [1], má nižší účinnost, ale poskytuje lepší opakovatelnost. SD a RSD byly počítány z t_m (s).

Díky této analýze bylo zjištěno, že kapiláru lze vyčistit od zbytků DMEB a nedochází k nevratné interakci DMEB s vnitřním povrchem kapiláry. Na základě tohoto zjištění byl na začátek promývání mezi analýzami přidán krok promývání po dobu 2 minut 20% MeOH, aby byl vždy povrch kapiláry vyčištěn od DMEB.

5.7. Vliv charakteru organického modifikátoru a jeho koncentrace na selektivitu

V druhé části experimenty se separací enantiomerů ofloxacinu pokračovaly pokusy o zvýšení rozlišení a separační účinnosti. Nejprve byly připraveny BGE s vyšším obsahem MeOH, aby mohly být připraveny BGE s vyšší koncentrací DMEB. Při zvýšení koncentrace MeOH na 50 % v BGE se DMEB rozpouštěl dobře, bylo možné dosáhnout koncentrace alespoň 80 mM DMEB, ovšem chirální separace neproběhla. Je možné, že nebyla v tomto prostředí překročena CMC a nedošlo tak ke tvorbě micel. Ofloxacin při koncentraci 50 a 60 mM DMEB migroval jako záporně nabitý ion před EOF. Při vyšší koncentraci DMEB nebyl pík ofloxacinu vidět – nejspíše došlo k jeho spojení s píkem EOF. K překročení CMC by byla potřeba vyšší koncentrace DMEB, ovšem v této fázi již byly spotřeby iontové kapaliny vysoké, a tak se v tomto směru nepokračovalo.

Od experimentů s MeOH se upustilo a na základě rešerše se rozhodlo o záměně organického modifikátoru na ACN, který je uváděn v USP jako rozpouštědlo u zkoušek levofloxacinu [25]. Dalším důvodem změny organického modifikátoru bylo chvostování píků v prostředí MeOH.

Byly připraveny nové BGE s přídavkem ACN místo MeOH, s ACN byl zároveň připravován i roztok ofloxacinu. Pro další testování byl z časových důvodů vybrán pouze 20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % ACN, protože BGE na bázi trizmového pufru prozatím poskytoval nejlepší účinnost separace a rozlišení.

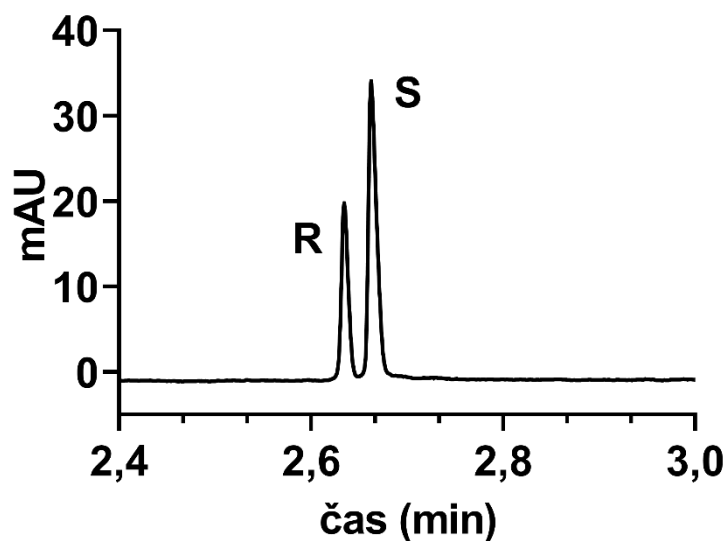
Při přípravách BGE bylo pozorováno, že se DMEB v ACN rozpouští mnohem lépe než v BGE s přídavkem MeOH, což poskytuje větší potenciál pro další zvyšování koncentrace CIL. Zároveň změnou organického modifikátoru nedošlo ke změně selektivity, tj. pořadí migrace jednotlivých enantiomerů zůstalo zachováno (viz obrázky 15 a 17).

V tabulce 15 můžeme vidět porovnání separací provedených se stejnou koncentrací DMEB a rozdílnými organickými modifikátory. Separace A proběhla o rok dříve než ostatní a bylo zde dosaženo při stejných podmínkách rozlišení 3,70; což se později nepovedlo zcela zopakovat. Hodnoty migračních časů a efektivní pohyblivosti jsou srovnatelné při použití MeOH jako organického modifikátoru. Separace s použitím ACN je rychlejší, rozlišení se výrazně zhoršilo, ale stále dosahuje na základní linii ($R_S \geq 1,5$). Symetrie píků s použitím ACN v BGE je příznivější, což můžeme vidět na obrázku 17.

