

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK S
VYUŽITÍM KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH
METOD

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Hradec Králové 2008

Mgr. Pavel Jáč

Poděkování

- V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za odborné vedení mé dizertační práce, plodné diskuze, podporu mých aktivit a vřelý přístup po dobu celého postgraduálního studia.
- Dále bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc., že nás, postgraduální studenty na katedře analytické chemie, po celou dobu studia plně morálně podporoval a že nám byl vždy ochoten pozorně naslouchat.
- Nesmím opomenout také Doc. RNDr. Marii Pospíšilovou, CSc., která má velké zkušenosti s elektromigračními metodami, a vždy, když bylo potřeba, se velmi ochotně podělila o své know-how.
- Velký dík patří také mým přátelům a kolegům – doktorandům – na naší katedře, se kterými jsem zažil nezapomenutelné chvíle.
- Děkuji kolektivu katedry analytické chemie za příjemnou pracovní atmosféru.
- Nemírně vděčný jsem Prof. Dr. Gerhardu Scribovi, který mi umožnil pracovat v jeho týmu v rámci čtyřměsíční vědecké stáže na Univerzitě v Jeně.
- Závěrem bych chtěl poděkovat mým rodičům, bratrovi, švagrové a dalším rodinným příslušníkům za podporu během doktorandského studia.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, 11. 8. 2008

Seznam zkratek

| | |
|----------|--|
| ACN | acetonitril |
| AN | agregační číslo |
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | fotoionizace za atmosférického tlaku |
| AOT | bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný |
| BGE | základní elektrolyt |
| CCD | bezkontaktní vodivostní detekce |
| CD | cyklodextrin |
| CE | kapilární elektroforéza |
| CEC | kapilární elektrochromatografie |
| CMC | kritická micelární koncentrace |
| CTAB | cetyltrimethylammonium bromid |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| DAD | „diode array detector“ |
| DOE | „design of experiments“ |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DS | stupeň substituce |
| EDTA | ethylendiaminotetraoctová kyselina |
| EOF | elektroosmotický tok |
| EP | Evropský lékopis |
| ESI | ionizace elektrosprejem |
| FIA (FI) | průtokové metody |
| GC | plynová chromatografie |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina) |
| HEPPSO | N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-hydroxypropansulfonová kyselina) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonová kyselina |

| | |
|------------------|---|
| CHAPSO | 3-([3-cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propansulfonová kyselina |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| ID | vnitřní průměr |
| IT | iontová past |
| ITP | izotachoforéza |
| L | vedoucí elektrolyt |
| LC | kapalinová chromatografie |
| LIF | laserem indukovaná fluorescence |
| LOD | limit detekce |
| LOQ | limit kvantifikace |
| MALDI | ionizace laserem za účasti matrice |
| MeOH | methanol |
| MES | 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina |
| MEEKC | mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie |
| MEKC | micelární elektrokinetická kapilární chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NACE | elektroforéza v nevodném prostředí |
| NMF | N-methylformamid |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| OD | vnější průměr |
| pH* | zdánlivé pH |
| pI | isoelektrický bod |
| pKa | ionizační konstanta |
| pK _{AU} | autoprotolytická konstanta |
| PTFE | polytetrafluoroethylen |
| Q | kvadrupól |
| QqQ | trojitý kvadrupól |
| RP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |

| | |
|----------|--|
| RSM | response surface modelling |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného |
| SPE | extrakce na pevnou fázi |
| S/N | poměr signálu k šumu |
| SST | test vhodnosti systému |
| T | koncový elektrolyt |
| t-ITP | přechodná izotachoforéza |
| μ-TAS | „micro total analysis system“ |
| THF | tetrahydrofuran |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TTAB | tetradecyltrimethylammonium bromid |
| UV | ultrafialový (ve smyslu detekce) |
| UV-VIS | detekce v oblasti ultrafialové a viditelné části světla |
| USP | Americký lékopis |

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Poděkování | 2 |
| Seznam zkratk | 4 |
| Obsah | 7 |
| 1 Úvod..... | 10 |
| 2 Cíl práce | 12 |
| 3 Teoretická část..... | 13 |
| 3.1 <i>Instrumentální uspořádání</i> | 13 |
| 3.1.1 Separální kapilára | 13 |
| 3.1.2 Zdroj napětí..... | 15 |
| 3.1.3 Dávkování vzorku | 15 |
| 3.1.4 Detekční techniky používané v CE | 16 |
| 3.1.5 Elektroforéza na čipu | 24 |
| 3.2 <i>Rozdělení elektromigračních metod na základě mechanismu separace</i> | 27 |
| 3.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)..... | 27 |
| 3.2.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)..... | 34 |
| 3.2.3 Mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie (MEEKC) | 38 |
| 3.2.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC)..... | 39 |
| 3.2.5 Elektroforéza v nevodném prostředí (NACE)..... | 40 |
| 3.2.6 Kapilární izoelektrická fokusace..... | 42 |
| 3.2.7 Kapilární gelová elektroforéza | 44 |
| 3.2.8 Izotachoforéza (ITP) | 45 |
| 3.3 <i>Chirální separace</i> | 49 |
| 3.3.1 Provedení chirálních separací pomocí CE | 49 |
| 3.3.2 Chirální CEC..... | 53 |
| 3.4 <i>Tvorba komplexů za účelem zvýšení selektivity</i> | 54 |
| 3.5 <i>Vývoj a optimalizace elektroforetických metod</i> | 58 |
| 3.5.1 Účinnost a rozlišení..... | 58 |
| 3.5.2 Které separační podmínky se optimalizují? | 59 |
| 3.5.3 Univariantní vs. multivariantní optimalizace | 62 |
| 3.6 <i>Validace elektroforetických metod</i> | 66 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | Výsledková část - Komentář k publikovaným pracím..... | 74 |
| 4.1 | <i>Přehled publikovaných prací.....</i> | 74 |
| 4.2 | <i>Analýza polyfenolů pomocí kapilární elektroforézy.....</i> | 75 |
| 4.2.1 | Komentář k práci č. 1: „Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods“..... | 75 |
| 4.2.2 | Komentář k práci č. 2: „Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate“..... | 78 |
| 4.3 | <i>Využití kapilární elektroforézy ve farmaceutické analýze.....</i> | 79 |
| 4.3.1 | Komentář k práci č. 3: „Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the R-enantiomer“..... | 79 |
| 4.3.2 | Komentář k práci č. 4: „Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection“..... | 81 |
| 5 | Přílohy..... | 83 |
| 5.1 | <i>Publikované články.....</i> | 83 |
| 5.1.1 | Příloha 1: Jáč, P., Polášek, M., Pospíšilová, M.: Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods, J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 2006, 805-814. . | 83 |
| 5.1.2 | Příloha 2: Jáč, P., Polášek, M., Vaz Batista, A. I., Kaderová, L.: Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate, Electrophoresis 29, 2008, 843-851..... | 94 |
| 5.1.3 | Příloha 3: Sungthong, B., Jáč, P., Scriba, G. K. E.: Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the R-enantiomer, J. Pharm. Biomed. Anal. 46, 2008, 959-965. . | 104 |
| 5.1.4 | Příloha 4: Jáč, P., Los, P., Spáčil, Z., Pospíšilová, M., Polášek, M.: Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection, Electrophoresis, uncorrected proof..... | 112 |
| 5.2 | <i>Abstrakty uvedené ve sbornících.....</i> | 121 |
| 5.2.1 | Příloha 5: Jáč, P., Polášek M., Pospíšilová, M., Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods, 11th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Rimini, 25. - 28. 9. 2005..... | 121 |
| 5.2.2 | Příloha 6: Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I., Kaderová L., Comparative study of borate and tungstate as complex-forming reagents for the separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis, 15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Paříž, 28. - 30. 8. 2006..... | 122 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.3 | Příloha 7: Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I., Utilization of tungstate-based electrolyte for the determination of polyphenols in natural products by capillary electrophoresis, 12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Elba, 23. - 26. 9. 2007. | 123 |
| 6 | Závěr | 124 |
| 7 | Shrnutí..... | 126 |
| 8 | Summary | 127 |
| 9 | Literatura..... | 128 |

1 Úvod

Elektromigrační separační metody jsou založeny na pohybu elektricky nabitých částic v elektrickém poli, které je vkládáno do vodivého média, nejčastěji kapaliny nebo gelu. Pohyb nabitých částic je uskutečňován buď v planárním, nebo kapilárním uspořádání. Jelikož je tato dizertační práce zaměřena na kapilární elektromigrační metody, bude další popis výhradně zaměřen na kapilární systém.

Během své více než sedmdesátileté existence prodělaly elektromigrační metody výrazný rozvoj [1]. První pionýrskou prací se zapsal do historie elektromigračních metod Tiselius, který v roce 1937 zavedl „moving boundary electrophoresis“. Záhy poté byla vyvinuta elektroforéza na papíře (1939), která má stejný separační mechanismus jako dnes používané techniky. V průběhu padesátých let byly položeny základy elektroforézy na agarovém gelu, která našla rozsáhlé uplatnění v biochemii a klinické chemii. Šedesátá léta byla opět plná objevů v oblasti elektromigrace; mezi nejvýznamnější počiny patří zavedení dvou klíčových technik pro analýzu proteinů: isoelektrické fokusace a SDS-PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného). První komerční instrumentace v kapilární elektroforéze byla představena v roce 1973; jednalo se o plně automatický ITP analyzátor využívající kapiláry z polytetrafluoroethylenu (PTFE) o vnitřním průměru 0,5 mm. U tohoto přístroje se používaly kapiláry různých délek. Kapilára byla termostatovaná a analyty se detekovaly použitím univerzálního (termální nebo vodivostní) nebo UV detektoru. Tento přístroj mohl být také upraven pro preparativní účely. Není jakýchkoliv pochyb, že tehdejší instrumentální uspořádání ITP se stalo přímým předchůdcem dnešních kapilárně elektroforetických analyzátorů [1]. Rozvoj kapilární elektroforézy, tak jak ji známe dnes, začal v osmdesátých letech minulého století, kdy byly poprvé připraveny kapiláry vhodných rozměrů (vnitřní průměr v rozmezí 20-100 μm) [2]. Další významná expanze začala na počátku devadesátých let, kdy byl na trh uveden první komerčně vyráběný kapilárně elektroforetický analyzátor. Od té doby bylo publikováno mnoho původních vědeckých prací, které dokládají rozsáhlé využití kapilární elektroforézy v různých oblastech vědeckého výzkumu zahrnujících proteomiku a genomiku, farmaceutickou, environmentální a forenzní analýzu [1]. Posledními vývojovými trendy v oblasti elektromigračních metod je

spojení CE s dalšími technikami a to buď za účelem předúpravy vzorku (FIA-CE) či identifikace struktury analytů (CE-MS, CE-NMR). Dalším velmi významným směrem vývoje elektromigračních metod je zavedení konceptu elektroforézy na čipu. Na trhu již působí výrobci [3][4] komerčně dodávaných čipových CE-analyzátorů. V tomto směru lze očekávat poměrně bouřlivý vývoj instrumentace s uplatněním v mnoha oborech.

Ačkoliv elektromigrační metody prodělaly v posledních dvou až třech dekadách poměrně rychlý a bouřlivý vývoj, a přestože bylo nesčetněkrát demonstrováno jejich využití i pro rutinní analýzy, v porovnání s konkurenční vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) přeci jen hrají „druhé housle“. Toto tvrzení vystihuje situaci zejména v oblasti farmaceutické analýzy, kde HPLC tvoří výrazný podíl přístrojů v takto orientovaných laboratořích. Oproti tomu je význam elektroforézy (a to zejména v planárním uspořádání) v oblasti biochemie, proteomiky a genomiky naprosto nezpochybnitelný [5][6].

2 Cíl práce

Cíl této dizertační práce lze rozdělit do dvou hlavních tematických okruhů.

Cílem prvního okruhu bylo navázat na předchozí výzkum provedený na katedře analytické chemie v oblasti studia separace polyfenolů (flavonoidů a fenolických kyselin) kapilární elektroforézou. Prvním úkolem bylo zpracovat rešerši mapující moderní trendy v analýze polyfenolů elektromigračními metodami v období let 1999-2005. Další cíl tohoto výzkumného okruhu zahrnoval vývoj elektroforetických metod pro separaci polyfenolů v neutrálních či slabě alkalických elektrolytech na základě tvorby komplexů polyfenolů s oxosloučeninami prvků VIb skupiny periodické soustavy, konkrétně s wolframem (v návaznosti na disertační práci Dr. Ivana Petříšky, který studoval vliv molybdenanu jako komplexačního činidla na selektivitu separace vybraných polyfenolů [7]). Záměrem bylo vyvinout, optimalizovat a validovat elektroforetické podmínky pro separaci stejné modelové směsi, která byla studována v případě molybdenanu (apigenin, luteolin, hyperosid, kvercetin, rutin, kyselina chlorogenová a p-kumarová) a dosažené výsledky porovnat s konvenčním elektrolytem, založeným na borátovém pufru. Kromě toho bylo třeba prokázat praktickou využitelnost nového elektrolytu na bázi wolframanu při analýze reálných vzorků.

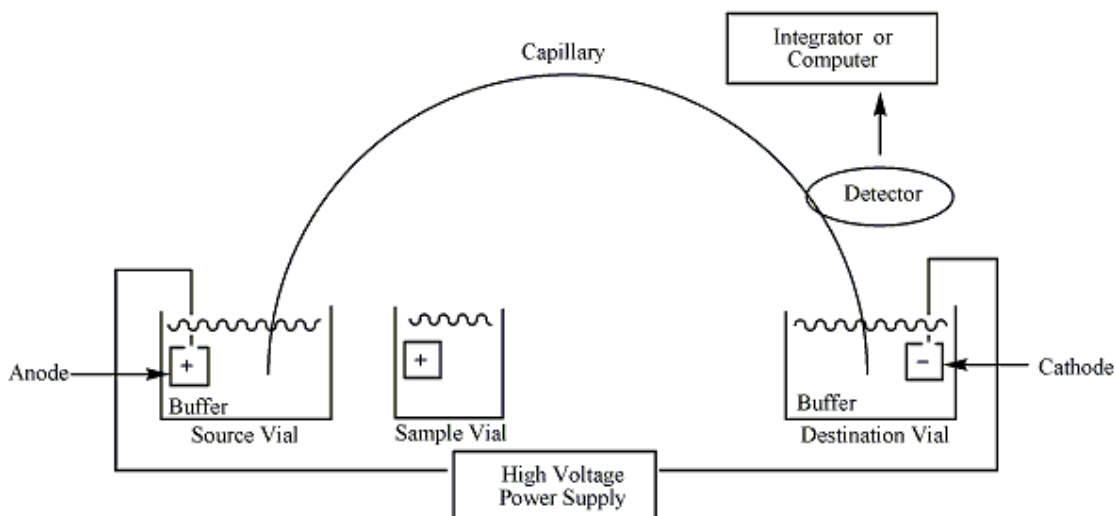
Druhý okruh byl zaměřen na vývoj, optimalizaci a validaci nových kapilárně elektroforetických metod pro kontrolu jakosti moderních léčivých přípravků. Záměrem bylo vyvinout a validovat metodu pro analýzu nečistot v antidepressivu (*S*)-citalopramu. Jako nečistoty připadají v úvahu neaktivní enantiomer (*R*)-citalopram a syntetický prekurzor (*R/S*)-citadiol. Dalším řešeným úkolem byl vývoj rychlé a dostatečně citlivé elektroforetické metody pro stanovení glukosaminu v léčivých přípravcích a potravních doplňcích, obsahujících též draselné ionty.

3 Teoretická část

3.1 Instrumentální uspořádání

Elektroforetický analyzátor se typicky skládá z těchto částí: nádobek se základním elektrolytem (tzv. vialky), separační kapiláry, vysokonapěťového zdroje, detektoru a počítače (viz obr. 3-1). Konce křemenné kapiláry, která je naplněna základním elektrolytem (BGE), jsou ponořeny do vialek se stejným BGE. Ve vialkách jsou zároveň ponořeny i elektrody, které jsou napojeny na zdroj vysokého napětí. Vlivem elektrického proudu dochází k migraci látek v základním elektrolytu. Při průchodu zóny analytu detekční celou je signál detektoru zpracován počítačem, který zároveň slouží jako ovládací prvek celého analyzátoru.

V této kapitole budou blíže představeny jednotlivé součásti moderní kapilárně elektroforetické instrumentace. Jelikož je miniaturizace analyzátorů výrazným trendem, bude v poslední kapitole této části stručně představena elektroforéza v čipovém formátu.

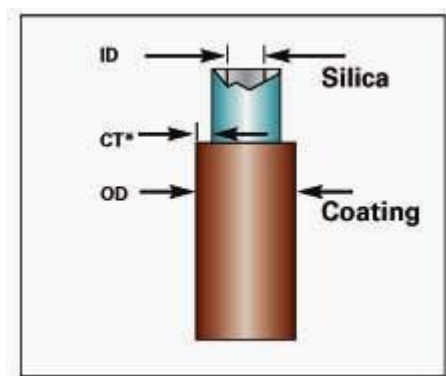


Obrázek 3-1: Základní uspořádání kapilárně-elektroforetického analyzátoru. Převzato ze zdroje [8].

3.1.1 Separační kapilára

Separace v kapilární elektroforéze probíhá nejčastěji v křemenných kapilárách s vnitřním průměrem v rozmezí 50-100 μm a obvyklé celkové délce 30-110 cm (viz obr. 3-2). Obecně platí, že čím menší průměr, tím se dosahuje lepší separační účinnosti na úkor citlivosti detekce. Zároveň je v kapilárách o menším vnitřním průměru generován menší proud a s tím souvisí nižší riziko vzniku Jouleho tepla. Kromě toho je také možno použít kapilár s menším vnitřním průměrem (20 nebo 25 μm), ale tyto kapiláry nejsou

vhodné pro separace s UV detekcí z důvodů výrazně snížené citlivosti. Kromě křemenných kapilár bylo také popsáno použití skleněných kapilár, které se dnes již nepoužívají, a kapilár z teflonu či jiných fluorovaných polymerů [9].



Obrázek 3-2: Schéma separační kapiláry. ID – vnitřní průměr, OD – vnější průměr, CT – tloušťka obalu. Převzato ze zdroje [10].

Křemenné kapiláry jsou ve výrobě běžně potahovány ochrannou vrstvou polymeru, aby bylo dosaženo jejich vyšší mechanické odolnosti. Nejčastěji se používá polyimid, který není pro UV záření dostatečně transparentní, a proto je třeba v případě spektrofotometrické detekce tuto vrstvu před zavedením kapiláry do detekční cely odstranit (např. tepelně pomocí odporového drátku). Na trhu jsou k dispozici i kapiláry s UV transparentním potahem, u kterých není potřeba vypálit detekční okno, ale tyto jsou finančně nákladnější.