Tabulka 15: Porovnání separací pro různé organické modifikátory, separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml), v níže uvedených BGE, napětí -30 kV, detekce při 291 nm, n = 3

	A	B	C	D	E	F
t_{EOF} (min)	2,98	3,00	2,97	2,99	2,09	2,09
t_R (min)	5,10	5,00	5,03	5,03	2,73	2,63
t_S (min)	5,20	5,10	5,10	5,13	2,77	2,65
$\mu_{e(R)}$ (cm²/Vs)	1,51×10 ⁻⁴	1,44×10 ⁻⁴	1,49×10 ⁻⁴	1,46×10 ⁻⁴	1,22×10 ⁻⁴	1,05×10 ⁻⁴
$\mu_{e(S)}$ (cm²/Vs)	1,55×10 ⁻⁴	1,48×10 ⁻⁴	1,51×10 ⁻⁴	1,50×10 ⁻⁴	1,27×10 ⁻⁴	1,09×10 ⁻⁴
N_R	784 430	420 700	368 303	676 338	592 982	619 164
N_S	557 368	307 824	212 832	409 007	399 346	448 445
R_S	3,70	2,77	2,47	3,38	2,03	1,90
SD_R (cm²/Vs)	2,22×10 ⁻⁷	1,15×10 ⁻⁶	3,91×10 ⁻⁷	7,18×10 ⁻⁷	1,08×10 ⁻⁶	1,24×10 ⁻⁶
RSD_R (%)	0,15	0,80	0,26	0,49	0,88	1,18
SD_S (cm²/Vs)	2,04×10 ⁻⁷	1,10×10 ⁻⁶	2,45×10 ⁻⁶	8,17×10 ⁻⁷	1,18×10 ⁻⁶	1,20×10 ⁻⁶
RSD_S (%)	0,13	0,74	1,62	0,54	0,93	1,10

A = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % MeOH + 50 mM DMEB (15/5/19), B = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % MeOH + 50 mM DMEB (18/8/20), C = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % MeOH + 50 mM DMEB (19/8/20), D = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % MeOH + 50 mM DMEB (20/8/20), E = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50 mM DMEB (19/8/20), F = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50 mM DMEB (7/9/20)



Obrázek 17: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50 mM DMEB (F), napětí -30kV , detekce při 291 nm

Elektroferogram k podmínkám A se nachází v kapitole 5.4. (obrázek 11).

5.8. Vliv prodloužení délky kapiláry

Jelikož lze rozlišení snadno ovlivnit i změnou délky separační kapiláry, tak bylo dalším postupem její prodloužení na 80,5 cm celkové a 72 cm efektivní délky. Delší kapilára byla zároveň i jiné šarže než kapilára kratší. Při prodloužení kapiláry musíme počítat s delším časem potřebným pro promývání i pro samotné separace, ale jelikož původní separace probíhaly velmi rychle, prodloužení analýz nebylo příliš omezující.

Časy promývání byly přepočteny pomocí softwaru Beckman CE Expert na 6 minut 20% ACN, 6 minut 0,1M H_3PO_4 , 6 minut H_2O a 8 minut BGE. Promývání bylo prodlouženo tak, aby objem kapiláry byl vyměněn minimálně třikrát.

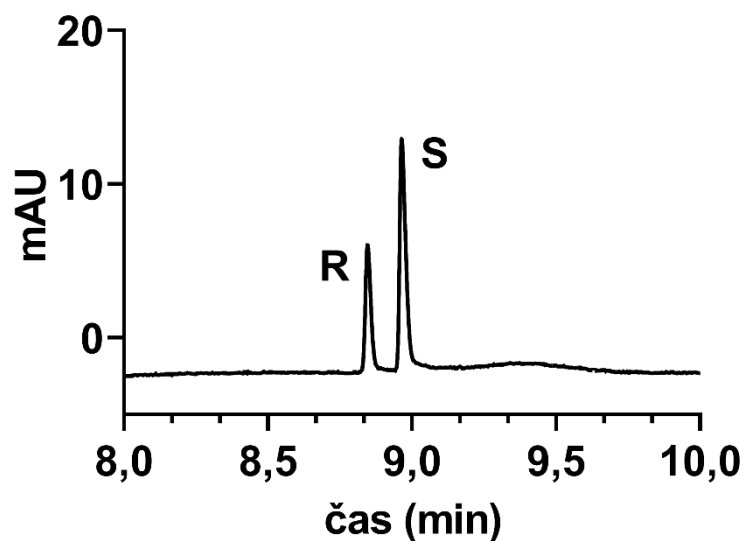
V tabulce 16 je uvedeno porovnání separace se stejným BGE v různě dlouhých kapilárách (A/B) a pro různé koncentrace DMEB v delší kapiláře (B/C). Prodloužením kapiláry došlo k výraznému prodloužení času separace (přibližně 3-4x). Se stejným BGE se μ_e výrazně neliší, což je v souladu s teoretickými předpoklady. Z výsledků je patrné, že stále pokračuje trend zlepšování rozlišení s vyšší koncentrací DMEB. Opakovatelnost na delší kapiláře ($\text{RSD}_s = 1,38\%$) je mírně horší než na kapiláře kratší ($\text{RSD}_s = 0,93\%$).