Kapilára se do elektroforetického analyzátoru vkládá v kazetě (cartridge), která je uzpůsobená UV-VIS detekci. Součástí kazety je detekční cela, kterou prochází paprsek skrz detekční okno v kapiláře. Vzdálenost od místa nástřiku (nejčastěji anoda) k detekční cele se nazývá efektivní délka kapiláry. V případě, že je požadována velmi rychlá separace, lze separovat také na tzv. krátkém konci. Poté mluvíme o tzv. „short-end injection“. Příkladem může být separace racemického citalopramu, kdy jsou oba enantiomery od sebe rozděleny na dráze 8,5 cm v čase kratším než 1,5 minuty (celková délka kapiláry byla 48,5 cm) [11]. Rozdíl mezi kazetami různých výrobců elektroforetických analyzátorů je i mj. ve způsobu temperování kapiláry. Zatímco u analyzátorů firem Agilent a PrinCE je kapilára chlazená vzduchem, konkurenční přístroj od společnosti Beckmann Coulter využívá kapalinové chlazení kapiláry.

Aby se dosáhlo reprodukovatelných výsledků, je nutno kapiláru promývat [9][12]. Před prvním použitím by se měla kapilára kondicionovat průplachem 1 M

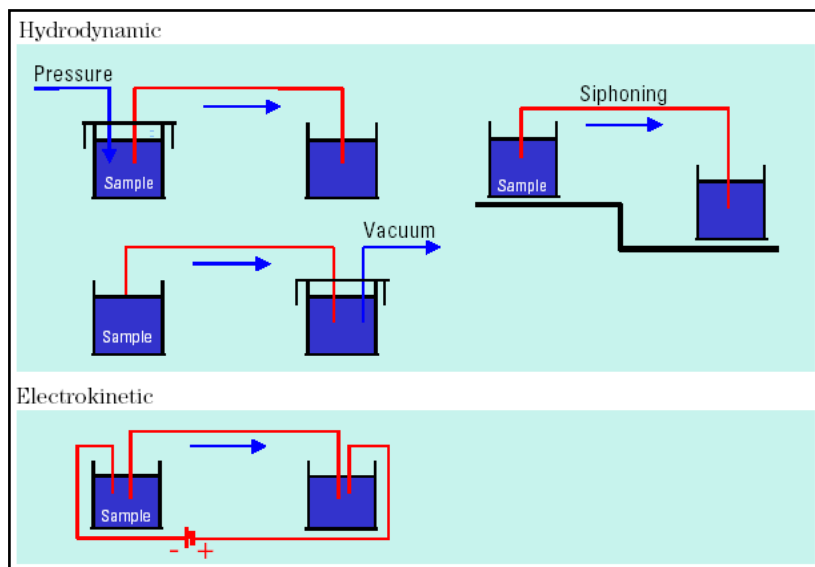
NaOH, který je následován promytím kapiláry vodou. Tímto dojde k dostatečné ionizaci vnitřní stěny kapiláry a stabilnímu elektroosmotickému toku (EOF, viz dále). Během dalšího používání kapiláry by každý den před první analýzou a po poslední analýze měla být kapilára opět proplachována delší čas jak NaOH, tak vodou. Mezi analýzami se kapilára opět proplachuje roztokem hydroxidu sodného z důvodu regenerace vnitřní stěny a zajištění stabilního EOF a tím reprodukovatelných výsledků, poté vodou a před nástřikem vzorku elektrolytem [9][12].

3.1.2 Zdroj napětí

Jako zdroj napětí se používají stabilizované vysokonapěťové zdroje, které pracují v rozsahu 0-30 kV (pro CZE) a 0-300 mA (pro ITP). Práce při vyšším napětí než 30 kV nemá praktické využití z důvodu ionizace vzduchu a nebezpečí vzniku elektrických výbojů [13].

3.1.3 Dávkování vzorku

Z důvodu malých objemů, které se dávkují do kapiláry, nelze použít dávkovacích smyček, jak je tomu u HPLC. Mezi nejběžnější způsoby dávkování patří dávkování hydrodynamické a elektrokinetické (obr. 3-3).



Obrázek 3-3: Základní způsoby dávkování vzorku. Převzato ze zdroje [14].

3.1.3.1 Hydrodynamické dávkování

Tento způsob dávkování vzorku lze realizovat sifonovým efektem, nebo vytvořením tlakového spádu v kapiláře. Dávkování založené na sifonovém efektu využívá samovolného proudění tekutiny mezi dvěma spojenými nádobami umístěnými v různé výšce. Dnes se již tento způsob dávkování nepoužívá z důvodů nízké reprodukovatelnosti objemu aplikovaného vzorku. U komerčních přístrojů se využívá tlaku nebo vakua, kterým se vzorek vpraví do separační kapiláry [13].

Objem vzorku se vypočítá dle Hagen-Poiseuilleovy rovnice [13]:

$$V_d = \frac{\Delta P d^4 \pi t_d}{128 \eta l_t} \quad \text{Rovnice 3-1}$$

kde ΔP je tlakový spád v kapiláře, d je vnitřní průměr kapiláry, t_d je doba nástřiku, η je viskozita základního elektrolytu a l_t je celková délka kapiláry.

3.1.3.2 Elektrokinetické dávkování

V průběhu elektrokinetického dávkování se potřebný objem vzorku vpraví do kapiláry vložením stejnosměrného napětí mezi vialku se vzorkem a vialku s BGE, která je na výstupním konci kapiláry (outletu). V tomto případě je použito nižší napětí, než které se běžně vkládá během separace. Jelikož jednotlivé analyty vstupují v průběhu nástřiku do kapiláry na základě svých pohyblivostí, nemusí koncentrační poměry v kapiláře odpovídat koncentracím jednotlivých analytů ve vzorku [13].

3.1.4 Detekční techniky používané v CE

Způsob detekce je u separačních metod velmi důležitý, protože cílem separačních metod je nejen separace směsi analytů, ale také jejich stanovení v matrici, ve které se mohou vyskytovat ve velmi nízkých koncentracích. Typickým příkladem je stanovení léčiva a jeho metabolitů v tělních tekutinách a tkáních, kdy je potřeba volit nejen vhodný způsob separace, ale také detekce.

Detekční techniky můžeme rozdělit na několik větších skupin [9]:

1. Optické metody (UV-VIS, fluorimetrie, chemiluminiscence)
2. Elektrochemické metody (amperometrie, voltametrie, vodivostní detekce, potenciometrie)
3. Hmotnostní spektrometrie

4. Další: NMR

Uvědomíme-li si, že v CE jsou dávkované objemy vzorku velmi malé, je nutno někdy detekovat velmi nízké absolutní množství analytu (řádově femtomoly až attomoly; 10^{-15} - 10^{-18}). Ale vyjádříme-li toto množství v koncentračních jednotkách, tak se LOD pohybuje v rozmezí 10^{-5} až 10^{-7} mol/l [9]. Porovnání citlivosti jednotlivých detekčních metod je uvedeno v tabulce 3-1.

Tabulka 3-1: Porovnání citlivosti vybraných detekčních technik používaných v CE. Upraveno dle zdroje [15]

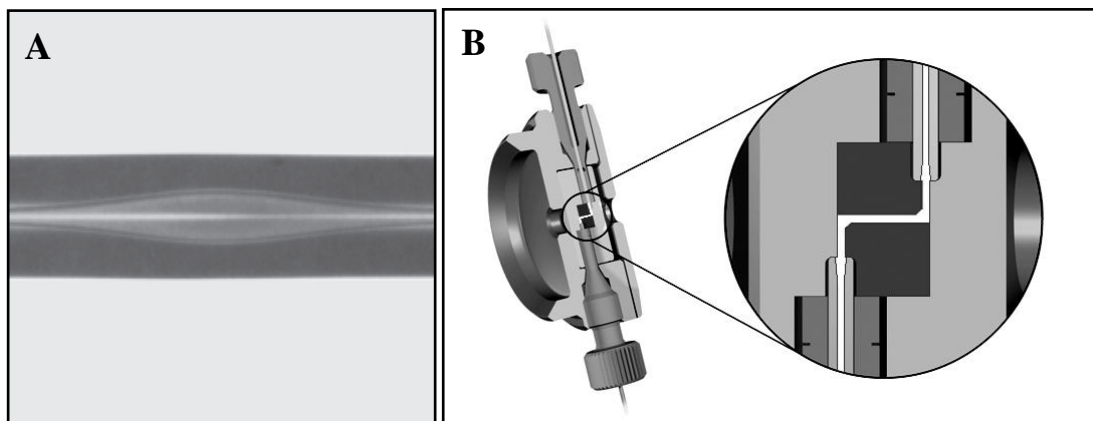
| Detekční metoda | LOD (mol/l) | Minimální detekovatelné množství (mol) |
|--------------------------|-------------------------|--|
| Přímá UV | 10^{-5} - 10^{-8} | 10^{-13} - 10^{-15} |
| LIF (přímá, „on-column“) | 10^{-14} - 10^{-16} | 10^{-18} - 10^{-20} |
| Vodivostní | 10^{-7} - 10^{-8} | 10^{-15} - 10^{-16} |
| Amperometrická | 10^{-10} - 10^{-11} | 10^{-18} - 10^{-19} |
| MS | 10^{-8} - 10^{-9} | 10^{-16} - 10^{-17} |

3.1.4.1 Optické metody

Z optických metod se nejčastěji setkáváme s UV-VIS spektrofotometrií, která je vůbec nejčastěji používaným způsobem detekce v CE. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.1, UV detekce se provádí „on-line“ přímo na kapiláře, na které bylo připraveno detekční okénko. V porovnání s HPLC je obecně citlivost UV-VIS detekce o 1-2 řády nižší. To je způsobeno malým vnitřním průměrem kapiláry (nejčastěji 50-100 μ m) v porovnání s rozměry detekční cely v případě HPLC [9]. Pro zvýšení citlivosti detekce lze před vlastní separací provést zakoncentrování analytu (tzv. sample stacking) přímo v separační kapiláře. Způsobů, jak lze vzorek v kapiláře zakoncentrovat je celá řada a je souhrnně popsáno v přehledné práci Dr. Urbánka [16]. V předkládané práci nebude zakoncentrování vzorku věnována pozornost, jelikož toto není cílem této dizertační práce.

Jiným způsobem, jak lze zlepšit citlivost UV-VIS detekce, je použití modifikovaných detekčních cel. Konkrétně se jedná o tzv. „bubble cell“ a „Z-cell“ (viz obr. 3-4). V případě „bubble cell“ je kapilára v místě detekčního okna 3x až 5x

rozšířená v porovnání se svým vlastním vnitřním průměrem (Př. 25 μm i.d. x 125 μm v místě detekční cely; 5x rozšířeno). Jelikož je toto rozšíření malé, nedochází k ovlivnění separační účinnosti a rozlišení. „Z-cell“, nebo-li kapilára ve tvaru písmene „Z“, je dalším způsobem, jak prodloužit optickou dráhu a tím zvýšit citlivost detekce. U této modifikace je prodloužení optické dráhy založeno na ohnutí kapiláry v místě detekční cely do tvaru písmene „Z“. Pokud je délka detekční cely 3000 μm při vnitřním průměru 75 μm , tak by citlivost detekce měla vzrůst asi 40x v porovnání s klasickou „on-line“ detekcí. Jelikož ale zároveň s výrazným prodloužením optické dráhy roste i šum základní linie, je citlivost ve výsledku vyšší jen 12x. Nevýhodou takto výrazného prodloužení optické dráhy může být i snížení rozlišení a účinnosti [9]. Oba typy detekčních cel jsou komerčně dostupné [17][18].



Obrázek 3-4: A – Fotografie „bubble cell“ kapiláry s vnitřním průměrem 25 μm a rozšířením na 125 μm (převzato ze zdroje [17]); B – Schéma Z-cely (převzato ze zdroje [18])

Při elektroforetické analýze látek, které nemají výrazné chromofory (např. sacharidy, anorganické ionty), se často používá i nepřímá UV detekce, která je založena na přítomnosti silně absorbující látky v BGE. V případě nastavení detektoru na vlnovou délku odpovídající maximální absorbanci takovéto látky, dochází při průchodu neabsorbujících analytů detekční celou k poklesu signálu, který se projeví jako negativní pík. Jako příklad využití nepřímé detekce lze uvést stanovení anorganických iontů při 262 nm v základním elektrolytu obsahujícím 6 mM 4-aminopyridin, 30 μM CTAB a 2,7 mM CrO_4^{2-} jako absorbující prostředí [19]. Pro stanovení alkoholických cukrů v infuzních roztocích byl jako základní elektrolyt použit 200 mM borát o pH 9,3 obsahující 10 mM 3-nitrobenzoovou kyselinu jako absorbující složku. Analyty (manitol, sorbitol a xylitol) byly detekovány při 215 nm [20].

Další velmi oblíbenou detekční metodou v kapilární elektroforéze je fluorimetrie. Nejčastěji se používá laserem indukovaná fluorescence (LIF). Použitím této detekce se výrazně zlepšuje citlivost a selektivita stanovení, a proto je tato metoda často používána pro detekci látek v biologických matricích. Jistou nevýhodou je skutečnost, že většina látek nefluoreskuje, a proto je nutné takovéto analyty převést vhodnou derivatizační reakcí na fluoreskující deriváty.

3.1.4.2 Elektrochemické metody

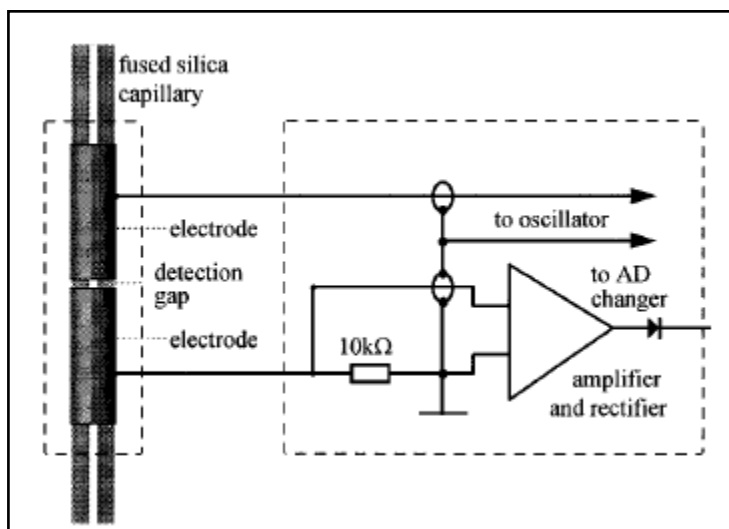
Mezi elektrochemické metody, které se používají k detekci analytů v CE, patří amperometrie a voltametrie. Obě metody, založené na oxidaci či redukci analytů, jsou vcelku univerzální a vyznačují se dostatečnou citlivostí. Potenciometrie se jako detekční metoda v CE používá jen okrajově [9].

Praktické uplatnění nachází také vodivostní detekce, která je založená na měření rozdílné vodivosti základního elektrolytu a zóny analytu. První vodivostní detektory využívaly měření vodivosti mezi dvěma mikroelektrodami, které byly umístěny v kapiláře a byly v kontaktu se základním elektrolytem. Tyto tzv. kontaktní vodivostní detektory byly vyvinuty v 70letech pro kapilární izotachoforézu. Na rozdíl od termálních detektorů byly tyto vodivostní detektory citlivější. Jejich výraznou nevýhodou byla možná adsorpce složek BGE nebo analytů na povrch měrných elektrod, která se projevovala špatnou reprodukovatelností odezvy detektoru [21].

Tento negativní fenomén byl odstraněn zavedením bezkontaktní vodivostní detekce, kterou poprvé prezentoval Gaš a kol [22]. Také v tomto případě byl bezkontaktní vodivostní detektor použit pro ITP s teflonovými kapilárami (PTFE). Další vývoj představovalo zavedení tzv. koaxiálního uspořádání, které bylo poprvé prezentováno roku 1998 týmem Dr. Zemanna [23]. Tento typ je kompatibilní s CZE a křemennými kapilárami. U tohoto vodivostního detektoru je detekční cela tvořena párem sériově zapojených elektrod, mezi kterými je mezera o velikosti 2 mm (ta funguje jako rezistor). Na základě změny odporu (převrácená hodnota vodivosti) při průchodu analytu touto mezerou dochází ke změně napětí na sériově připojeném rezistoru (ten má neustále konstantní odpor), které je dále zesíleno a zpracováno jako signál [23] (viz obr. 3-5). Ve stejném roce nezávisle na Zemannovi představil da Silva a do Lago principiálně stejný typ CCD detektoru [24].

Bezkontaktní vodivostní detekce je velmi univerzální a s úspěchem se používá pro detekci molekul a iontů, které neabsorbují v UV oblasti – např. sacharidy [25] a anorganické ionty [26]. Kromě toho byly již publikovány práce demonstrující využití CZE-CCD detekce ve farmaceutické analýze. Stanovení betablokátorů a fyziologicky aktivních aminů bylo provedeno jak v konvenčním, tak i v čipovém měřítku [27]. Felix a kol. nedávno představil CE-CCD metodu pro stanovení salbutamolu v sirupech [28].

Při vývoji elektromigračních metod s tímto způsobem detekce je třeba věnovat zvýšenou pozornost volbě vhodného elektrolytu. Zde je nutno docílit kompromisu mezi citlivostí CCD detekce a symetrií píků. Z hlediska citlivosti je nejlepší použít takový elektrolyt, který má co nejrozdílnější vodivost (a tedy i pohyblivost spoluiontu i protiontu) základního elektrolytu ve srovnání s analyty. Tento požadavek je zároveň v přímém rozporu k dosažení akceptovatelné symetrie píku a zároveň účinnosti separace. Pokud mají analyt a spoluiont rozdílné pohyblivosti, projevuje se ve zvýšené míře vliv elektromigrační disperze, která negativně ovlivňuje symetrii píku a samozřejmě i účinnost separace. Přítomnost protiiontu s vysokou pohyblivostí zvýší intenzitu signálu zvýšením vodivosti BGE, ale na druhou stranu v tomto případě hrozí nebezpečí vzniku Jouleho tepla [21][29].



Obrázek 3-5: Schéma uspořádání bezkontaktního vodivostního detektoru. Převzato ze zdroje [23].

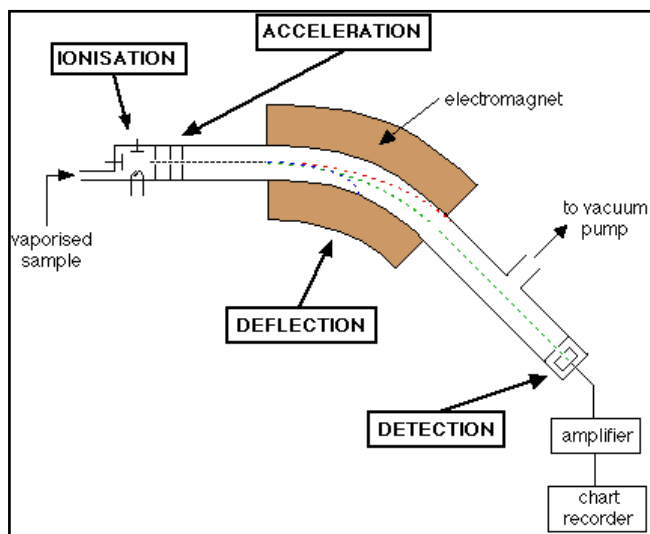
3.1.4.3 Hmotnostní spektrometrie

V posledních letech se prosazuje spojení hmotnostní spektrometrie se separačními metodami. Skýtá řadu nesporných výhod jako je identifikace analytu na

základě jeho hmotnostního spektra a velmi nízké hodnoty LOD. Proto je spojení separačních metod s MS detekcí používáno s výhodou v analýze metabolitů léčiv. Kromě LC/MS, která je již poměrně dobře zavedenou metodou, se začíná prosazovat i kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS). Důvodem, proč je CE-MS zatím minoritní metodou a doposud se rutinně téměř nepoužívá, jsou problémy s robustností rozhraní CE-MS. Další výraznou limitací CE-MS je nízká citlivost (koncentrace analytu vyjádřená v μM) způsobená nízkými dávkovacími objemy. Na druhou stranu počet inovativních a aplikačních publikací rok od roku mírně roste [30][31]. Na trhu je taktéž komerčně dostupný CE-MS analyzátor [32].

Vzhledem k tomu, že se tato práce nezabývala hmotnostní spektrometrií, bude o hmotnostní spektrometrii ve spojení s kapilární elektroforézou pojednáno pouze stručně.

Základními součástmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor a detektor (viz obr. 3-6).



Obrázek 3-6: Základní schéma hmotnostního spektrometru. Převzato ze zdroje [33].

K zajištění kompatibility mezi CE a MS je důležitá volba iontového zdroje; nejčastěji se používá ionizace elektrosprejem (electrospray ionization; ESI), dále chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) či fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization; APPI). Tyto ionizační techniky se řadí mezi tzv. měkké. Použitím těchto ionizačních technik dochází pouze k malé fragmentaci studovaných látek. V mnohých případech dochází jen ke vzniku $[\text{M}+\text{H}]^+$ či $[\text{M}-\text{H}]^+$ iontu [9][34]. Další používanou ionizační

technikou je tzv. ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization; MALDI), která se používá v analýze proteinů. Propojení CE-MALDI je většinou realizováno v „off-line“ režimu [9].

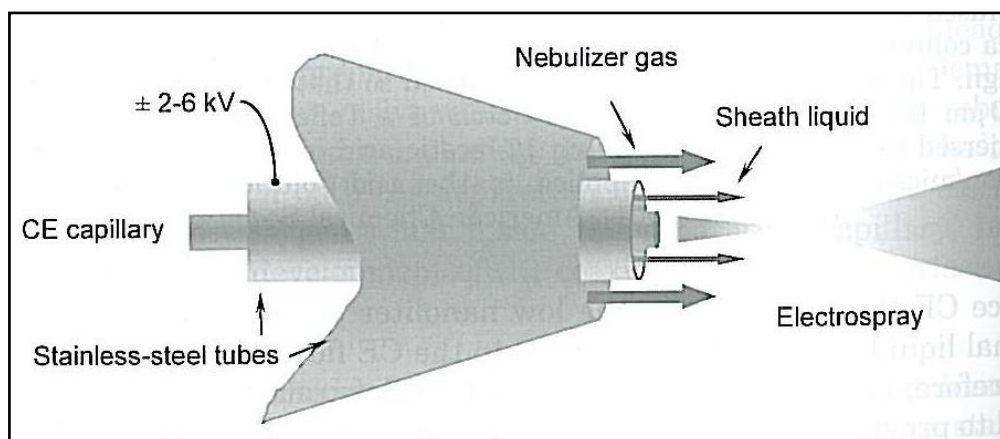
Kromě volby iontového zdroje je velmi důležitou součástí MS detektoru analyzátor, který dělí ionizované molekuly na základě jejich poměru náboje a hmotnosti (m/z). Tento proces musí nutně probíhat ve vakuu a na základě fyzikálního principu, na kterém daný typ analyzátoru pracuje, lze získat více či méně podrobné informace o struktuře analytu. Nejlevnějším analyzátozem je jednoduchý kvadrupól (Q), který poskytuje jen jednoduché informace o struktuře analyzované molekuly. Pokud je cílem analýz studium struktury analytu, je lepší použít buď trojitý kvadrupól (QqQ), či iontovou past (ion trap; IT). Trojitý kvadrupól umožňuje provedení MS^2 , zatímco u IT lze obecně provést MS^n analýzu (prakticky lze provést maximálně MS^4 z důvodů snížení citlivosti MS detekce s dalšími fragmentacemi) [9][34].

Nejčastěji se ve spojení s kapilární elektroforézou používá ionizace elektrosprejem (CE-ESI-MS). U tohoto rozhraní se používají tři různá propojení:

1. Spojení s přídavným průtokem kapaliny (coaxial sheat flow interface)
2. Spojení bez přídavného toku kapaliny (sheatless interface)
3. Kapalný spoj (liquid junction interface)

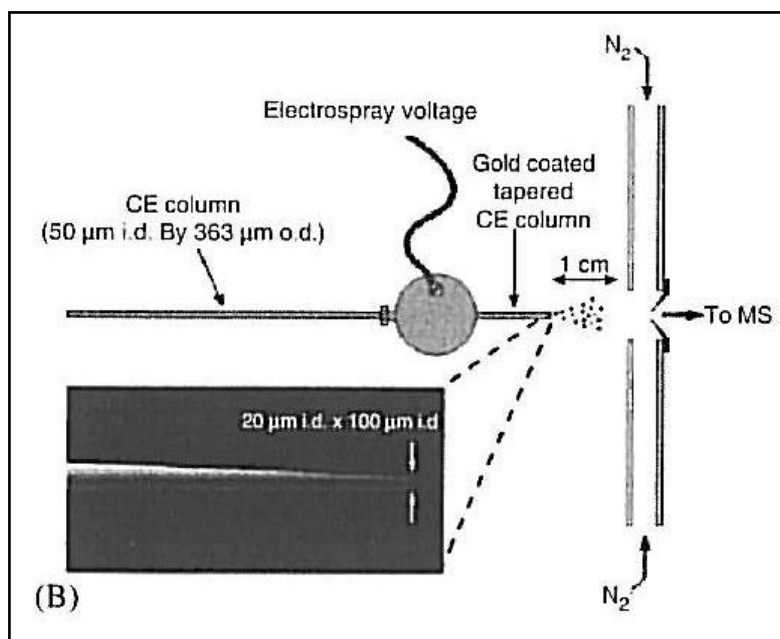
Spojení s přídavným tokem kapaliny je nejčastěji používaný a také nejrobustnější způsob realizace CE-ESI-MS. U tohoto způsobu propojení je separační kapilára vyvedena až na konec ESI sondy, kde dochází ke smísení „eluentu“ s vodivou přídavnou kapalinou. Na špičku sprejující kapiláry je vloženo napětí 2-6 kV, které je nezbytné pro funkčnost elektrospreje. Nevýhodou tohoto uspořádání je zředění eluátu přídavnou kapalinou, což se projevuje poklesem citlivosti. Na druhou stranu je přídavná kapalina nutná pro správnou funkci elektrospreje, kde je optimální průtok okolo 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, kdežto běžný průtok při CZE separaci je řádově ve stovkách nl/min . Přídavná kapalina je velmi často tvořena vodným roztokem methanolu (MeOH) nebo 2-propanolu s přídavkem kyseliny octové či mravenčí pro podporu ionizace zásaditých analytů. V případě kyselých analytů se často používá hydroxid amonný nebo triethylamin. Také složení BGE musí být optimalizováno, aby bylo kompatibilní s MS detekcí (aby nedocházelo ke kontaminaci – zasolení – iontového zdroje a snížení intenzity signálu). Z výše uvedeného vyplývá, že v elektroforéze velmi často používané

pufry jako je borátový či fosfátový, které jsou netěkavé, jsou v případě ESI daleko hůře použitelné. Výše uvedené pravidlo se také týká použití povrchově aktivních látek typu SDS. Nejčastěji se tedy využívá elektrolytového systému mravenčan amonný/kyselina mravenčí či octan amonný/kyselina octová. Během optimalizace metody je třeba optimalizovat také složení a průtok přídatné kapaliny, průtok a teplotu sušících plynů [9][34].



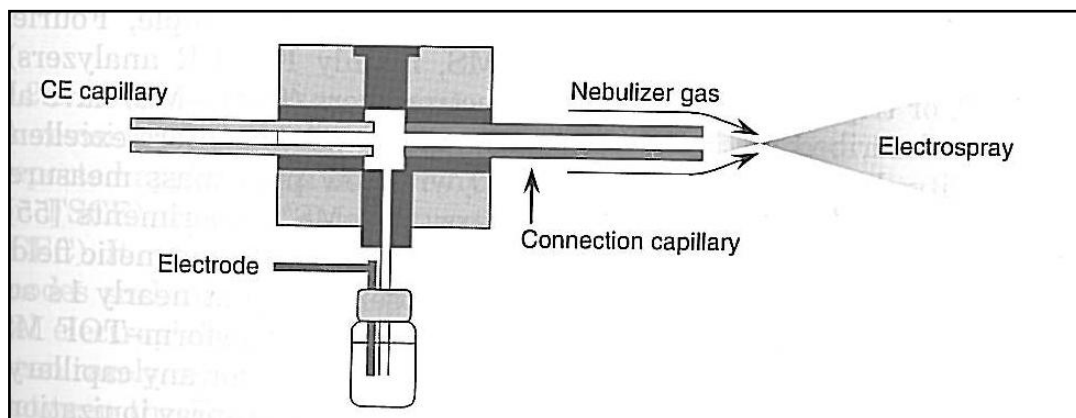
Obrázek 3-7: Spojení s přídatným tokem kapaliny. Převzato ze zdroje [9].

Spojení bez přídatné kapaliny. V tomto případě je konec kapiláry vytažen do úzké špičky (5-30 μm), která je plně uzpůsobená i pro velmi nízké průtoky typické pro CE (10-1000 nl/min); proto se v tomto případě také hovoří o tzv. nanoelektrospreji. Výraznou nevýhodou je velmi snížená robustnost tohoto uspořádání z důvodu častého ucpávání a lámavosti těchto špiček. Aby byla zajištěna funkce elektrospreje, je třeba zvýšit vodivost špičky kapiláry jejím pokovením (často pozlacením) [9][34].



Obrázek 3-8: Schéma spojení bez přídavného toku kapaliny. Převzato ze zdroje [9].

Kapalný spoj. U tohoto propojení mezi CE a elektrosprejem nedosahuje separační kapilára do špičky elektrospreje, ale končí v nádobce s elektrolytem, kde se uzavře obvod pro CE. Na ESI kapiláru se vkládá potřebné napětí, aby došlo k ionizaci analytů. Mezera mezi separační a ESI kapilárou je 10-25 μm [9][34].

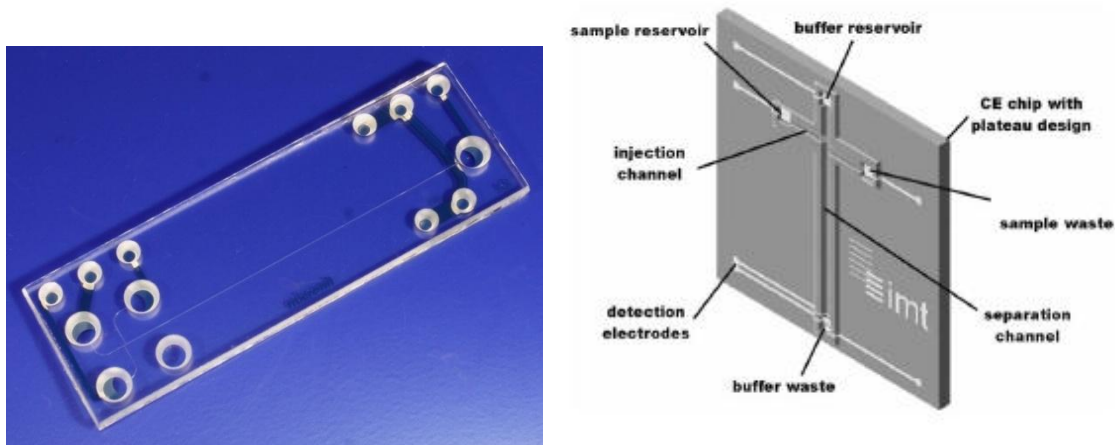


Obrázek 3-9: Schéma kapalného spoje. Převzato ze zdroje [9].

3.1.5 Elektroforéza na čipu

V posledních dvou desetiletích je moderním trendem ve vývoji analyzátorů miniaturizace. Tento koncept zvaný jako „micro-total analysis system“, též zkracovaný jako $\mu\text{-TAS}$, zahrnuje spojení různých kroků analýzy do jednoho procesu v rámci

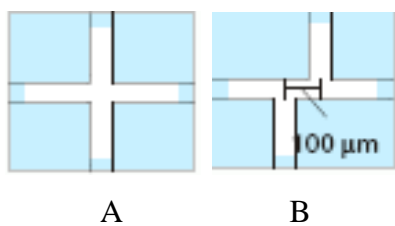
miniaturizovaného průtokového systému. Tento vývoj se samozřejmě nevyhnul ani elektromigračním metodám a dal vzniknout tzv. čipové elektroforéze [35].



Obrázek 3-10: Vlevo: Fotografie komerčně dostupného čipového CE analyzátoru od společnosti Micronit. Nástřik vzorku je realizován uspořádáním kanálků ve tvaru „dvou T“. Analyzátor je uzpůsoben bezkontaktní vodivostní detekci. Převzato ze zdroje [3]. Vpravo: Schéma uspořádání čipového CE analyzátoru. Dávkování vzorku je zajištěno elektrokineticky vložení napětí mezi „sample reservoir“ a „sample waste reservoir“. Dávkovací zařízení je ve tvaru „dvou T“. Analyzátor je vybaven elektrodami pro elektrochemickou detekci. Převzato ze zdroje [36].

Vývoj elektroforézy na čipu je úzce spojen s vývojem polovodičů a s technologiemi jejich výroby. Elektroforéza v čipovém formátu je realizována na křemenné či plastové podložce tloušťky asi 0,5 mm. Šířka a délka této podložky se pohybují nejčastěji v rozmezí 3-10 cm. Do této destičky je vyleptán separační kanálek, jehož hloubka je v rozmezí 15-40 μm a šířka 60-200 μm [37][38].

Nejjednodušší geometrie čipové elektroforézy představuje uspořádání kanálků ve tvaru kříže, anebo „dvou T“ (viz obr. 3-11). Místo křížení kanálků slouží k nástřiku vzorku do separačního kanálku. Nástřik je realizován nejčastěji elektrokineticky; mezi oběma rameny zůstane zóna vzorku, která je vložení napětí mezi rezervoáry pro pufr unášena pomocí elektroosmotického toku podél separačního kanálku a tak dochází k separaci analytů. Z důvodu nízkého objemu nástřiku (10 – 100 pL), který je i v porovnání s konvenční elektroforézou výrazně nižší, patří mezi nejčastěji používané detekční techniky laserem indukovaná fluorescence (LIF). Elektrochemická či chemiluminiscenční detekce jsou méně používané. Nově se prosazuje i ESI-MS ve spojení s čipovou elektroforézou [37][38].



Obrázek 3-11: Základní způsoby realizace dávkování vzorku v čipovém formátu: (A) – křížení kanálků ve tvaru kříže, (B) – křížení kanálků ve tvaru dvou T. Převzato ze zdroje [3].

Výhody, které charakterizují elektromigrační metody, jako například malá spotřeba vzorku a rozpouštědel, krátký čas analýzy a vysoká separační účinnost jsou v čipovém formátu ještě více zvýrazněny. Kromě samotné separace je možné v rámci jednoho kroku zahrnout úpravu vzorku, případnou derivatizaci analytu a další procesy. Tento nový koncept analyzátoru nalézá uplatnění v analýze proteinů a nukleových kyselin ale i menších sloučenin (např. léčiv) [37][38].

3.2 Rozdělení elektromigračních metod na základě mechanismu separace

S velkým rozvojem elektromigračních separačních metod v posledních dvou desetiletích byly vyvinuty rozmanité způsoby separace látek, které se liší svým mechanismem. Vedle kapilární zónové elektroforézy mají velký význam i metody, kde se využívá chromatografického separačního mechanismu (micelární elektrokinetická chromatografie, mikroemulzní elektrokinetická chromatografie, kapilární elektrochromatografie), což výrazně rozšiřuje využitelnost elektromigračních metod. Pro separaci velmi lipofilních látek se v posledních letech využívá elektroforéza v nevodném prostředí (NACE). Dále budou popsány i techniky, které se uplatňují zejména v oblasti biologického výzkumu - isoelektrická fokusace a gelová elektroforéza. Nesmíme též zapomenout na izotachoforézu, která má již období své největší slávy za sebou, ale přesto má tato metoda dnes využitelnost zejména při zakoncentrování vzorků pomocí přechodné izotachoforézy (t-ITP).

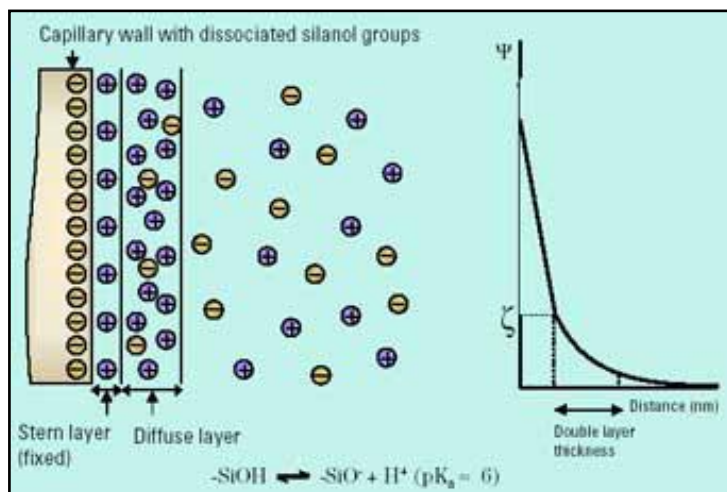
Cílem této kapitoly je stručnou formou prezentovat základní mechanismy různých elektromigračních metod. Aby byl tento přehled kontinuální, bude u základní metody, tedy CZE, představen obecný mechanismus fungování elektromigračních metod včetně vysvětlení pojmů elektroosmotický tok a elektroforetická pohyblivost.

3.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) [39]

Kapilární zónová elektroforéza je technika umožňující separaci nabitých látek – kationtů a aniontů – během jediné analýzy. Neutrální látky se pohybují, aniž by se rozdělily, spolu s elektroosmotickým tokem. Separace iontů v elektrickém poli je založena na rozdílu poměru jejich náboje a velikosti molekuly. Dalším faktorem, který ovlivňuje elektromigraci, je elektroosmotický tok (viz Obr. 3-12).

Elektroosmotický tok (EOF) vzniká v křemenných kapilárách v důsledku ionizace silanolových skupin přítomných na vnitřní stěně kapiláry. Tyto negativně nabitě *Si-O⁻* skupiny přitahují kationty přítomné v základním elektrolytu za vzniku tzv. fixní vrstvy. Tyto kationty ale nestačí kompenzovat všechen negativní náboj silanolových skupin a tak vzniká druhá, vnější vrstva kationtů (tzv. mobilní vrstva). Po vložení napětí je mobilní vrstva kationtů přitahována ke katodě a zároveň s sebou unáší i objem elektrolytu. Mezi fixní a mobilní vrstvou se vytváří rozdíl potenciálů, který se

nazývá jako zeta potenciál – ζ . Zeta potenciál závisí na šířce těchto dvou vrstev (δ), rozložení náboje na jednotku plochy (e) a na dielektrické konstantě pufru (ε).