Tabulka 16: Porovnání separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 µg/ml, S-ofloxacinu 40 µg/ml) pro různé délky kapiláry, v níže uvedených BGE, napětí -30 kV, detekce při 291 nm, n = 3

	A	B	C
t_{EOF} (min)	2,09	6,78	7,28
t_R (min)	2,73	8,84	11,00
t_S (min)	2,77	8,96	11,17
$\mu_{e(R)}$ (cm ² /Vs)	1,22×10 ⁻⁴	1,11×10 ⁻⁴	1,49×10 ⁻⁴
$\mu_{e(S)}$ (cm ² /Vs)	1,27×10 ⁻⁴	1,16×10 ⁻⁴	1,54×10 ⁻⁴
N_R/m	1 482 455	1 448 374	1 798 486
N_S/m	998 365	1 193 671	1 610 638
R_S	2,03	3,23	4,39
SD_R (cm ² /Vs)	1,08×10 ⁻⁶	1,58×10 ⁻⁶	1,61×10 ⁻⁶
RSD_R (%)	0,88	1,42	1,08
SD_S (cm ² /Vs)	1,18×10 ⁻⁶	1,60×10 ⁻⁶	1,99×10 ⁻⁶
RSD_S (%)	0,93	1,38	1,29

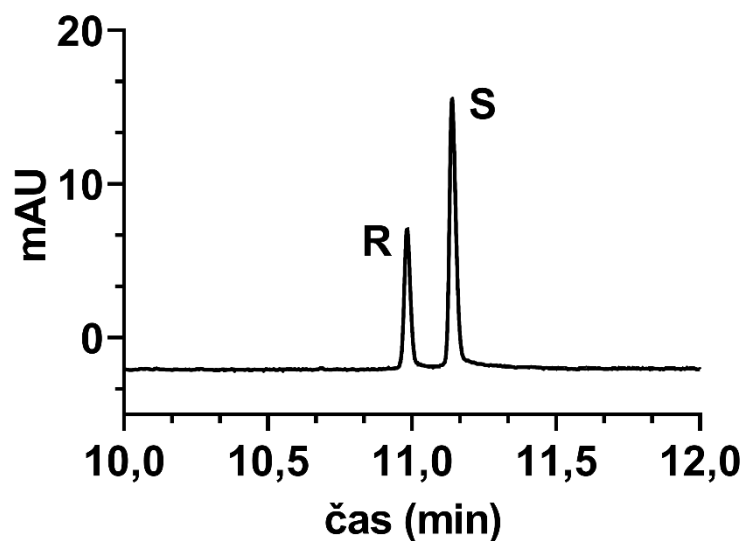
A = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50 mM DMEB, kapilára 48,5/40 cm,
 B = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50 mM DMEB, kapilára 80,5/72 cm,
 C = 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 75 mM DMEB, kapilára 80,5/72 cm

Na obrázku 18 je pro porovnání uveden elektroferogram separace v delší kapiláře, za jinak stejných podmínek jako elektroferogram předchozí (obrázek 17). S prodloužením kapiláry se za těchto podmínek objevilo mírné chvostování píků a kolísání základní linie.



Obrázek 18: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace *R*-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, *S*-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 50mM DMEB, napětí -30kV , detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm

V dalším kroku byla ještě zvýšena koncentrace DMEB na 100 mM, elektroferogram separace za těchto podmínek můžeme vidět na obrázku 19. Při této analýze nebylo pozorováno zvednutí základní linie a chvostování píků nebylo tak výrazné. Rozlišení mezi píky *R*-ofloxacinu (20 $\mu\text{g/ml}$) a *S*-ofloxacinu (40 $\mu\text{g/ml}$) bylo 3,9. Tyto podmínky byly následně vybrány pro ověření linearity. Za těchto podmínek byl také testován roztok standardu racemického pazufloxacinu, u kterého opět nebyl pozorován ani náznak separace na jednotlivé enantiomery.