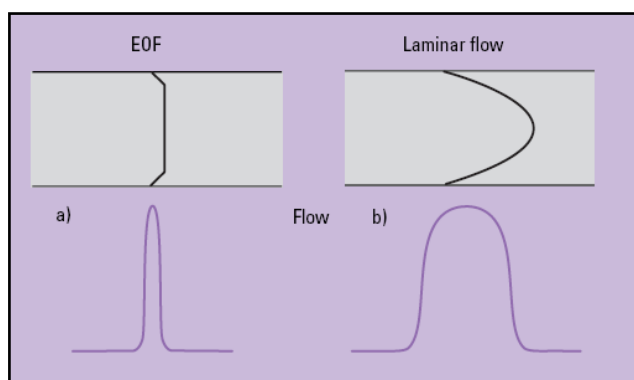
Obrázek 3-12: Schéma vzniku elektrické dvojvrstvy na vnitřním povrchu křemenné kapiláry. Převzato ze zdroje [14].

Matemicky je zeta potenciál definován rovnicí:

$$\zeta = 4\pi\delta e / \varepsilon$$

Rovnice 3-2

Na rozdíl od toku mobilní fáze v HPLC má elektroosmotický tok plochý profil (viz obr. 3-13), který je příčinou obecně vyšší separační účinnosti elektroforetických metod (lze dosáhnout účinnosti v řádu stovek tisíc teoretických pater).



Obrázek 3-13: Porovnání profilu elektroosmotického toku (a) a hydrodynamického toku v HPLC (b). Převzato ze zdroje [15].

Rychlost elektroosmotického toku, v_{EOF} , je definována:

$$v_{EOF} = \varepsilon\zeta E / 4\pi\eta$$

Rovnice 3-3

kde E je intenzita elektrického pole [V/cm] a η je viskozita pufru; další symboly viz rovnice 3-2.

Elektroosmotická pohyblivost je popsána jako poměr rychlosti elektroosmotického toku a intenzity elektrického pole:

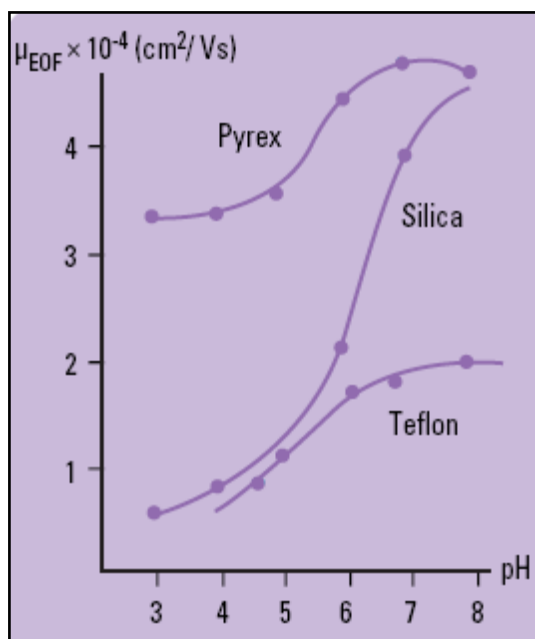
$$\mu_{EOF} = \varepsilon\zeta / 4\pi\eta$$

Rovnice 3-4

Ovlivněním veličin na pravé straně rovnice 3-3 lze dosáhnout změny v_{EOF} . Kromě změny separačního napětí a teploty má na rychlost elektroosmotického toku výrazný vliv složení pracovního elektrolytu (koncentrace, pH, přítomnost organických rozpouštědel či jiných aditiv).

Zvýšení vloženého napětí má za následek zvýšení rychlosti elektroosmotického toku a zkrácení migračních časů. Zároveň je dosaženo vyšší separační účinnosti. V důsledku zvýšení separačního napětí je generován vyšší proud, který může způsobit vznik tzv. Jouleho tepla. Jouleho teplo se vytváří, pokud teplo produkované průchodem elektrického proudu není dostatečně rychle odváděno. Tento fenomén se projevuje rozšířením píků, nereprodukovatelností migračních časů, rozložením či denaturací vzorku.

Hodnota pH elektrolytu má výrazný vliv na elektroosmotický tok, protože ovlivňuje hodnotu ζ potenciálu. S rostoucím pH se zvýší elektroosmotický tok z důvodu disociace silanolových skupin na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož je zeta potenciál přímo úměrný hustotě elektrického náboje, tak v důsledku zvýšení pH základního elektrolytu dojde i ke zvýšení rychlosti elektroosmotického toku. Při pH nižším než 2 je potlačena ionizace silanolových skupin vnitřní stěny kapiláry a zároveň dochází k potlačení elektroosmotického toku. Vliv pH na elektroosmotickou pohyblivost v kapilárách z různých materiálů je ilustrován na obrázku 3-14.



Obrázek 3-14: Vliv pH na pohyblivost EOF v kapilárách z různých materiálů. Převzato ze zdroje [15].

Zvýšením koncentrace či iontové síly základního elektrolytu se sníží elektroosmotická pohyblivost v důsledku nižší hodnoty zeta potenciálu. Obecně se běžné koncentrační rozmezí používaných elektrolytů pohybuje mezi 10 a 100 mmol/l.

Se zvyšující se teplotou dochází ke snížení viskozity elektrolytu, které se projeví zvýšením rychlosti elektroosmotického toku.

U organických rozpouštědel (MeOH, ACN a další) je velmi obtížné předpovědět vliv na elektroosmotický tok, protože ovlivňují jak viskozitu, tak i dielektrickou konstantu elektrolytu. Výsledný efekt závisí na druhu a množství přidaného organického rozpouštědla.

Chemická modifikace vnitřní stěny kapiláry může vést ke snížení, potlačení nebo obrácení směru elektroosmotického toku. Modifikace vnitřního povrchu kapiláry může být uskutečněna např. kovalentním navázáním polymerů (např. polyakrylamid) na vnitřní stěnu kapiláry, kdy dochází k potlačení EOF a snížení rizika adsorpce analytů na stěnu kapiláry. Jiným způsobem je rozpuštění požadované sloučeniny v základním elektrolytu, které vede k dynamické rovnováze mezi volně rozpuštěnou látkou a negativně nabitou stěnou kapiláry (dynamické pokrytí – např. TWEEN). V případě, že dojde pokrytím vnitřního povrchu kapiláry k potlačení elektroosmotického toku,

molekuly analytu se pohybují jen svou vlastní elektroforetickou pohyblivostí, a proto nelze v jedné analýze od sebe separovat kationty a anionty.

Jelikož elektroosmotický tok výrazně ovlivňuje separaci analytů, je potřeba měřit rychlost, popřípadě pohyblivost elektroosmotického toku. Nejjednodušší způsob je nastříknutí nenabitě sloučeniny, tzv. neutrálního markeru, do kapiláry a zjištění jejího migračního času. Rychlost elektroosmotického toku se pak vypočítá jako poměr efektivní délky kapiláry [cm] a migračního času markeru [s]:

$$v_{EOF} = l / t_{m}$$

Rovnice 3-5

Z rovnice 3-3 a rovnice 3-4 vyplývá:

$$\mu_{EOF} = v_{EOF} / E$$

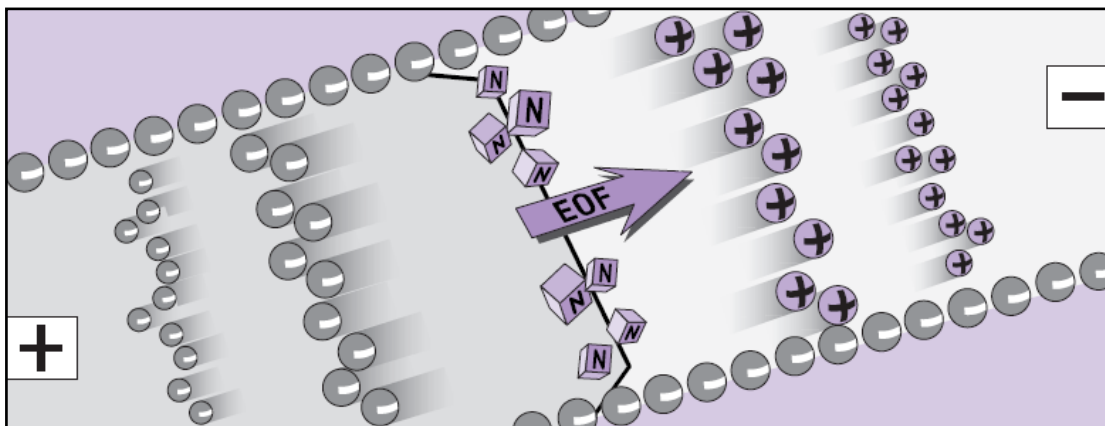
Rovnice 3-6

Pohyblivost elektroosmotického toku se tedy vypočítá jednoduše z experimentálních údajů: efektivní délky kapiláry (vzdálenost od místa nástřiku vzorku po detekční okno), migračního času neutrální látky a intenzity elektrického pole. Typické hodnoty se nejčastěji pohybují v rozsahu 10^{-5} až 10^{-4} $\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Neutrální marker určený k měření EOF musí splňovat několik kritérií: musí být neutrální při pH pracovního elektrolytu, detekovatelný používaným detektorem, chemicky čistý, nesmí interagovat s vnitřní stěnou kapiláry či složkami elektrolytu. Mezi nejčastěji používané neutrální markery patří: dimethylsulfoxid (DMSO), methanol, benzylalkohol a další.

Jak již bylo zmíněno, díky existenci EOF lze pomocí CZE separovat v průběhu jedné analýzy jak kationty, tak i anionty. Schematický popis separace bude zmíněn v následujících odstavcích.

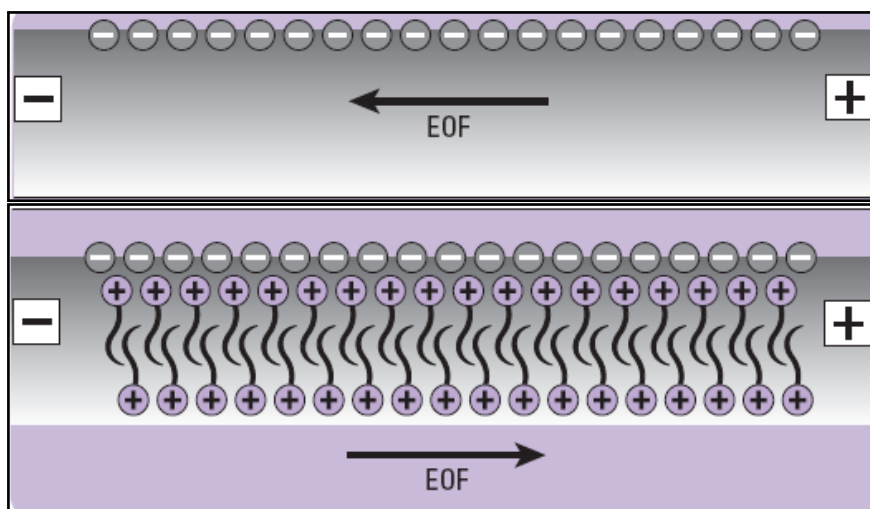
Do kapiláry, která je naplněná roztokem základního elektrolytu, je nastříknut vzorek. Po vložení napětí na konce kapiláry dochází k migraci analytů od místa nástřiku (anoda) směrem k detektoru (katoda). Pozitivně nabitě analyty migrují jako první směrem k detekčnímu oknu. Nejrychlejší jsou malé, vysoce nabitě (např. trojmocné) kationty, které jsou následovány kationty s větším m/z . Elektroneutrální sloučeniny migrují, aniž by se rozdělily, spolu s elektroosmotickým tokem. Díky existenci EOF je možné také separovat negativně nabitě látky. Elektroforetická pohyblivost většiny sloučenin je menší než pohyblivost elektroosmotického toku, a proto jsou záporně nabitě sloučeniny unášeny ve směru elektroosmotického toku (katoda) menší rychlostí než kationty a neutrální látky. Z aniontů jako první migrují anionty s velkým m/z a až

nakonec malé vysoce nabitě anionty, protože jsou nejsilněji přitahovány k anodě (viz obr. 3-15).



Obrázek 3-15: Schéma separace v kapilární zónové elektroforéze za přítomnosti EOF a při normální polaritě (katoda na straně detektoru). Převzato ze zdroje [15]

V případě, že je ve vzorku potřeba separovat větší počet různých aniontů, je vhodné obrátit směr elektroosmotického toku a tím také pořadí migrace látek. Tak se u aniontů dosáhne zkrácení doby analýzy. Jednoduchým způsobem, jak obrátit směr elektroosmotického toku, je přidavek kvartérního aminu (např. alkylamoniové soli) k základnímu elektrolytu. Hydrofilní kladně nabitý konec molekuly je přitahován k vnitřní stěně kapiláry, která je tvořena negativně nabitými silanolovými skupinami. Hydrofobní uhlovodíkový konec molekuly interaguje na základě hydrofobních interakcí s uhlovodíkovými konci kvarterních aminů v roztoku, a tím dochází k dynamickému pokrytí vnitřního povrchu kapiláry za současné změny jejího náboje ze záporného na kladný (viz obr. 3-16). Tímto kladným nábojem jsou přitahovány anionty z roztoku, které jsou zároveň přitahovány k anodě (kladně nabitě elektrodě) – dochází ke změně směru elektroosmotického toku. Pokud je zároveň změněna polarita vkládaného napětí (na straně detektoru není katoda, ale anoda), tak docílíme obráceného pořadí migrace látek: anionty, neutrální látky, kationty. K obrácení elektroosmotického toku se používá celá řada alkylamoniových solí, nejčastěji však cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB) a to v koncentracích nižších, než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC).



Obrázek 3-16: Otočení směru elektroosmotického toku přidáním alkylamoniové soli. Převzato ze zdroje [15].

Pro rychlost pohybu iontu v roztoku platí analogický vztah jako pro rychlost elektroosmotického toku (analogie s rovnicí 3-6):

$$v_{EP} = \mu_{EP} E \quad \text{Rovnice 3-7}$$

kde μ_{EP} je elektroforetická pohyblivost a E je intenzita elektrického pole.

Elektroforetická pohyblivost závisí na vlastnostech každého analytu a to konkrétně na jeho náboji a velikosti. Kromě toho je migrace iontů ovlivněna viskozitou použitého elektrolytu:

$$\mu_{EP} = q / 6\pi\eta r \quad \text{Rovnice 3-8}$$

kde q je náboj analytu, η viskozita BGE a r poloměr částice.

Veličina μ_{EP} je analogická μ_{EOF} a vyjadřuje se ve stejných jednotkách. Z rovnice 3-8 je patrné, že elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná poměru q/r . Tedy čím je vyšší náboj a menší molekula, tím je elektroforetická pohyblivost větší.

Zdánlivá (pozorovaná) rychlost pohybu analytu je závislá na jeho vlastní rychlosti v elektrickém poli a na rychlosti elektroosmotického toku:

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad \text{Rovnice 3-9}$$

V normálním uspořádání, kde je detektor na straně katody (záporně nabitá elektroda) a elektroosmotický tok směřuje od anody ke katodě, bude pozorovaná rychlost aniontů menší než rychlost elektroosmotického toku, protože negativně nabitě látky mají tendenci být přitahovány ke kladně nabitě anodě ($v_{OBS-aniony} < v_{EOF}$). Naopak

kationy migrují stejným směrem jako elektroosmotický tok, a proto zdánlivá rychlost jejich pohybu bude větší než rychlost elektroosmotického toku ($v_{OBS-kationy} > v_{EOF}$)

Analogické vztahy platí pro elektroforetické pohyblivosti:

$$\mu_{OBS} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad \text{Rovnice 3-10}$$

Skutečné (nikoliv zdánlivé) elektroforetické pohyblivosti jsou u většiny iontů menší než elektroosmotická pohyblivost: $\mu_{EOF} > |\mu_{EP}|$.

Na základě uvedených závislostí lze z experimentálních dat vypočítat skutečnou elektroforetickou pohyblivost analytů. Zdánlivá rychlost pohybu nabitě částice je definována poměrem efektivní délky kapiláry (l) [cm] a jejím migračním časem [s]:

$$v_{OBS} = l / t_m \quad \text{Rovnice 3-11}$$

Úpravou rovnice 3-9 a vložení rovnice 3-5 a rovnice 3-11 získáme vztah pro výpočet rychlosti pohybu částice v elektrickém poli za definovaných podmínek:

$$v_{EP} = l / t_m - l / t_{nm} \quad \text{Rovnice 3-12}$$

Použitím rovnice 3-7, rovnice 3-12 a $E = U / L$, kde L je celková délka kapiláry [cm] a U je vložené napětí [V], získáme vztah pro výpočet skutečné elektroforetické pohyblivosti z experimentálních údajů:

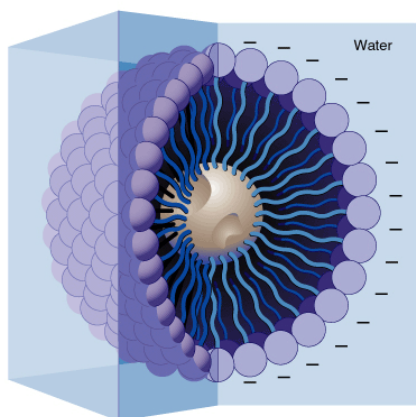
$$\mu_{EP} = \left(l / t_m - l / t_{nm} \right) \cdot \left(U / L \right) \quad \text{Rovnice 3-13}$$

Elektroforetická pohyblivost je ovlivnitelná mnoha faktory. Mezi nejdůležitější faktory patří pH základního elektrolytu, které ovlivňuje nejen elektroosmotickou pohyblivost, ale také ionizaci analytů. Proto látky kyselého povahy jsou separovány v elektrolytech zásaditého pH, aby byla podpořena jejich ionizace. U bazí platí opačný přístup. Mezi další faktory působící na elektroforetickou pohyblivost patří složení pracovního elektrolytu včetně přítomnosti různých aditiv (organická rozpouštědla, přísady cykloextrinů, povrchově aktivních látek, komplexujících sloučenin aj.). Tyto a jiné faktory ovlivňující nejen elektroforetickou pohyblivost, ale celý průběh a výsledek separace, jsou diskutovány v dalších částech kapitoly 3.

3.2.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) [39]

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) kombinuje separační mechanismus kapilární zónové elektroforézy a chromatografie a je tedy na rozdíl od klasické CZE vhodná i pro separaci elektricky neutrálních látek. Základním

principem separace je interakce analytů mezi micelami a elektrolytem. Micely se v BGE vytvoří po přidavku vhodné povrchově aktivní látky (tenzidu). Pro tvorbu micel je důležité, aby koncentrace povrchově aktivní látky v BGE překročila kritickou micelární koncentraci (CMC). Micely mají sférický tvar; hydrofilní konce molekul tenzidu jsou situovány na vnější straně micely směrem k vodnému roztoku, zatímco hydrofobní části směřují do jejího středu (viz obr. 3-17). Nejčastěji používaným tenzidem je dodecylsírán sodný (SDS), který patří mezi tzv. anionické tenzidy. Dalšími často využívanými anionickými tenzidy jsou žlučové kyseliny a jejich soli: sodné soli kyseliny cholové, deoxycholové a taurocholové. Z kationických tenzidů se v elektroforéze nejčastěji setkáme s kvarterními amoniovými solemi (CTAB, TTAB). Kromě výše zmíněných lze použít tenzidy ze skupiny zwitteriontů (např. CHAPS či CHAPSO) anebo neiontové povrchově aktivní látky (např. Triton X-100). Tenzidy jsou charakterizovány nejen svou CMC, ale i takzvaným agregačním číslem (AN), které udává počet molekul detergentu podílejících se na tvorbě micely.