Obrázek 19: Elektroferogram separace ofloxacinu (koncentrace R-ofloxacinu 20 $\mu\text{g/ml}$, S-ofloxacinu 40 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV , detekce při 291 nm, delší kapilára 80,5/72 cm

Souhrn optimalizovaných podmínek pro separaci enantiomerů ofloxacinu

Kapilára: křemenná, 50 μm id, 80,5/72 cm

BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB

Promývání před analýzou: 6 minut 20% ACN, 6 minut 0,1 M H_3PO_4 , 6 minut H_2O , 8 minut BGE

Promývání po ukončení sekvence: 10 minut MeOH, 10 minut H_3PO_4 , 10 minut 0,1 M NaOH, 10 minut H_2O

Délka analýzy: 15 minut

Napětí: -30 kV

Dávkování: hydrodynamické při 50 mbar po dobu 5 sekund

UV detekce: 291 nm

Teplota kapiláry: 25 $^\circ\text{C}$

Indukovaný proud: 40 μA

5.9. Ověření linearity za optimálních podmínek a analýza léčivých přípravků s obsahem levofloxacinu

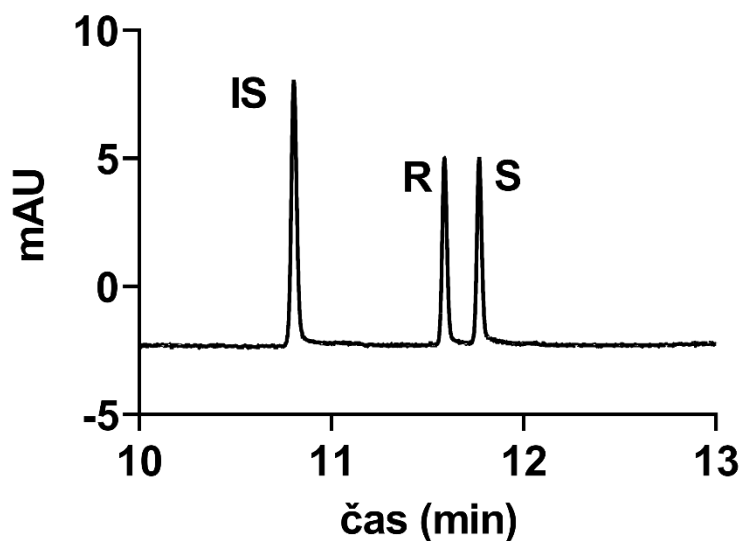
Postupnou optimalizací byl vybrán již zmíněný BGE (20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB) k ověření linearity a k analýze léčivých přípravků s obsahem levofloxacinu. Z léčivých přípravků byly vybrány tablety Levofloxacin Mylan 500 mg a oční kapky Oftaquix 5 mg/ml, roztok.

Tablety bylo potřeba suspendovat, aby došlo k rozpuštění levofloxacinu a výslednou směs bylo třeba přefiltrovat a naředit (viz kapitola 4.7.1). U očních kapek byla příprava vzorku méně náročná, protože byly jen naředěny (viz kapitola 4.7.2). U těchto reálných vzorků bylo cílem vyzkoušet, zda by šla metoda použít pro stanovení obsahu levofloxacinu jako hlavní účinné látky.

Za těchto podmínek byly naměřeny dvě kalibrační křivky, k první byl do sekvence připojen vzorek z tablet, ke druhé vzorek z očních kapek. U těchto vzorků bylo pomocí kalibrační křivky kvantifikováno, zda je deklarovaný obsah účinné látky v požadovaném rozmezí (90-110 % nominálního obsahu dle USP [25]). Linearita byla ověřena pomocí 7 kalibračních roztoků (koncentrace 10-100 $\mu\text{g/ml}$ pro jednotlivé izomery) připravených ze standardu racemického ofloxacinu. Zároveň byl do každého kalibračního roztoku a vzorku přidán IS gatifloxacin v takovém množství, aby jeho konečná koncentrace byla 40 $\mu\text{g/ml}$. IS byl vybrán z již použitých chinolonových antibiotik tak, aby při 291 nm dostatečně absorboval, měl podobný čas migrace jako enantiomery ofloxacinu, ale aby zároveň byly píky dostatečně oddělené. Byl vybrán gatifloxacin, který všem podmínkám vyhověl, a zároveň nedošlo k separaci jeho enantiomerů.

Vyhodnocení proběhlo s využitím vnitřního standardu. Na osu x byly naneseny koncentrace konkrétního izomeru, na osu y korigovaná plocha izomeru dělená korigovanou plochou vnitřního standardu $CA_{(S)}/CA_{(IS)}$. Z rovnice přímky *S*-ofloxacinu byly vypočteny koncentrace ve vzorcích léčivých přípravků.

Na obrázku 20 můžeme vidět elektroferogram separace kalibračního roztoku ofloxacinu o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$. Za těchto podmínek bylo dosaženo rozlišení $4,22 \pm 0,02$ ($n = 3$).



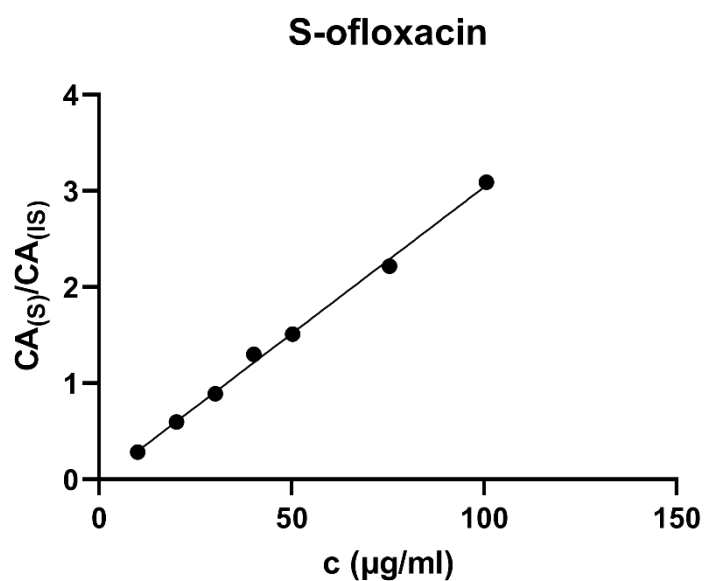
Obrázek 20: Elektroferogram separace gatifloxacinu (40 µg/ml) a racemického ofloxacinu (40 µg/ml), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV, detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm

Jelikož hodnoty korelačních koeficientů byly u obou naměřených křivek vyšší než 0,99 (viz tabulka 17), tak byla prokázána linearita CE metody v daném rozsahu.

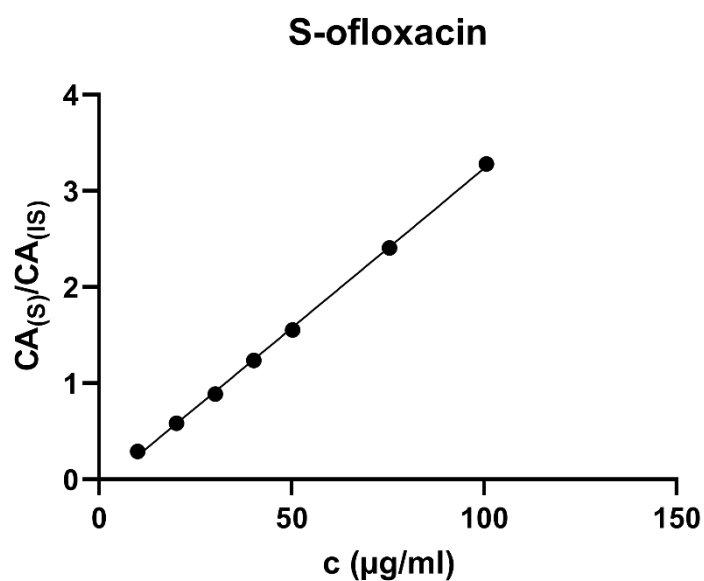
Tabulka 17: Rovnice přímky a korelační koeficient S-ofloxacinu pro obě výše zmíněné kalibrační křivky

	rovnice přímky	R ²
Kalibrační křivka pro stanovení tablet (č. 2)	$y = 0,0305x - 0,0107$	0,9975
Kalibrační křivka pro stanovení očních kapek (č. 3)	$y = 0,0332x - 0,0870$	0,9993

Na obrázcích 21 a 22 můžeme vidět obě zmíněné kalibrační křivky.



Obrázek 21: Kalibrační křivka S-ofloxacinu pro stanovení tablet, BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV, detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm



Obrázek 22: Kalibrační křivka S-ofloxacinu pro stanovení očních kapek, BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV, detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm

5.9.1. Stanovení levofloxacinu ve vzorku tablet Levofloxacin Mylan 500 mg

Vzorky z tablet byly připraveny celkem tři, z toho každý byl proměřen třikrát, celkem tedy proběhlo devět analýz. Úpravou rovnice přímky z tabulky 17 byla získána rovnice (5-1), podle které byla vypočtena koncentrace levofloxacinu v roztoku vzorku.

$$x = \frac{y + 0,0107}{0,0305} \quad (5-1)$$

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 18. Vzorek levofloxacinu byl vždy naředěn na koncentraci přibližně 40 µg/ml.