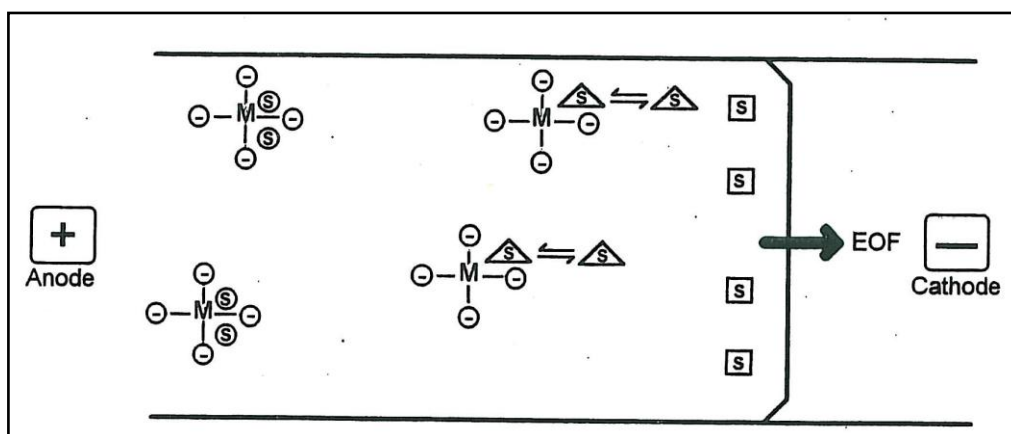


Obrázek 3-17: Schéma micely anionaktivního tenzidu ve vodném prostředí. Převzato ze zdroje [40].

Mechanismus separace v MEKC bude demonstrován na příkladu migrace elektricky neutrálních látek v BGE, který obsahuje SDS. V kapiláře, která je naplněna tímto elektrolytem, jsou negativně nabitá micely SDS přitahovány ke kladně nabitě elektrodě (anodě), ale díky existenci EOF migrují k detektoru, který je na straně katody. Neutrální analyty jsou distribuovány mezi elektrolytem a micelami na základě jejich lipofility. Vysoce hydrofilní ve vodě rozpustné látky (např. MeOH) neinteragují s micelami, a proto migrují spolu s elektroosmotickým tokem. Čas, ve kterém tyto látky migrují, se označuje t_0 . Velmi hydrofobní látky, které jsou silně vázány v micelách, migrují stejnou rychlostí jako micely samotné (čas, ve kterém migrují, se označuje t_{mc}).

Molekuly, které jsou jen částečně rozpustné v micelách, migrují mezi časem t_0 a t_{mc} (tzv. retenční okno). Jejich migrační čas je přímo úměrný jejich lipofilitě. Všechny elektroneutrální látky tedy migrují v retenčním okně mezi časem t_0 a t_{mc} . Toto retenční okno může být zvětšeno použitím micely, která má vyšší mobilitu a následně je silněji přitahována k anodě (v případě negativně nabitého tenzidu). V tomto případě je prodloužen čas t_{mc} a látky rozpuštěné v micelární fázi migrují pomaleji. Pro stanovení časů t_0 a t_{mc} se používá methanol (není rozpustný v micelách) a Sudan III (1-(p-fenylazofenylazo)2-naftol), který je úplně solubilizován micelami.

V případě použití kationických surfaktantů dochází k otočení EOF, a proto je nutné separovat za obrácené polarity vkládaného napětí.



Obrázek 3-18: Schéma separace v MEKC. Micely negativně nabitého surfaktantu jsou znázorněny písmenem M a negativním nábojem. Tyto micely jsou přitahovány k anodě, ale díky EOF migrují směrem ke katodě. Analyty jsou znázorněny písmenem S. Čtverečky znázorňují analyty, které neinteragují s micelami a migrují s EOF. Kroužky představují vysoce polární analyty, které migrují s micelami (t_{mc}). Trojúhelníčky znázorňují analyty, které migrují mezi t_0 a t_{mc} . Převzato ze zdroje [39].

Z výše popsaného je zřejmá podobnost s RP-HPLC, kde je separace látek založena na rozdělování mezi hydrofobní stacionární fází a hydrofilní mobilní fází. Na základě této podobnosti se micelární fáze v MEKC nazývá jako „pseudostacionární“.

Retenční chování elektricky neutrální látky je popsáno kapacitním faktorem k' , který je určen poměrem molů látky přítomné v micelách (n_{mc}) a molů stejné sloučeniny ve vodné fázi (n_{aq}):

$$k' = n_{mc} / n_{aq} \quad \text{Rovnice 3-14}$$

Jiný vztah definuje kapacitní faktor na základě migračních časů:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0(1 - t_R/t_{mc})}, \quad \text{Rovnice 3-15}$$

kde t_R je retenční (migrační) čas neutrální látky.

Tento vztah je velmi obdobný rovnici upravující výpočet kapacitního faktoru v chromatografii:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad \text{Rovnice 3-16}$$

Obě rovnice se liší ve výrazu $(1 - t_R/t_{mc})$, který charakterizuje retenční chování látek v MEKC oproti HPLC. V případě, že t_{mc} nabývá vysokých hodnot, je rovnice 3-15 stejná jako rovnice 3-16.

MEKC je vedle separace neutrálních látek samozřejmě využitelná pro analýzu látek iontového charakteru, které jsou separovány nejen na základě své elektroforetické pohyblivosti, ale také díky interakcím s micelami v závislosti na náboji micel a analytu a rozpustnosti analytu v micel. V případě negativně nabitých micel (SDS) neinteragují anionty s těmito micelami silně a jsou tudíž separovány převážně v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti. Naopak kationty jsou silně přitahovány k negativně nabitým micelám za vzniku iontových párů, a proto migrují pomaleji, často i za neutrálními látkami. Proto je pořadí migrace látek ve zmíněném případě následující: neutrální látky, kationty a anionty.

Selektivitu separace v MEKC lze ovlivnit vznikem smíšených micel, přidavkem cyklodextrinů (CD), nebo přidavkem organických rozpouštědel.

Příkladem využití smíšených micel v MEKC může být separace antioxidantů různé lipofily, které bylo dosaženo v borátovém pufru obsahujícím 40 mM cholát sodný, 15 mM SDS a 10% MeOH [41].

V případě analýzy velmi nepolárních látek, které mají tendenci silně interagovat s micelami, je výhodné přidat do BGE neutrální cyclodextrin, který je unášen elektroosmotickým tokem. V přítomnosti druhé pseudostacionární fáze dochází k současné interakci hydrofobních analytů s micelami a s CD. Látky, které interagují s CD, musí být nejen dostatečně hydrofobní, ale musí být schopné zapadnout do hydrofobní dutiny CD. Molekuly interagující jen s CD se pohybují spolu s EOF. Oproti tomu látky, které nejsou schopné tvořit komplex s CD, jsou solubilizovány jen micelami

(migrují s t_{mc}). Sloučeniny interagující s oběma pseudostacionárními fázemi migrují mezi t_0 a t_{mc} .

Kapacitní faktor je pak definován:

$$k' = n_{mc} / n_{CD}$$

Rovnice 3-17

Použitím organických rozpouštědel dochází k ovlivnění elektroosmotického toku (zeta potenciál, viskozita pufru) a zároveň ke změně selektivity na základě ovlivnění distribuce analytu mezi micelární fází a elektrolytem. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla patří MeOH, ACN, dále pak propanol a tetrahydrofuran (THF).

3.2.3 Mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie (MEEKC) [42]

Mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie je svým separačním mechanismem velmi podobná MEKC s tím rozdílem, že pseudostacionární fáze je tvořena mikroemulzními kapénkami. Mikroemulze je roztok kapének volně dispergovaných v jiné nemísitelné kapalině. Nejčastěji používaným typem mikroemulze pro přípravu BGE je olej ve vodě (o/v), méně často se používá systému voda v oleji (v/o).

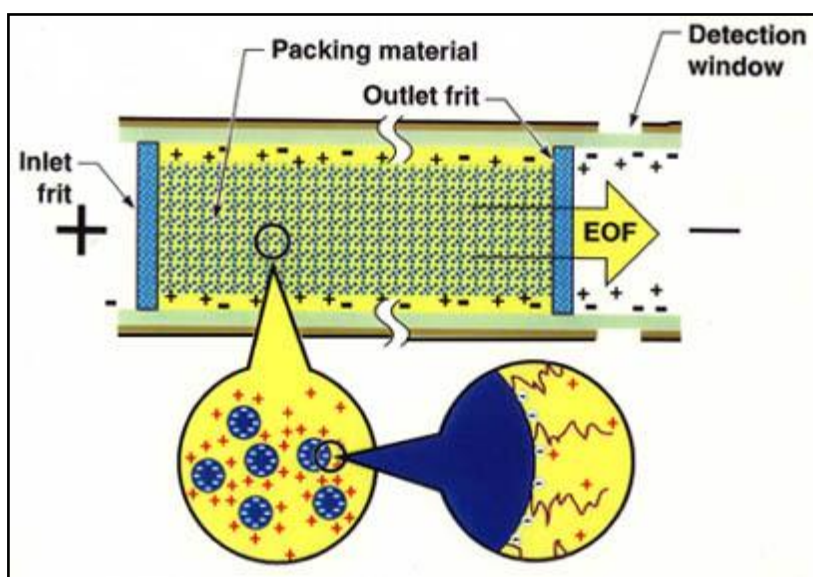
U mikroemulze typu olej ve vodě se obvykle jako kapénka (olejová fáze) používá oktan dispergovaný ve vodném pufru. Vedle oktanu bylo popsáno více organických rozpouštědel pro přípravu olejové fáze: hexan, heptan, cyklohexan, chloroform, hexan-1-ol, oktan-1-ol a pentan-1-ol. Přídavkem povrchově aktivních látek (nejčastěji SDS) o koncentraci nad jejich CMC dochází ke zmenšení povrchového napětí a usnadnění tvorby kapének. Přítomnost pomocného organického rozpouštědla (tzv. „co-surfaktantu“) dále přispívá ke zmenšení povrchového napětí a tím dochází ke stabilizaci mikroemulzního systému. Nejčastěji používanými co-surfaktanty jsou nízkomolekulární alkoholy (butan-1-ol, propan-1-ol, hexan-1-ol). Volba vhodného co-surfaktantu a optimalizace jeho obsahu v BGE má zásadní vliv na selektivitu separace. Přídavek organického rozpouštědla (MeOH, ACN) zvyšuje rozpustnost vysoce lipofilních látek ve vodném elektrolytu a tím se zlepší rozlišení pro tyto analyty. Nejčastěji používanými pufrů jsou borátový a fosfátový o pH 7-9, při kterém je dostatečně silný EOF, který unáší negativně nabitě olejové kapénky s rozpuštěným analytem směrem ke katodě (v případě použití anionaktivních tenzidů).

MEEKC využívající mikroemulzi typu v/o nachází uplatnění zejména pro separaci ve vodě špatně rozpustných látek; BGE založený na kontinuální olejové fázi zvyšuje jejich rozpustnost.

Při srovnání MEEKC s MEKC se zdá být prvně jmenovaná metoda využitelnější pro analýzu širší škály sloučenin, protože v případě MEEKC analyty lépe procházejí povrchem kapénky než rigidní micelou. Svou úlohu hraje také ulehčený přechod analytů mezi kapénkou a vodnou fází, který je zprostředkován co-surfaktantem.

3.2.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC) [14][43][44]

Kapilární elektrochromatografie je další technikou, která kombinuje separační mechanismus elektromigrace s mechanismem chromatografie. V porovnání s elektrokinetickými chromatografiemi (MEKC a MEEKC) se u CEC neuplatňuje pseudostacionární fáze, ale klasické křemenné kapiláry jsou naplněny sorbentem pro HPLC. Toto uspořádání spojuje vysokou separační účinnost CE se separačním mechanismem HPLC. K pohybu mobilní fáze (elektrolytu) kolonou (plněnou kapilárou) se využívá elektrického pole namísto hydraulického tlaku, a tak je dosaženo vysoké separační účinnosti. Zdůvodnění je velmi prosté; profil elektroosmotického toku je plochý na rozdíl od parabolického profilu laminárního toku mobilní fáze u HPLC. Navíc, jak již bylo zmíněno, kapiláry jsou plněny standardními náplněmi pro HPLC a v případě sorbetu na bázi silikagelu (např. C-18) dochází k zesílení EOF díky jeho značnému negativnímu náboji (viz obr. 3-19).



Obrázek 3-19: Schéma vzniku elektroosmotického toku v kapilárách plněných sorbentem na bázi silikagelu. Převzato ze zdroje [45].

Pro separace pomocí CEC se používají tři základní kolonová uspořádání: 1. plněné kolony, 2. kolony s volnými konci a 3. monolitické kolony.

V prvním případě se kolony plní klasickými HPLC sorbenty, které jsou speciálně upraveny pro CEC (mají malou zrnitost, 3-5 μm). Většinou se jedná o sorbenty na bázi silikagelu s různými povrchovými úpravami, jež umožňují využití různých mechanismů separace (hydrofilní a hydrofobní interakce, iontová výměna, afinitní mechanismus). Náplň kolony je udržována pomocí frit na obou koncích kapiláry. Výroba těchto kolon je poměrně složitá. Další nevýhodou je limitovaná stabilita, robustnost a životnost takovýchto kolon.

V kolonách s volnými konci je stacionární fáze kovalentně vázána na stěnu kapiláry.

Monolitické kolony představují novější typ stacionární fáze, který se v literatuře objevuje v posledních letech. Pokud je monolit zakotven na vnitřní stěně kapiláry, není potřeba použít frity. Další výhodou je snadný způsob přípravy tohoto typu stacionární fáze „*in situ*“ polymerizací. Monolitní stacionární fáze jsou založeny buď na bázi silikagelu, nebo se jedná o organické polymery.

3.2.5 Elektroforéza v nevodném prostředí (NACE) [46]

Elektroforéza v nevodném prostředí (NACE) je další alternativou umožňující modifikovat selektivitu. Mechanismus separace je analogický s CZE, ale místo vody je používáno nevodné prostředí. Nahrazení vody organickým rozpouštědlem má vliv na náboj analytu a/nebo na velikost solvatačního obalu. Dalším jevem, který může ovlivnit selektivitu separace, je tvorba iontových párů, která častěji probíhá v prostředí organických rozpouštědel díky nižším hodnotám dielektrické konstanty v porovnání s vodou.

Použitím nevodného prostředí zvyšujeme rozpustnost organických sloučenin, a proto je tato metoda vhodná pro analýzu nepolárních látek, např. léčiv. Na rozdíl od MEKC popřípadě MEEKC není NACE vhodná pro analýzu neutrálních látek.

Ačkoliv byly NACE a MEKC zavedeny současně v roce 1984, NACE byla poměrně opomíjena, zatímco MEKC se věnovalo hodně pozornosti. Na druhou stranu počet publikací zabývajících se NACE za posledních 10 let přibývá. Přesto NACE nadále zůstává spíše okrajovou technikou.

I přes její minoritní použití poskytuje několik nesporných výhod oproti dalším technikám: nevodné elektrolyty obecně negenerují tak vysoký elektrický proud a tím se zmenšuje riziko vzniku Jouleho tepla. To umožňuje použití krátkých kapilár za vysokého vkládaného napětí. Tím se dosáhne velmi krátkých migračních časů a vysoké separační účinnosti. Zároveň je NACE kompatibilní s většinou v CE používaných detektorů (UV, LIF, elektrochemický, MS).

V NACE se velmi často používají amfiprotní rozpouštědla (MeOH, formamid, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol a N-methylformamid) nebo aprotický acetonitril (ACN). Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných organických rozpouštědel a jejich porovnání s vodou jsou uvedeny v tabulce 3-2.

Tabulka 3-2: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti rozpouštědel používaných v CE. Upraveno dle zdroje [46]

| Rozpouštědlo | Bod varu (°C) | „UV cutoff“ (nm) | Relativní permitivita | Viskozita (mPa x s) | pK _{AU} |
|-------------------|---------------|------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| Voda | 100,0 | 190 | 78,36 | 0,8903 | 14,00 |
| Methanol | 64,5 | 205 | 32,66 | 0,551 | 16,91 |
| Ethanol | 78,2 | - | 24,55 | 1,083 | 19,10 |
| 1-propanol | 97,1 | 210 | 20,45 | 1,943 | 19,40 |
| 2-propanol | 82,2 | 205 | 19,92 | 2,044 | 21,08 |
| 1-butanol | 117,6 | 215 | 17,51 | 2,571 | 20,89 |
| Acetonitril | 81,6 | 190 | 35,94 | 0,341 | 32,20 |
| Formamid | 210,5 | - | 109,5 | 3,302 | 16,80 |
| N-methylformamid | 199,5 | - | 182,4 | 1,65 | 10,74 |
| Dimethyl sulfoxid | 189,0 | 268 | 46,45 | 1,991 | 31,80 |

Stejně jako u všech ostatních elektroforetických metod je pro realizaci separace nutná přítomnost elektrolytu. Důležitou vlastností elektrolytu je jeho tlumivá schopnost umožňující dosažení ionizace analytů a stabilní EOF. V nevodném prostředí nelze jednoduše upravit pH, tak jako u vodných pufrů, protože hodnoty autoprotolytické konstanty pK_{AU} jsou u organických rozpouštědel rozdílné oproti pK_{AU} vody. Např. u MeOH je pK_{AU} 16,91, zatímco u ACN 32,2. Jednou z možností je nastavení zdánlivého

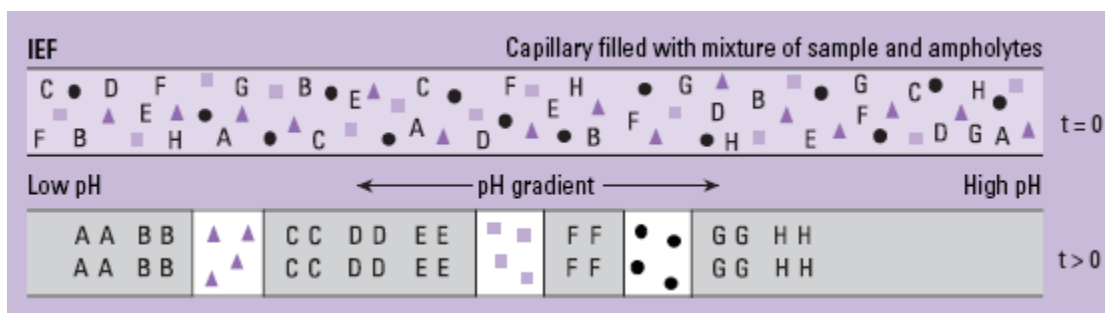
pH (pH*) a stanovení pKa analytů dle použitého rozpouštědla. Je zřejmé, že hledání optimálních podmínek je u nevodných systémů složitější. Ve většině aplikací je použit takový elektrolyt, ve kterém je dosaženo dostatečné ionizace analytů; přitom není nutné měřit pH základního elektrolytu ani stanovit přesné pKa analytu v organickém rozpouštědle.

Ve farmaceutické analýze (mnohá léčiva jsou látky bazického charakteru) se jako elektrolyt používá kyselina octová či mravenčí (o vysoké koncentraci až 1 mol/l) se svou amonnou solí (25-50 mM). V případě analýzy kyselých analytů (např. nesteroidní antiflogistika) se používá octan nebo mravenčan amonný s přidavkem amoniaku. Jako rozpouštědlo se většinou uplatňuje ACN a MeOH, a to buď jako samotná rozpouštědla, nebo ve směsi v různých poměrech.

Jelikož MeOH a ACN mají vcelku výhodné spektrální vlastnosti (UV „cutoff“), lze při jejich aplikaci využít UV detekci (zde je dosahováno podobných citlivostí jako u CZE). Na rozdíl od problémovější CZE-ESI-MS má kombinace NACE-ESI-MS některé přednosti. Hlavní výhodou NACE je použití nevodných rozpouštědel, která se snadněji odpařují, a tím ulehčují celý proces ionizace v elektrospreji. Zároveň je v nevodném elektrolytu generován menší proud, což stabilizuje podmínky pro NACE-ESI-MS. Navíc rozpouštědla jako formamid (FA) či N-methylformamid (NMF), která se těžko uplatňují při UV detekci, jsou s MS plně kompatibilní.

3.2.6 Kapilární izoelektrická fokusace [9][39]

Izoelektrická fokusace je elektroforetická metoda určená pro analýzu amfoterních sloučenin, zejména proteinů, na základě rozdílných hodnot jejich isoelektrických bodů (pI). Isoelektrický bod je pH, při kterém se amfoterní látka jeví elektricky neutrální, tzn. její kladný a záporný náboj jsou v rovnováze. Základním mechanismem separace je pohyb amfoterních sloučenin v kapiláře, ve které je pH gradient. Migrace analytu končí ve chvíli, kdy dosáhne místa, ve kterém je pH rovno jeho pI.



Obrázek 3-20: Schéma separace v kapilární izoelektrické fokusaci: písmeny je označena směs amfolytů, geometrickými znaky jsou označeny analyty. Převzato ze zdroje [15].

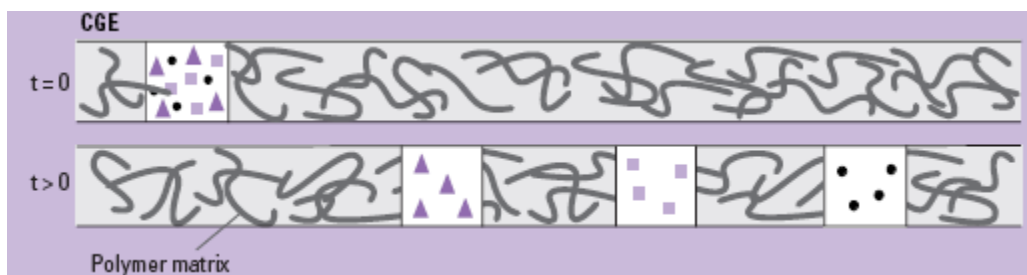
Před začátkem analýzy se kapilára plní roztokem amfolytů. Tyto molekuly jsou také amfoterní povahy a jejich směs pokrývá široký rozsah pI. Vložením napětí se v kapiláře vytvoří gradient pH (nejčastěji v rozsahu 3-10). Katoda je ponořena do roztoku silné báze (nejčastěji NaOH; tzv. katolyt) a anoda do roztoku kyseliny (H_3PO_4 ; tzv. anolyt). pH anolytu by mělo být nižší než pI nejkyselějšího amfolytu a pH katolytu by mělo být vyšší než pI nejbazičtějšího amfolytu. Tím se vytvoří pH gradient po celé délce kapiláry od kyselé oblasti (anoda) až do zásadité (katoda).

Samotná analýza se provádí nástříkem směsi amfolytů a vzorku (proteinů). Během působení napětí dochází k migraci amfolytů a proteinů až dosáhnou místa, kde pH odpovídá jejich pI. Po ukončení fokusace nastává rovnovážný stav, při kterém dochází k poklesu elektrického proudu. Amfolyty a proteiny jsou fokusovány do úzkých zón. Touto metodou tedy dochází i k zakoncentrování analytu. Vhodnou volbou amfolytů s malým rozdílem pI lze od sebe oddělit velmi podobné proteiny s poměrně vysokou účinností separačního procesu. Aby bylo možno detekovat analyty, je potřeba jednotlivé zóny uvést do pohybu směrem k detektoru. Jelikož jsou během této mobilizace také unášeny i amfolyty, je nutné, aby nerušily detekci. K mobilizaci se používá buď hydrodynamický tok, popřípadě elektroforetická mobilizace. V druhém případě je třeba zaměnit anolyt katolytem anebo obráceně. Když je anolyt nahrazen roztokem NaOH, tak po vložení napětí dochází k migraci OH^- iontů, které titrují kladný náboj proteinů a amfolytů, směrem k anodě. Analyty poté nesou jen náboj negativní a migrují také směrem k anodě, kde jsou detekovány. Jiným způsobem mobilizace je přidavek soli (nejčastěji NaCl) buď ke katolytu, anebo k anolytu a vložení napětí. Tímto způsobem opět dojde k obnovení náboje analytů a jejich následné migraci.

Pro úspěšný průběh kapilární izoelektrické fokusace je potřeba modifikovat vnitřní stěnu kapiláry, aby samotný proces nebyl narušován elektroosmotickým tokem. Vnitřní stěna kapiláry je často pokryta polyakrylamidem či methylcelulózou. Kromě toho byla také popsána jednokroková izoelektrická fokusace, u které není úplně eliminován EOF, a tím odpadá nutnost mobilizace fokusovaných zón (fokusace a migrace fokusovaných zón probíhá současně).

3.2.7 Kapilární gelová elektroforéza [14]

Gelová elektroforéza se obvykle používá k separaci proteinů a nukleových kyselin. Základním principem separace je síťový efekt polymeru, kterým je naplněna separační kapilára. Vlivem elektrického proudu nabitě analyty procházejí gelem a separují se na základě různé velikosti (malé molekuly procházejí rychleji oproti biomolekulám s vyšší molekulovou hmotností). Mezi nejčastěji používané gely patří agaróza a polyakrylamid. U této techniky je žádoucí, aby byl eliminován EOF, aby nedošlo k pohybu gelu ve směru EOF a tím k znehodnocení separace. Další výhodou odstranění EOF je snížení rizika interakcí mezi vnitřní stěnou kapiláry a analyty. Provedení gelové elektroforézy v kapilárním měřítku má oproti planárnímu uspořádání mnohé výhody. Jelikož gely mají tendenci se vlivem elektrického proudu ohřívat, což je nežádoucí pro zdárný průběh separace, přesunem do kapilárního měřítka se tento problém alespoň částečně eliminuje díky lepšímu odvodu tepla kapilárou. Následně lze použít i vyššího napětí pro separaci, což vede k vyšší účinnosti separace a rychlejšímu průběhu analýzy. Další nespornou výhodou kapilární gelové elektroforézy je detekce (nejčastěji se používá LIF), která je plně automatizovaná. Díky těmto zmíněným výhodám je gelová kapilární elektroforéza daleko méně pracná a vykazuje lepší reprodukovatelnost než její planární podoba.



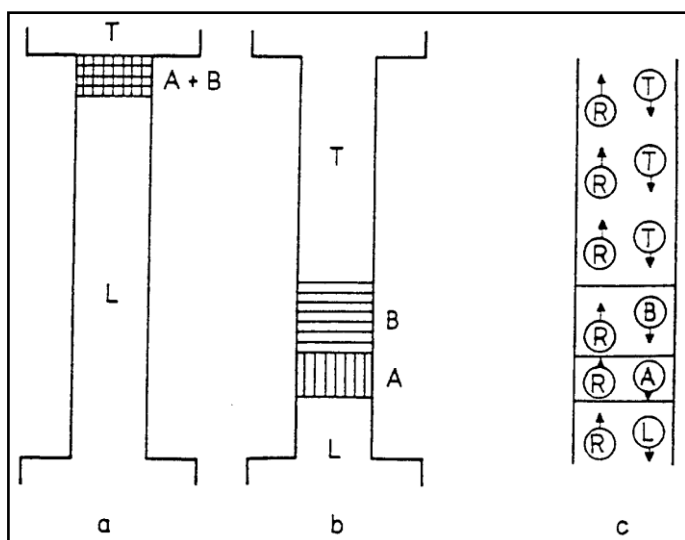
Obrázek 3-21: Schéma principu separace v kapilární gelové elektroforéze. Malé molekuly (znázorněny tečkami) jsou zadržovány méně jak větší molekuly (čtverečky, trojúhelníky). Převzato ze zdroje [15].

3.2.8 Izotachoforéza (ITP) [37][47]

Izotachoforéza je metoda, jež je realizována v systému dvou elektrolytů o různé elektroforetické pohyblivosti. V průběhu separace lze od sebe oddělit jen analyty nesoucí stejný náboj (pouze anionty nebo kationty). Při výběru elektrolytu je nutné, aby iont (buď kationt či aniont) vedoucího elektrolytu (leading – L) měl vyšší pohyblivost, μ , než jakýkoliv z analytů. Naopak koncový elektrolyt (terminátor – T) musí mít menší pohyblivost než jakýkoliv analyt. Základní podmínku, která musí být splněna, aby mohla nastat separace, lze charakterizovat následujícím vztahem:

$$\mu_L > \mu_A > \mu_B > \mu_T$$

V případě aniontové izotachoforézy mají analyty A^- a B^- menší pohyblivost než aniont vedoucího elektrolytu a zároveň vykazují vyšší pohyblivost v porovnání s aniontem příslušného koncového elektrolytu.



Obrázek 3-22: Schéma separačního procesu v izotachoforéze. A- stav před zahájením separace (A+B – směs analytů; $\mu_A > \mu_B$). B- ustálený stav. C- migrace jednotlivých iontů v ustáleném stavu. L-vedoucí elektrolyt, T-koncový elektrolyt, R- protiiont. Převzato ze zdroje [47].

Vzorek je dávkován na rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem a po nastavení pracovního elektrického proudu dojde k separaci analytů na základě jejich rozdílných pohyblivostí (viz Obrázek 3-22). V rovnovážném stavu migrují jednotlivé zóny stejnou rychlostí:

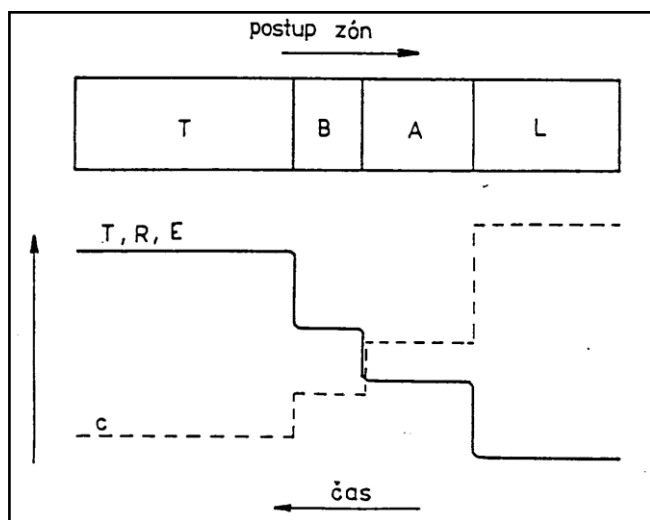
$$v = \mu_L E_L = \mu_A E_A = \mu_B E_B = \mu_T E_T = konst. \quad \text{Rovnice 3-18}$$

Jelikož je v ustáleném stavu v každé zóně přítomen iont rozdílné pohyblivosti a zóny migrují stejnou rychlostí, intenzita elektrického pole vzrůstá od zóny vedoucího

elektrolytu, kde je nejnižší, až k zóně koncového elektrolytu, kde je nejvyšší. Elektrický proud procházející zónami má konstantní hodnotu. Z platnosti Ohmova zákona vyplývá, že od zóny vedoucího elektrolytu k zóně koncového elektrolytu roste i elektrický odpor. Zároveň průchodem elektrického proudu prostředím s vyšším odporem dochází ke vzniku tepelné energie, a proto ve stejném pořadí roste i teplota zón. Z výše uvedených zákonitostí vyplývá, že zároveň se změnou odporu a intenzity elektrického pole musí dojít i ke změně koncentrací iontů v jednotlivých zónách. Na základě koncentrace iontu vedoucího elektrolytu dochází k úpravě koncentrace iontu v zóně analytu A a následně i v dalších zónách až ke koncovému elektrolytu. Koncentrace iontů v zóně vedoucího elektrolytu je nejvyšší a směrem ke koncovému elektrolytu klesá. Tato velmi důležitá vlastnost izotachoforetického procesu je popsána tzv. Kohlrauschovou regulační funkcí:

$$c_A = c_L \frac{\mu_A(\mu_L + \mu_R)}{\mu_L(\mu_A + \mu_R)} \quad \text{Rovnice 3-19}$$

Koncentrace v jednotlivých zónách je tedy závislá jen na koncentraci a charakteru vedoucího elektrolytu a ne na samotné koncentraci vzorku. Díky tomuto jevu může za vhodně zvolených podmínek dojít k zakoncentrování vzorku.



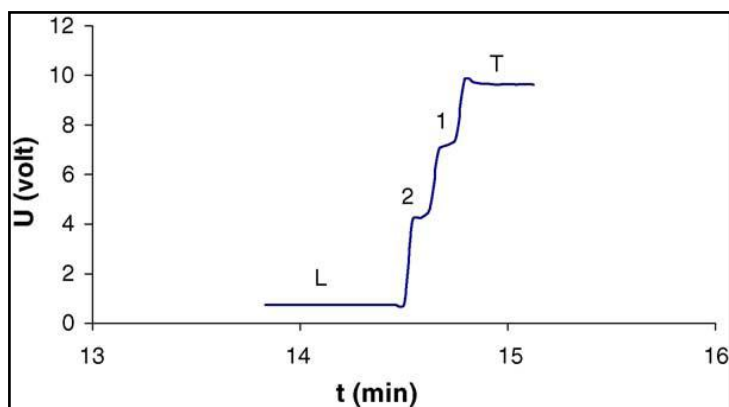
Obrázek 3-23: Závislost parametrů jednotlivých zón v závislosti na čase jejich průchodu detektorem. T- teplota, R - odpor, E- intenzita elektrického pole, c- koncentrace iontů. Převzato ze zdroje [47].

Dalším jevem, který je velmi charakteristický pro ITP, je takzvaný samozaostřovací efekt, který souvisí s rozdílnou intenzitou elektrického pole mezi jednotlivými zónami. Pokud například aniont ze zóny A na základě difúze pronikne do zóny s analytem B, kde je vyšší intenzita elektrického proudu, dojde k urychlení aniontu

A do své původní zóny. Pokud by aniont A pronikl stejným způsobem do zóny vedoucího elektrolytu, kde je menší intenzita elektrického pole, tak dojde k jeho následnému zpomalení a ocitne se zpět ve své původní zóně. Díky tomuto jevu je rozhraní mezi zónami analytů ostré a nedochází k jejich rozmývání.

Přístrojové uspořádání je velmi obdobné jako u klasické elektroforézy jen s tím rozdílem, že se místo křemenných kapilár používají kapiláry z fluorovaných polymerů, u kterých je minimalizován elektrosmotický tok. Ten by působil rušivě na ostrost rozhraní jednotlivých zón. U izotachoforetických analyzátorů se také používají kapiláry s vyšším vnitřním průměrem (až 0,5 mm). Velmi často se také využívá přídavku neionogenních tenzidů (polyvinylalkohol, hydroxyethylcelulóza), aby se minimalizovala adsorpce ionogenních látek na vnitřní stěnu kapiláry. Tímto přídavkem se zároveň zvýší i viskozita elektrolytu, což přispívá ke stabilizaci zón. Další rozdíl je ve způsobu detekce, který bývá velmi často založen na fyzikálních vlastnostech jednotlivých zón. Nejčastěji se používá vodivostní detekce, která je založená na měření vodivosti jednotlivých zón. Vedle tohoto způsobu byl také popsán detektor teplotní a potenciometrický, ale ty se v současnosti již nepoužívají. Kromě toho lze využít i klasický spektrofotometrický detektor, který je založen na spektrálních vlastnostech jednotlivých analytů.

Záznam z měření se nazývá izotachoforeogram (viz obr. 3-24). Na ose „x“ je čas a na ose „y“ je měřená vlastnost zóny, nejčastěji vodivost. Záznam je stupňovitý a odráží skokové změny vodivosti mezi zónami. Pro kvalitativní analýzu je směrodatná výška (poloha vlny) a pro kvantitativní analýzu určujeme délku vlny, která odpovídá koncentraci analytu v zóně. Porovnáním délky zón standardu a analytu, či metodou standardního přídavku lze určit koncentraci analytu v neznámém vzorku.



Obrázek 3-24: Izotachforeogram 0,5 mM roztoku acebutololu (1) a 0,1 mM tetraetylamonných iontů (2). Separční podmínky: 10 mM kyselina octová s 10 mM octanem draselným (L, pH 4,65) a 10 mM β -alanin (T). Převzato ze zdroje [48].

3.3 Chirální separace

Studium stereochemie biologicky aktivních sloučenin je klíčové k porozumění rozdílného působení stereoisomerů v živých soustavách. Toto platí také pro mnohá léčiva, a proto je nutné studovat farmakokinetiku a farmakodynamiku jednotlivých optických izomerů potencionálních opticky aktivních léčiv. Jednotlivé enantiomery totiž mohou vykazovat diametrálně rozdílný biologický účinek.

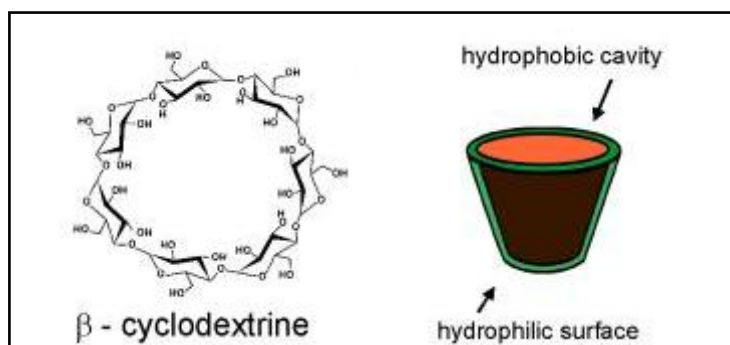
Úkolem farmaceutického průmyslu je produkovat účinná, bezpečná a kvalitní léčiva; proto je nezbytné během vývoje nového chirálního léčiva testovat farmakologické a toxikologické účinky jednotlivých optických izomerů. Z tohoto důvodu je také kladen požadavek na vývoj rychlých, správných, reprodukovatelných a citlivých enantioselektivních separačních metod a to nejen pro studium farmakokinetiky a metabolického osudu takovýchto látek, ale i pro kontrolu jakosti chirálně čistých léčiv, kde je přítomnost druhého enantiomeru nežádoucí a jeho obsah v koncovém léčivém přípravku je limitován. Vedle chromatografických metod (HPLC, GC) je pro enantioselektivní separace vhodná i kapilární elektroforéza a to zejména pro svoji vysokou separační účinnost. Vedle toho je chirální separace v elektroforetickém provedení méně finančně nákladná (není třeba pořizovat drahé chirální stacionární fáze) a flexibilnější co se týká kvalitativního i kvantitativního uplatnění chirálních selektorů v separačním médiu [49].