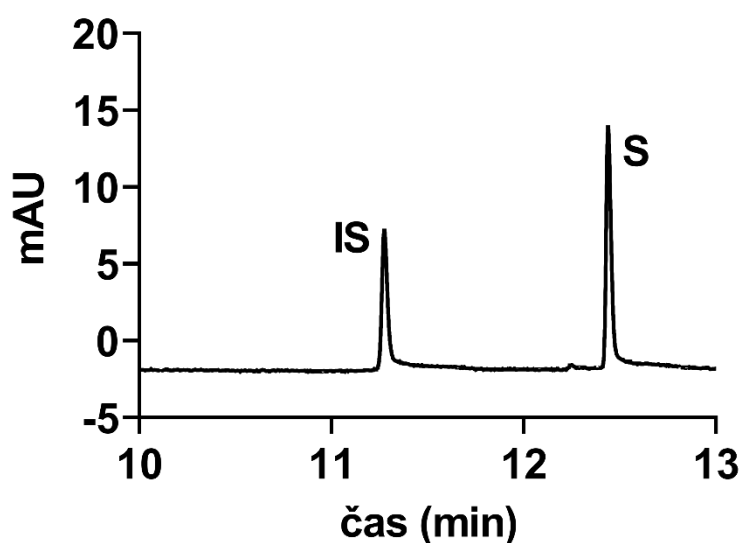
Tabulka 18: Výsledky CE stanovení levofloxacinu ve vzorku tablet Levofloxacin Mylan 500 mg, $n = 3$

	Stanovená koncentrace (µg/ml)	Deklarovaná koncentrace (µg/ml)	%
Vzorek č. 1	41,94	40,04	104,75
Vzorek č. 2	39,92	39,90	100,05
Vzorek č. 3	38,04	39,85	95,46
		průměr	100,09
		SD	4,64
		RSD	4,64

Všechny naměřené hodnoty se vešly do předepsaného rozmezí 90-110 %, ovšem hodnota RSD je příliš velká, což značí nedostatečnou přesnost metody. Ta nejspíše vznikla tím, že vnitřní standard byl přidán až po extrakci levofloxacinu z tablety. Proto by měl být postup přípravy vzorku pro CE analýzu dále optimalizován. Příprava byla provedena tímto způsobem, jelikož gatifloxacinu bylo pouze omezené množství a přidáním na začátku extrakce by se značně zvýšila jeho spotřeba. Nepřesnost mohla být také způsobena nedostatečnou homogenizací nadrcené tabletoviny, což mohlo vést k tomu, že pro stanovení nebyl odebrán reprezentativní vzorek. Dle USP se vzorek z tablet získává suspendováním minimálně pěti tablet ve 20% ACN. Suspenze se nechá stát 15 minut, poté se 30 minut intenzivně míchá, a nakonec se přefiltruje přes vhodný filtr. Takto se připravuje zásobní roztok o koncentraci 5 mg/ml, který se dále ředí 20% ACN na pracovní

roztok o koncentraci 0,2 mg/ml. Ten je následně analyzován pomocí chirální HPLC založené na výměně ligandů [25]. Jedna z výhod CE je nízká spotřeba organických rozpouštědel a při přípravě vzorku z tablet dle USP by vzniklo velké množství odpadu s organickými rozpouštědly, proto byla úprava vzorku minimalizována, tj. vzorek byl připraven pouze z jedné tablety a suspendována byla jen její část.

Na obrázku 23 můžeme vidět elektroferogram separace vzorku levofloxacinu z tablet a na obrázku 21 kalibrační křivku pro jeho stanovení.



Obrázek 23: Elektroferogram separace vzorku z tablety levofloxacinu (přibližná koncentrace 40 µg/ml), IS gatifloxacin (40 µg/ml), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV, detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm

5.9.2. Stanovení levofloxacinu ve vzorku očních kapek Oftaquix 5 mg/ml

Vzorky z očních kapek byly připraveny dva, každý byl proměřen třikrát, celkem tedy proběhlo šest analýz. Pro hodnocení očních kapek byla použita další kalibrační křivka. Úpravou rovnice přímky z tabulky 17 byla získána rovnice (5-2), podle které byla vypočtena koncentrace levofloxacinu ve vzorku.

$$x = \frac{y + 0,087}{0,0332} \quad (5-2)$$

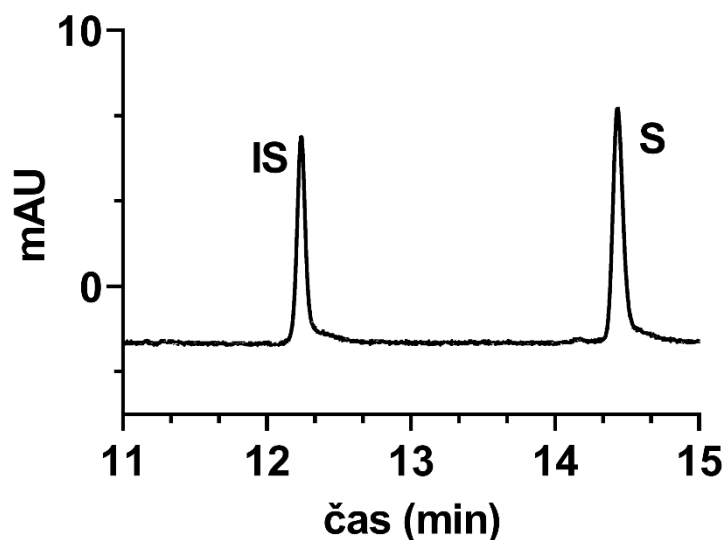
Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 19. Vzorek levofloxacinu byl vždy podle deklarovaného množství naředěn na koncentraci 40,00 µg/ml.