3.3.1 Provedení chirálních separací pomocí CE [50]

V principu existují dva základní způsoby, jakým lze od sebe oddělit 2 enantiomery opticky aktivní látky. Pracnějším a dnes již méně často používaným způsobem je zavedení dalšího optického centra do molekuly. Tímto způsobem vzniknou dva diastereomery, které mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti, a proto je možné je rozdělit v achirálním prostředí. Kromě časové náročnosti je třeba dbát zvýšené pozornosti při výběru derivatizačního činidla, které musí být chirálně čisté. Dalším problémem, který se může vyskytovat, je rozdílná kinetika derivatizační reakce pro každý z produktů, což se může projevit různou odezvou detektoru pro vzniklé diastereomery. Proto se v dnešní době spíše uplatňují přímé separace enantiomerů v chirálním prostředí bez potřeby derivatizace. V tomto případě je k základnímu elektrolytu přidán chirální selektor, který interaguje s enantiomery za vzniku labilních

diastereomerních komplexů. Při vzniku těchto komplexů se uplatňují slabé typy intermolekulárních interakcí (vodíkové můstky, π - π a hydrofobní interakce). Základní podmínkou, aby proběhla separace dvou enantiomerů, je vznik komplexů o různé stabilitě, čímž je zajištěno, že tyto dva analyty migrují různou rychlostí. Mezi nejčastěji používané chirální selektory patří cyklodextriny, které interagují s enantiomery za vzniku tzv. hostitelských komplexů. Na stejném principu fungují další, již méně často používané selektory, jako např. crown-ethery či makrolidová antibiotika. Soli žlučových kyselin a proteiny využívají jiných mechanismů a lze je použít jako alternativu k výše zmíněným selektorům.

Cyklodextriny (CD). Jedná se o cyklické přírodní oligosacharidy složené z několika jednotek glukopyranóz. Vzhledem k tomu, že je glukóza chirální, tak i cyklodextriny jsou opticky aktivní sloučeniny. V analytické chemii se za účelem chirálních separací používají CD složené z šesti, sedmi či osmi molekul glukózy; podle počtu jednotek glukózy se označují jako α , β či γ -CD. Cyklodextriny mají kónický tvar s hydrofobní dutinou. Vnější část je převážně hydrofilní, díky primárním a sekundárním –OH skupinám. Díky této struktuře jsou rozpustné ve vodě a zároveň mohou do jejich hydrofobních dutin vnikat sloučeniny s nepolárními skupinami. Zároveň míru interakce mezi analytem a CD ovlivňuje i velikost molekuly cyklodextrinu (průměr a hloubka dutiny).



Obrázek 3-25: Schéma struktury β -cyklodextrinu (vlevo) a jeho prostorového uspořádání (schematicky vpravo). Převzato ze zdroje [51].

Volné hydroxy skupiny jednotek glukózy v polohách 2, 3 a 6 mohou být modifikovány za vzniku různých derivátů, které mají oproti přírodním cyklodextrinům jiné vlastnosti a tudíž mohou ovlivnit selektivitu enantioseparace. Mezi nejvýznamnější vlivy modifikace patří zlepšení rozpustnosti CD, silnější interakce s analytem a analýza nenabíých enantiomerů v prostředí nabitých cyklodextrinů. Například 2,6-di-O-methyl-

β -CD je výrazně rozpustnější ve vodě než nativní β -CD. Tento derivát má díky dvěma methoxy skupinám hlubší a hydrofobnější kavitu.

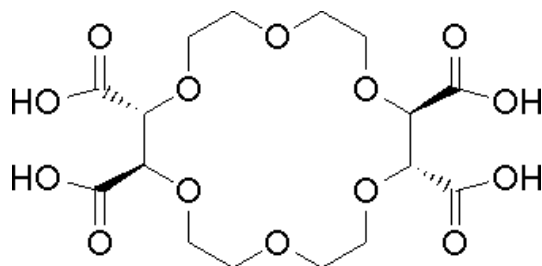
Selektivita chirální separace je ovlivněna zejména typem a koncentrací cyklodextrinu. Základním parametrem ovlivňujícím možnost vzniku hostitelských komplexů je rozměr kavity CD. Proto se řídí výběr vhodného CD velikostí a tvarem molekuly analytu. U substituovaných CD hraje důležitou roli také stupeň substituce (DS, degree of substitution). Dalším faktorem, který výrazně mění selektivitu chirální separace, je náboj substituovaných cyklodextrinů. Pokud jsou tyto nabitě CD použity jako chirální selektory, je stereoselektivita ovlivněna mj. elektrostatickými interakcemi s analyty.

Velmi často se ke zvýšení rozlišení využívá opačného směru migrace selektoru vůči analytu [52][53]. Tzn., že v případě bazických sloučenin (pozitivně nabitě) se používají negativně nabitě CD (karboxymethyl-CD, sulfatovaný-CD), které mají tendenci migrovat opačným směrem a následně dochází k silnějším a delším interakcím mezi CD a analytem. Často bývá separace různých enantiomerů dosaženo při analýze za obráceného nebo minimálního EOF (velmi často v kyselém BGE, kdy je pH nižší než 3 a vedle potlačení EOF jsou bazické analyty dostatečně ionizovány). Obrácením polarity (na straně detektoru je anoda) mohou být kladně nabitě sloučeniny (vektor vlastní pohyblivosti směřuje na opačnou stranu než vektor pohyblivosti nabitěho selektoru) separovány pouze na základě interakcí s negativně nabitým chirálním selektorem (pokud je potlačen EOF). Komplexace mezi kladně nabitým analytem, a opačně nabitým selektorem jsou založeny jak na ion-párových interakcích, tak i na vzniku hostitelských komplexů [52][53].

Pokud neutrální analyty interagují s nabitým CD, tak nesou stejný náboj jako tento CD, a proto nemigrují s EOF.

Crown-ethery. Tyto makromolekuly objevené Pedersenem roku 1967 umožňují chirální separace tvorbou hostitelských komplexů, jejichž charakter je jiný než u komplexů s CD. Dutina crown etherů je hydrofilní (díky přítomnosti heteroatomů O a S), a proto do kavity vniká hydrofilní část molekuly analytu. Základním strukturním předpokladem pro vznik hostitelského komplexu je přítomnost aminoskupiny. Kromě tohoto mechanismu se na vzniku těchto komplexů mohou uplatňovat i jiné vlivy jako např. elektrostatické interakce, či sterické efekty, za které jsou u 18-crown-6-ether

tetrakarboxylové kyseliny zodpovědné čtyři karboxylové skupiny navázané na základní strukturu crown-etheru. Jelikož crown ethery ochotně interagují i s anorganickými kationty, je třeba se vyvarovat přítomnosti K^+ , Na^+ a NH_4^+ v BGE.



Obrázek 3-26: Strukturální vzorec (+)-(18-crown-6-ether)-2,3,11,12-tetrakarboxylové kyseliny.

Chirální micely. Mezi nejčastěji používané chirální selektory této skupiny patří deriváty žlučových kyselin. Jedná se o sodnou sůl kyseliny cholové a deoxycholové a jejich konjugátů s taurinem (taurocholát a taurodeoxycholát). Jelikož tauroderiváty obsahují sulfoskupinu, jsou tyto micely negativně nabitě i při nízkém pH. Kromě samotných chirálních micel se pro chirální separace využívá také přidavku CD k BGE, který obsahuje nechirální micelu (např. SDS) – poté hovoříme o cyklodextriny modifikované MEKC.

Proteiny. Při použití proteinů jako chirálních selektorů dochází během separace k tvorbě nestabilních diastereomerních komplexů. Nevýhodou použití proteinů jako chirálních selektorů je nebezpečí jejich adsorpce na vnitřní stěnu kapiláry, a proto je nutné používat potahované kapiláry, u kterých je redukován elektroosmotický tok. Mezi další limitace patří možná nestabilita použitého proteinu či nemožnost UV detekce při nižších vlnových délkách. Jako příklad aplikace lze uvést využití avidinu (protein s pI 10,0-10,5) pro analýzu kyselých analytů. Jelikož tento protein obsahuje velké množství bazických skupin, je v kyselém a neutrálním prostředí kladně nabitý a migruje v opačném směru než analyty.

Polysacharidy. Z polysacharidů se více uplatňují nabitě polymery jako heparin či dextran sulfát [54].

Makrocyclická antibiotika. Z makrocyclických antibiotik se nejvíce používají vankomycin, ristocetin A, teikoplanin a rifamicin B. Jelikož se jedná o nabitě sloučeniny, dají se použít jak k separaci nabitých, tak i nenabitých analytů. Rifamicin B je chirální selektor kyselé povahy, a proto se nejčastěji uplatňuje v analýze zásaditých

látek. Zbylá antibiotika se převážně používají k analýze kyselých analytů (např. nesteroidní protizánětlivé látky) [54].

3.3.2 Chirální CEC

Chirální separace se dají realizovat i u „hybridní“ metody jakou je kapilární elektrochromatografie. K provedení enantioselektivní separace je nutné na sorbent navázat příslušný chirální selektor. Jak již bylo v předchozím textu zmíněno, sorbenty založené na bázi silikagelu se výrazně podílejí na vzniku elektroosmotického toku, který je hnací silou separace. Navázání chirálního selektoru na základní nechirální sorbent může ovlivnit intenzitu elektroosmotického toku. Selektory jako např. makrocyclická antibiotika obsahují ionizovatelné skupiny, které mohou ovlivnit EOF v závislosti na pH pufru. Takto vzniklý EOF může mít stejný, anebo opačný směr v porovnání s EOF, který vzniká přítomností samotného sorbentu. Naopak neutrální sorbenty mohou stínit ionizované či ionizovatelné funkční skupiny náplně kolony a tak snížit intenzitu EOF. V tomto případě se tento „neutralizační“ efekt zesiluje s vyšším stupněm substituce základního sorbentu pro CEC. Pro chirální CEC separace se používají sorbenty, které se běžně uplatňují při chirálních separacích v HPLC. Mezi nejčastěji využívané patří stacionární fáze založené na polysacharidech, cyklodextrinech a jejich derivátech, makrocyclických antibioticích, proteinech atd. [55].

Kromě použití enantioselektivních sorbentů lze chirálních separací docílit též použitím pufru s obsahem CD a nechirální stacionární fáze [55].

3.4 Tvorba komplexů za účelem zvýšení selektivity

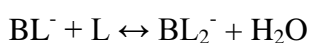
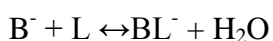
Tvorba komplexů je jedním z efektivních způsobů, jak ovlivnit selektivitu separace. Podmínkou je, aby komplexy, které vznikají, měly rozdílnou velikost a/nebo odlišnou stabilitu, aby bylo dosaženo rozdílné elektroforetické pohyblivosti pro jednotlivé analyty. Kinetika komplexotvorné reakce musí být také dostatečně rychlá, aby bylo dosaženo ostrých píků. Pokud by tomu tak nebylo, docházelo by k rozšíření zóny analytu vlivem rozdílné rychlosti migrace volného analytu (který migruje svou elektroforetickou pohyblivostí) a v komplexu vázané formy (která migruje rozdílnou rychlostí; většinou pomaleji) [56].

Nejčastěji se tvorba komplexů používá pro separaci anorganických kationtů (kovů) po komplexaci s vhodným ligandem, který je přidán do základního elektrolytu. Nejběžnějšími ligandy jsou jednosytné či vícesytné organické karboxylové kyseliny, hydroxykyseliny a EDTA [56][57]. Vznik komplexů mezi těmito organickými ligandy a kationty kovů lze naopak využít i pro separaci organických sloučenin za přídavku kationtu do základního elektrolytu. Tento způsob ovlivnění se v porovnání s prvním používá méně, protože použití kationů v základním elektrolytu se projeví nižší reprodukovatelností a účinností. To lze vysvětlit adsorpcí kationtů na vnitřní stěnu kapiláry a následným rozšířením zón jednotlivých analytů, které se projeví rozšířením píků. Přidáním negativně nabitých micel k BGE či otočením/potlačením EOF lze tyto negativní jevy eliminovat [56]. Jako příklad lze uvést separaci organických kyselin (kávová, benzoová, ftalová, nikotinová a další) pomocí elektrolytů obsahujících některý z dvojmocných kovových iontů (např. Mg, Ca, Mn, Co, Ni, Cu). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s ionty Cu^{2+} a Ni^{2+} a s potahovanými kapilárami, kdy jsou potlačeny interakce chelátoru s vnitřní stěnou kapiláry [58].

Dalším příkladem je použití opticky aktivních komplexů mědi (Cu^{2+}) pro chirální separace dansyl derivátů aminokyselin a α -hydroxykyselin. V tomto případě je do základního elektrolytu kromě Cu^{2+} iontů přidáván také chirální ligand (aspartam, L- nebo D-prolin, L- nebo D-hydroxyprolin), se kterým Cu^{2+} ionty tvoří komplex, který slouží jako chirální selektor. Separace racemických směsí je založena na tvorbě komplexů různé stability mezi enantiomery analytu a přidaným opticky aktivním komplexem mědi. Během vývoje takovýchto metod je kromě ostatních separačních

podmínek třeba optimalizovat kvalitativní složení a poměr jednotlivých složek chirálního komplexu, který slouží jako chirální selektor [50] [56].

Jiným velmi oblíbeným komplexačním aditivem je borát, který se používá k separaci polyolů (sacharidů, flavonoidů, fenolických kyselin aj.). Při separaci cukrů se využívá tvorby negativně nabitých komplexů s tetrahydroxyborátovým aniontem při pH 8-12. Vznik těchto komplexů je klíčový, protože cukry jsou i při silně alkalickém pH neutrální a migrují spolu s EOF. Tvorbou negativně nabitých borátových komplexů různé stability lze docílit jejich elektroforetické separace. Tvorba těchto komplexů může být schematicky popsána těmito rovnicemi:

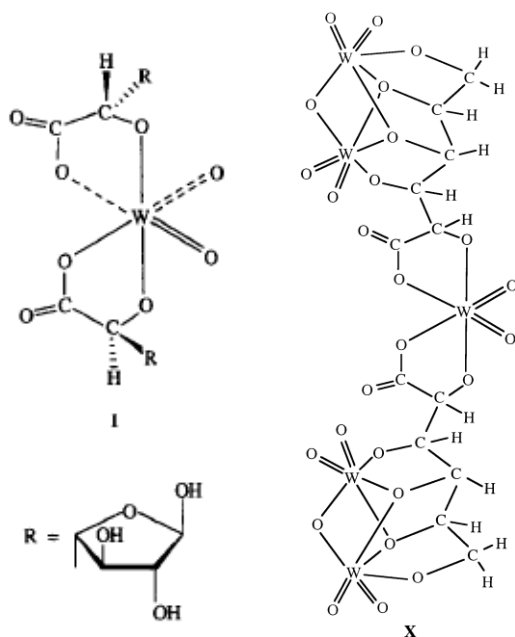


kde L je ligand (polyol) a B^- představuje tetrahydroxyborátový aniont $B[OH]_4^-$. Kromě toho, že borátový pufr umožňuje separaci sacharidů, lze použitím tohoto komplexačního BGE docílit přímé UV detekce při nízkých vlnových délkách. Vodný roztok cukrů neabsorbuje v UV oblasti, kdežto komplexy s borátem vykazují vlastní absorpci při 195 nm, takže není nutná jejich derivatizace. Na druhou stranu však nelze tímto způsobem docílit limitů detekce dostatečných pro stopovou analýzu [59].

Obdobných principů se využívá také pro tvorbu borátových komplexů s jinými sloučeninami charakteru polyolů jako jsou například fenolické kyseliny či flavonoidy. V základním elektrolytu obsahujícím borát (pH 8-11) dochází k ionizaci kyselých funkčních skupin (karboxyl, fenolický hydroxyl) a zároveň u sloučenin disponujícími vicinálními hydroxy skupinami vznikají negativně nabité komplexy s borátem. Naopak u sloučenin, které postrádají vicinální hydroxyskupiny, nedochází k ovlivnění elektromigrace vznikem takovýchto komplexů. Využití borátového pufru pro stanovení polyfenolů bylo demonstrováno v mnoha pracích – jen na okraj můžeme zmínit jejich stanovení v mnoha matricích, jako jsou hrozny [60], červené víno [61], olivový olej [62] a čaj [63][64]. Analýza polyfenolů pomocí elektromigračních metod byla také přehledně shrnuta v souhrnných člancích [65][66]. Nevýhodou použití borátového pufru pro analýzu flavonoidů a fenolických kyselin, které mají výrazné antioxidační vlastnosti, je možnost jejich spontánní oxidace vzdušným kyslíkem při alkalickém pH [67][68][69]. Např. katechiny, které jsou čestně zastoupeny v čaji, jsou stabilní v kyselém prostředí [67][68]. Zvýšením pH z 5,0 na 7,4 se zvýší i rychlost oxidační

reakce. Při hodnotách pH vyšších než 8,0 dochází ke kompletní oxidační degradaci katechinů během několika minut [67]. Obdobně byla studována stabilita roztoku kvercetinu (pH 8-10), který byl probubláván vzduchem. Po jedné hodině oxidace vzdušným kyslíkem došlo k zoxidování 86 % původního množství kvercetinu a po 3,5 hodinách již byla koncentrace kvercetinu nulová [69].

Jako alternativa se nabízí použití základních elektrolytů v neutrální či mírně kyselé oblasti, u kterých je riziko spontánní oxidace polyfenolů vzdušným kyslíkem výrazně sníženo. V neutrální oblasti lze k separaci využít přídavek Mo(6+) či W(6+), které se chovají analogicky jako borát – tedy tvoří záporně nabitě komplexy se sloučeninami obsahujícími vicinální hydroxy skupiny. Pro jednoduché 1,2-difenoly (katechol, pyrogallol) lze očekávat po přídavku komplexačního činidla ve formě XO_4^{2-} komplexu složení $[XO_2L_2]^{2-}$ [70]. Vznik těchto komplexů nastává již při velmi nízkých koncentracích komplexačního činidla (~mM) a vzniklé komplexy se vyznačují vyšší stabilitou oproti analogickým borátovým komplexům [70].



Obrázek 3-27: Příklady komplexů wolframanu s polyoly. Vlevo: Jednoduchý komplex s kyselinou galakturonovou. Převzato ze zdroje [71]. Vpravo: Polynukleární komplex s kyselinou gulonovou. Převzato ze zdroje [72]

Struktura a stabilita těchto komplexů zatím byly zkoumány jen pro sacharidy a hydroxykyseliny, nikoliv pro flavonoidy či fenolické kyseliny. Velmi rozsáhlé studie vzniků komplexů molybdenanu a wolframanu se sacharidy (kyseliny glukuronová [71], galakturonová [71], gulonová [72] aj.) byly publikovány týmem Dr. Ramose. Struktura

vzniklých mononukleárních a polynukleárních komplexů cukrů s molybdenanem či wolframanem byla objasněna pomocí NMR. Vznik, stabilita a struktura těchto komplexů byla ovlivněna jak hodnotou pH, tak i poměrem centrálního iontu a ligandu v roztoku [71][72].