Tabulka 19: Výsledky CE stanovení levofloxacinu ve vzorku očních kapek Oftaquix 5 mg/ml, n = 3

	Stanovená koncentrace (µg/ml)	Deklarovaná koncentrace (µg/ml)	%
Vzorek č.1	36,99	40,00	92,47
Vzorek č.2	36,26	40,00	90,65
		průměr	91,56

Obsah levofloxacinu ve vzorku očních kapek byl naměřen u spodní hranice akceptovatelnosti. Výsledek stanovení mohl být ovlivněn přítomností pomocných látek (pufrovaný roztok soli) v léčivém přípravku, což mohlo negativně ovlivnit nadávkované množství analytu. Tato hypotéza by se musela ověřit například odsolením vzorku očních kapek extrakcí na tuhou fázi a porovnáním s výsledky získaných pouhým naředěním roztoku očních kapek.

Na obrázku 24 můžeme vidět elektroferogram separace vzorku levofloxacinu z očních kapek a na obrázku 22 kalibrační křivku pro jeho stanovení.



Obrázek 24: Elektroferogram separace vzorku z očních kapek levofloxacinu (koncentrace 40 µg/ml), IS gatifloxacin (40 µg/ml), BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 + 20 % ACN + 100 mM DMEB, napětí -30kV, detekce při 291 nm, kapilára 80,5/72 cm

6. Závěr

V této diplomové práci byly testovány různé podmínky pro chirální separace modelových analytů (ketoprofen, flurbiprofen, ofloxacin, pazufloxacin, gatifloxacin, lomefloxacin, tosufloxacin) za použití chirální iontové kapaliny (–)-N-dodecyl-N-methylephedrinium bromidu jako chirálního selektoru pro kapilární elektroforézu. Ze všech testovaných chirálních léčiv se podařilo rozseparovat pouze enantiomery ofloxacinu. Z testovaných parametrů byl klíčový vliv organických modifikátorů (MeOH, ACN), které poskytovaly vyšší selektivitu separace jen samotným přidáním do BGE, a také umožňovaly rozpuštění většího množství chirálního selektoru, což vedlo k dalšímu zlepšení chirální separace enantiomerů ofloxacinu.

Výsledné optimalizované podmínky byly dosaženy s použitím následujícího BGE: 20mM trizmový pufr o pH 8,5 s 20 % ACN a 100 mM DMEB. Za těchto podmínek byla dosažena hodnota rozlišení $4,22 \pm 0,02$ ($n = 3$). Linearita CE stanovení levofloxacinu byla ověřena v rozmezí koncentrací od 10 do 100 $\mu\text{g/ml}$ a následně byla metoda aplikována na vzorky léčivých přípravků s obsahem levofloxacinu. U analýz s reálnými vzorky šlo zejména o prokázání použitelnosti této metody pro využití ve farmaceutické analýze. Na základě získaných výsledků je třeba další optimalizace, a to zejména pro zvýšení přesnosti (vzorky tablet) či odstranění vlivu matrice (vzorky očních kapek). Tato metoda by následně mohla být možnou alternativou k HPLC stanovení levofloxacinu dle USP.

Je otázkou, zda by se metoda dala využít i pro stanovení nečistot v tabletách levofloxacinu, tedy zejména pro stanovení nežádoucího *R*-enantiomeru. Pro tyto účely by bylo pravděpodobně nutné zvýšení citlivosti a případně i zvýšení rozlišení, aby došlo k separaci na základní linii i v přítomnosti výrazného nadbytku levofloxacinu.

Také by mohl být proveden screening za různých podmínek uvedených v této DP pro více modelových chirálních léčiv. Studie Deye a kol. [20] byla bohužel nalezena až po ukončení experimentální práce. Jelikož autoři použili velmi podobné podmínky pro chirální separace NSAID jako v této DP, tak je otázkou, proč se v rámci této DP separace enantiomerů ketoprofenu a flurbiprofenu nepodařila. Z tohoto důvodu by měla být provedena separace za podmínek publikovaných Deyem a kol. s následným porovnáním s výstupy získanými v rámci této DP.

7. Seznam použité literatury

- [1] MRÁZOVÁ, V. *Testování potenciálního využití chirálních iontových kapalin s dlouhým řetězcem pro chirální separace v kapilární elektroforéze I.* Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie.
- [2] BUNKE, A., T. JIRA a T. BEYRICH. (–)-N-Dodecyl-N-ephedrinium bromide as chiral selector in capillary electrophoresis. *Pharmazie*. 1997, **52**(10), 762-764.
- [3] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [4] LAUER H. H., ROZING G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis. A Primer*. Second Edition, Agilent Technologies. 2014
- [5] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [6] PAZOUREK, J. *Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium*. Brno. 88 s.
- [7] GLYNN, J. R., B. M. BELONGIA, R. G. ARNOLD, K. L. OGDEN a J. C. BAYGENTS. Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(7), 2572-2577. doi:10.1128/AEM.64.7.2572-2577.1998
- [8] *Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII)*. 2. díl, Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [9] KRAIT, S., KONJARIA M. SCRIBA G. Advances of capillary electrophoresis enantioseparations in pharmaceutical analysis (2017–2020). *ELECTROPHORESIS*, 2021. doi:10.1002/elps.202000359
- [10] YU, R. B. a QUIRINO J. P. Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis: Trends During 2017–2018. *Molecules*, 2019, **24**(6), 1135. doi:10.3390/molecules24061135

- [11] FLIEGER, J., FEDER-KUBIS J. a TATARCZAK-MICHALEWSKA M. Chiral Ionic Liquids: Structural Diversity, Properties and Applications in Selected Separation Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(12), 4253 doi:10.3390/ijms21124253
- [12] WELTON, T. Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews*, 2018, **10**(3), 691-706. doi:10.1007/s12551-018-0419-2
- [13] PAYAGALA, T. a ARMSTRONG D. W. Chiral ionic liquids: A compendium of syntheses and applications (2005-2012). *Chirality*, 2012, **24**(1), 17-53. doi:10.1002/chir.21975
- [14] HO, T. D., ZHANG, C., HANTAO L. W. a ANDERSON J. L. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Analytical Chemistry*, 2013, **86**(1), 262-285. doi:10.1021/ac4035554
- [15] YU, R. B. a QUIRINO J. P. Ionic liquids in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2021, **1637**. doi:10.1016/j.chroma.2020.461801
- [16] CROITORU, Catalin a Ionut Claudiu ROATA. Ionic Liquids as Antifungal Agents for Wood Preservation. *Molecules*, 2020, **25**(18), 4289. doi:10.3390/molecules25184289
- [17] GREÑO, M., MARINA M. L. a CASTRO-PUYANA M. Enantioseparation by Capillary Electrophoresis Using Ionic Liquids as Chiral Selectors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2018, **48**(6), 429-446. doi:10.1080/10408347.2018.1439365
- [18] KAPNISSI-CHRISTODOULOU, C. P., STAVROU I. J. a MAVROUDI M. C. Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of Chromatography A*, 2014, **1363**, 2-10. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.059
- [19] DING, J., WELTON T. a ARMSTRONG D. W. Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(22), 6819-6822. doi:10.1021/ac049144c

- [20] DEY, J., MOHANTY A., ROY S. a KHATUA D. Cationic vesicles as chiral selector for enantioseparations of nonsteroidal antiinflammatory drugs by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1048**(1), 127-132 doi:10.1016/j.chroma.2004.07.029
- [21] PÁHI, A. B., VARGA D., KIRÁLY Z. a MASTALIR Á. Thermodynamics of micelle formation of the ephedrine-based chiral cationic surfactant DMEB in water, and the intercalation of DMEB in montmorillonite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, **319**(1-3), 77-83. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.06.056
- [22] HARTL, J. *Farmaceutická chemie IV. 2.*, nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2129-6.
- [23] BARTOŠOVÁ, D. *Infekční lékařství*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3791-1.
- [24] ALI, I., SUHAIL M. a ASNIN L. Chiral separation of quinolones by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 2017, **40**(14), 2863-2882. doi:10.1002/jssc.201700200
- [25] *The United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 39 - NF 34)*. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, 2015, ISSN 0195-7996.
- [26] *Český lékopis 2017 - Doplněk 2019 (ČL 2017 - Dopl. 2019): Pharmacopoea Bohemica MMXVII - Addendum MMXIX (Ph. B. MMXVII - Add. MMXIX)*. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-2531-9.
- [27] LIU, Y., ZHANG P, LI H., TANG R., CUI R. a WANG W. Photochemical properties and phototoxicity of Pazufloxacin: A stable and transient study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, **118**, 58-65. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.11.002
- [28] *Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII)*. 3. díl, Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.

[29] RÀFOLS, C., ROSÉS M. a BOSCH E. A comparison between different approaches to estimate the aqueous pKa values of several non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Analytica Chimica Acta*, 1997, **338**(1-2), 127-134. doi:10.1016/S0003-2670(96)00496-5

[30] SCRIBA, G. K. E. a JÁČ, P. Enantioseparations by Capillary Electrophoresis Using Cyclodextrins as Chiral Selectors. *Chiral Separations*. Humana Press, 2013, **970**, 271-287, Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-262-9. doi:10.1007/978-1-62703-263-6_17

[31] *Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII)*. 1. díl, Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.