Kromě toho byly zkoumány komplexotvorné rovnováhy i s jinými ligandy (kyselina citronová [73], mléčná [74] a mandlová [75], chinolonová ATB [76] - ciprofloxacin, ofloxacin a norfloxacin) s wolframanem, molybdenanem popřípadě i s vanadičnanem. Využití molybdenanu či wolframanu jako komplexačních činidel v kapilární elektroforéze je prozatím minimální. Dříve byla popsána separace Sb^{3+} a Bi^{3+} po reakci s heteropolyaniontem $[\text{P}(\text{W}_{11}\text{O}_{39})^{7-}]$ [77]. Pro separaci fenolických kyselin a flavonoidů byl využit základní elektrolyt s přídavkem Na_2MoO_4 [7]. V této práci, která byla realizována na našem pracovišti, bylo docíleno separace jak fenolických kyselin, tak i flavonoidů. Fenolické kyseliny (ferulová, kávová, 3-hydroxyskořicová, a skořicová) byly rozděleny v elektrolytu obsahujícím 25 mM MES a 0,15 mM Na_2MoO_4 (upraveno na pH 5,4 TRISem). K rozdělení směsi flavonoidů s fenolickými kyselinami bylo použito jiného elektrolytu s vyšším přídavkem komplexačního činidla – 25 mM HEPPSO + 2 mM Na_2MoO_4 , pH 7,4 (upraveno TRISem), 25 % (v/v) MeOH. Separace byla v obou případech provedena v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 100 μm . UV detektor byl nastaven na 280 resp. 263 nm. Praktická využitelnost metody byla demonstrována na analýze extraktů z heřmánku a třezalky tečkované.

3.5 Vývoj a optimalizace elektroforetických metod

Cílem při vývoji a optimalizaci separačních metod, a tedy i metod elektromigračních, je dosáhnout úplného rozlišení mezi analyty, co nejvyšší separační účinnosti a zároveň dostatečné citlivosti pro praktické využití metody. Kromě toho by analýza měla být co nejkratší. Nejdříve budou definovány termíny počet teoretických pater a rozlišení, a poté budou diskutovány parametry, které ovlivňují kvalitu a rychlost separace. Dále bude stručně popsána i multivariantní optimalizace.

3.5.1 Účinnost a rozlišení

Účinnost elektroforetické separace se vyjadřuje jako počet teoretických pater a z experimentálních údajů se dá snadno vypočítat [39]:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Rovnice 3-20}$$

kde t_m je migrační čas a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. Čím je pík při stejném migračním čase užší, tím roste počet teoretických pater a vzrůstá účinnost separace. Pokud dochází k rozmývání píků je hodnota $w_{1/2}$ vyšší a účinnost separace nižší.

Někdy se účinnost vyjadřuje jako výškový ekvivalent teoretického patra:

$$H = \frac{l_t}{N} \quad \text{Rovnice 3-21}$$

kde l_t je efektivní délka kapiláry a N je počet teoretických pater [15]. U metod, které se vyznačují vysokou účinností, je H velmi malé.

Rozlišení je parametr, který určuje, zda jsou píky rozděleny na základní linii. Z experimentálních údajů lze rozlišení vypočítat [39]:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad \text{Rovnice 3-22}$$

kde t_1 a t_2 jsou migrační časy látek ($t_1 < t_2$) a w_1 a w_2 jsou šířky píků měřené na základní linii¹.

¹ Tento způsob výpočtu rozlišení udává i USP 30 [85].

3.5.2 Které separační podmínky se optimalizují?

Faktory, které ovlivňují kvalitu separace, tedy zda analyty od sebe budou odděleny, byly již částečně diskutovány při popisu mechanismu separace v kapitole 3.2. Z obecného hlediska separaci ovlivníme mj. změnou EOF a elektroforetické pohyblivosti jednotlivých analytů, kterých lze dosáhnout úpravou mnoha separačních podmínek. Mnohdy lze změnou jednoho parametru ovlivnit jak intenzitu EOF, tak elektroforetickou pohyblivost.

Jedním z hlavních parametrů, který ovlivňuje separaci, je složení základního elektrolytu (kvalitativní složení, iontová síla a koncentrace, pH). Selektivitu separace mohou ovlivňovat různá aditiva, jak již bylo diskutováno v kapitole 3.2 : přídavek povrchově aktivních látek (obrácení toku, MEKC, MEEKC, chirální separace), tvorba hostitelských komplexů (CD, crown ethery), přítomnost dalších komplexačních činidel (viz kapitola 3.4), síťující prostředí (gelová elektroforéza), nevodná rozpouštědla (CZE, MEKC, MEEKC, NACE) aj. Kromě složení vlastního separačního média má na separaci výrazný vliv také délka a průměr kapiláry, teplota, velikost vkládaného napětí, způsob dávkování a promývání kapiláry.

Složení základního elektrolytu. Výběru základního elektrolytu by měla být věnována velká pozornost, protože určuje jak velikost EOF, tak i migraci (pohyblivost) samotných analytů. Nemalý vliv má také na intenzitu vznikajícího elektrického proudu během separace. Základní složkou BGE je pufr, tedy směs kyseliny a její konjugované zásady, který je schopen udržet určité pH. Stabilita pH hraje klíčovou roli při vzniku EOF, který musí mít stejnou rychlost, aby bylo dosaženo reprodukovatelných migračních časů. Nemalý význam má také pH základního elektrolytu při ionizaci analytů. Kyselé látky se analyzují v BGE zásaditého charakteru. U bází se naopak analýza provádí v kyselých BGE. Přitom je nutno zajistit, aby tlumivá soustava BGE měla dostatečnou tlumivou kapacitu. To znamená, že pH pufru založeného na kyselině či bázi o určité hodnotě pK_a by se mělo pohybovat v rozmezí $pH = pK_a \pm 1$. Pufry se nejčastěji připravují smícháním kyseliny a její konjugované zásady v předepsaném poměru, a tak vznikne roztok o určitém pH. Jiným způsobem může být částečná neutralizace kyseliny příslušnou bází [78].

Složení základního elektrolytu má také vliv na symetrii píků a tím i na účinnost separace. Pokud je použit elektrolyt, který je tvořen spoluiontem o rozdílné

pohyblivosti, dochází k jevu, který se nazývá elektromigrační disperze. Když má analyt vyšší elektroforetickou pohyblivost v porovnání se spoluiontem základního elektrolytu, existuje v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Pokud ionty vzorku z čelního rozhraní zóny proniknou podélnou difuzí do zóny elektrolytu, dochází k jejich urychlení (v zóně elektrolytu s iontem o nižší pohyblivosti je vyšší intenzita elektrického pole) a rozmytí čelního rozhraní. Opačně, pokud se ionty vzorku ze zadního rozhraní zóny vzorku dostanou difuzí do zóny elektrolytu, dojde k jejich urychlení zpět do zóny vzorku a tím je zadní rozhraní zaostřováno. Tímto se vytvoří nesymetrický pík s rozmytým předním rozhraním a ostrým koncem (fronting). Analogicky je tomu u vzorku s nižší pohyblivostí iontů v porovnání se základním elektrolytem. V tomto případě mají píky ostré přední rozhraní a zadní rozhraní je rozmyté (tailing). Pokud je pohyblivost elektrolytu stejná jako u iontů vzorku, zóna analytu není ovlivněna elektrodisperzí (vzniká symetrický pík) [13][15].

Tabulka 3-3: Seznam v CE nejčastěji používaných pufrů a jejich vlastností. Upraveno dle zdrojů [54] a [78].

| Pufr | pKa | Rozsah pH | Minimální λ (nm) |
|--------------|------------|------------------|--|
| Fosfát (pK1) | 2,12 | 1,1-3,1 | 195 |
| Fosfát (pK2) | 7,21 | 6,2-8,2 | 195 |
| Fosfát (pK3) | 12,32 | 11,3-13,3 | 195 |
| Citrát (pK1) | 3,1 | 2,1-6,4 | 260 |
| Citrát (pK2) | 4,7 | | |
| Citrát (pK3) | 5,4 | | |
| Mravenčan | 3,75 | 2,8-4,8 | 220 |
| Octan | 4,75 | 3,8-5,8 | 220 |
| MES | 6,15 | 5,2-7,2 | 230 |
| TRIS | 8,30 | 7,3-9,3 | 220 |
| Borát | 9,14 | 8,1-10,1 | 180 |

Vedle těchto faktorů je třeba také optimalizovat koncentraci, popř. iontovou sílu základního elektrolytu. Zvýšením koncentrace či iontové síly BGE se prodlužuje celková doba analýzy (analyty migrují pomaleji) a zároveň je generován vyšší elektrický proud. Pokud proud přesáhne hodnotu 100 μ A, výrazně se zvyšuje

pravděpodobnost vzniku Jouleho tepla a pokud toto není dostatečně odváděno, snižuje se reprodukovatelnost výsledků [78]. Současně také může dojít ke vzniku teplotního gradientu v kapiláře. Ten se projeví změnou viskozity základního elektrolytu a následnou deformací migrujících zón (rozšířené píky) [15].

Aditiva. Přídavkem různých aditiv k BGE můžeme výrazně změnit mechanismus separace a tím i ovlivnit selektivitu celého separačního procesu. V předchozích kapitolách byl již vliv různých přídavných složek BGE diskutován. Při výběru aditiv, která nesou náboj (SDS, sulfatované CD), si je třeba uvědomit, že tyto látky ovlivňují jak pH základního elektrolytu, tak i velikost proudu, který prochází kapilárou [78]. V případě použití sulfatovaných CD se za účelem prodloužení životnosti kapiláry doporučuje promývat mezi analýzami kapiláru roztokem 0,1 M H_3PO_4 [53].

Rozměry kapiláry. Kapiláry s menším vnitřním průměrem generují menší elektrický proud a zároveň lze jejich použitím dosáhnout lepšího rozlišení mezi analyty. Na druhou stranu jsou tyto výhody na úkor citlivosti (zejména při použití UV-VIS detektoru). Kromě vnitřního průměru má vliv na separaci celková délka a efektivní délka kapiláry. Použitím kratších kapilár je opět generován vyšší proud. Nalezením kompromisu mezi celkovou délkou, efektivní délkou a vnitřním průměrem kapiláry lze dosáhnout rychlých a citlivých separací charakterizovaných vysokou účinností.

Teplota. Vliv teploty na separaci je velmi významný. V případě, že teplo produkované průchodem elektrického proudu kapilárou není dostatečně odváděno, hrozí vznik tzv. Jouleho tepla, které negativně ovlivňuje separaci [13][15]. Kromě tohoto negativního jevu lze termostátováním kapiláry ovlivnit rychlost separace. Zvýšením teploty migrují látky rychleji, což má za následek zkrácení doby analýzy [13]. V případě „short-end-injection“ je zase žádoucí, aby analyty migrovaly pomaleji z důvodu dosažení dostatečného rozlišení na krátké efektivní délce a tak se naopak kapilára chladí a separace probíhají například i při teplotě 10 °C [11].

Dávkování. Velikost zóny vzorku, která byla vpravena do kapiláry, má vliv jak na účinnost, tak i na rozlišení. V případě hydrodynamického dávkování se optimalizují tlak a doba nástřiku, u elektrokinetického dávkování napětí a čas, po které je toto napětí aplikováno. Pro dosažení co nejvyšší účinnosti je žádoucí dávkovat co nejmenší objemy, což je v rozporu s požadavkem na citlivost stanovení. Obvykle se dávkuje

takové množství, aby bylo dosaženo kompromisu mezi citlivostí a účinností. Nejčastěji se nastříkuje objem vzorku odpovídající 1 až 2% celkové délky kapiláry [13][15].

Další separační podmínky jako **napětí** (viz kapitola 3.2.1) a **promývání kapiláry** (viz kapitola 3.1.1) již byly dříve dostatečně diskutovány.

3.5.3 Univariantní vs. multivariantní optimalizace [79][80][81]

V kapitole 3.5.2 a i v předchozích částech textu bylo zmíněno mnoho faktorů, které je nutné optimalizovat, aby bylo dosaženo separace analytů v co nejkratším možném čase a s co nejvyšší citlivostí. Nejčastějším způsobem optimalizace je tzv. univariantní optimalizace (někdy také označována jako step-by-step), kdy je zkoumaný parametr separace měněn v určitém rozsahu, zatímco zbylé separační podmínky jsou konstantní. Tento způsob optimalizace však s sebou přináší dvě značné nevýhody:

1. Zkoumání vlivu všech proměnných vyžaduje mnoho experimentů, což je časově náročné a drahé.
2. V případě, že se jednotlivé parametry separace vzájemně ovlivňují, není možné v průběhu takovéto optimalizace tyto interakce odhalit. Zároveň se nalezené „optimální“ separační podmínky mohou výrazně odlišovat od těch skutečně optimálních.

Jako alternativu můžeme využít multivariantní optimalizaci, která využívá statistických metod a matematického modelování k určení optimálních separačních podmínek.

K plánování experimentů, které je třeba provést pro vlastní optimalizaci, je možno aplikovat koncept „design of experiments“ (DOE). Během tohoto kroku je studován vliv faktorů (koncentrace základního elektrolytu, jeho pH, teplota, vkládané napětí aj.) na klíčové parametry separačního procesu² (rozlišení píků, celková doba analýzy, generovaný elektrický proud aj.). Výhodou tohoto přístupu je nejen výrazné snížení počtu experimentů nutných pro optimalizaci vlastní metody, ale i určení vzájemných interakcí mezi faktory. Kromě toho lze na základě výsledků zjistit, které faktory či jejich interakce jsou opravdu klíčové pro zdárný průběh separace.

Mezi často používané postupy plánování experimentů patří plně faktoriální design (full factorial design), částečně faktoriální design (fractional factorial design),

² V dalším textu budou označeny obecným výrazem „response“.

Plackett-Burmanův design, centrálně kompositní design aj. Výběr samotného postupu závisí na počtu studovaných faktorů a „response“ a také na výběru matematického modelu, kterým je popsán vliv faktorů na „response“(viz dále).

Nejjednodušším designem pro plánování experimentů je tzv. plně faktoriální design, u kterého se studují (měří) všechny kombinace faktorů (k) na všech úrovních (m). Počet potřebných experimentů, který je nutno provést pro vlastní optimalizaci a studium vlivu různých faktorů na separační podmínky, je m^k . V případě studia vlivu tří faktorů na dvou různých úrovních je třeba provést $2^3=8$ experimentů. Nevýhodou tohoto designu je rychle rostoucí počet potřebných experimentů se zvyšujícím se množstvím studovaných faktorů. V případě 8 studovaných faktorů na dvou úrovních je třeba provést $2^8=256$ experimentů, což je poměrně zdlouhavé.

Pokud je tedy třeba sledovat více faktorů, je výhodnější provést jen část experimentů, které vyžaduje plně faktoriální design. V tomto případě hovoříme o částečném faktoriálním designu. Počet experimentů je oproti plně faktoriálnímu designu poloviční (2^{k-1}) nebo čtvrtinový (2^{k-2}).

Plackett-Burmanův design je speciální částečně faktoriální design, který umožňuje zkoumat velké množství faktorů s minimálním počtem experimentů.

Centrální kompositní design je přirozeným rozšířením 2^k faktoriálního designu, u kterého se kromě krajních hodnot (v případě dvou studovaných faktorů 4 hodnoty) zkoumají i hodnoty faktorů mezi těmito krajními hodnotami. Pro zjištění opakovatelnosti se také proměří alespoň třikrát centrální hodnota³. Tento experimentální design je nejvýhodnější pro zjištění optimálních separačních podmínek, protože vyžaduje dostatečný počet experimentů při zkoumání relativně malého počtu faktorů (2 až 5) a zároveň použití tohoto designu podporuje aplikaci kvadratického polynomu (rovnice 3-25) pro matematické modelování závislosti „response“ na zkoumaných faktorech.

Po provedení pokusů navržených příslušným experimentálním designem se vyhodnotí vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí.

Pro nalezení vhodných (optimálních) podmínek lze použít tzv. „response surface modelling“ (RSM). RSM využívá matematické modelování, u kterého je „response“

³ Opakovatelnost se měří v rámci všech designů

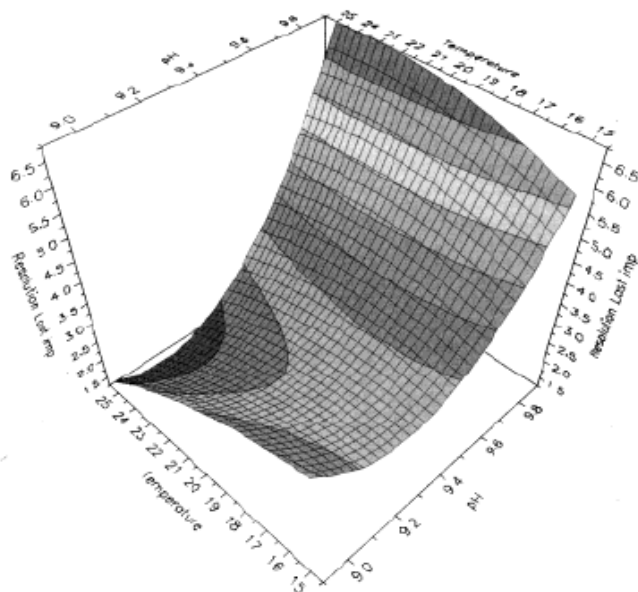
(rozdílení apod.) funkcí studovaných faktorů. Pro určité typy experimentálních designů lze využít různé funkce, podle kterých se provádí konečné modelování. Nejčastěji se používají polynomičné funkce, které pro jednu response (y) a faktory (x_1, x_2, \dots, x_n) mají následující tvary:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n \quad \text{Rovnice 3-23}$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots \quad \text{Rovnice 3-24}$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots \quad \text{Rovnice 3-25}$$

kde $\beta_0, \beta_1, \beta_{11}, \beta_{12}$ jsou koeficienty matematického modelu. Koeficient β_0 určuje hodnotu „response“, když jsou hodnoty všech faktorů rovné nule. Lineární koeficient β_1 popisuje citlivost „response“ na změnu odpovídajícího faktoru x_1 . Smíšený koeficient β_{12} udává míru interakce mezi faktory x_1 a x_2 . Kvadratický koeficient β_{11} popisuje zakřivení.



Obrázek 3-28: Příklad RSM diagramu znázorňující závislost rozlišení mezi analyty N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamovou kyselinou a 10-formyllistovou kyselinou. Koncentrace pufru 50 mM, napětí 20 kV. Převzato ze zdroje [82].

Při použití faktoriálních designů je matematické modelování realizováno na základě rovnice 3-23 a rovnice 3-24. Faktoriální designy se tedy spíše používají při primárním zjišťování, zda má daný faktor statisticky významný vliv na separaci či

nikoliv. Vliv významných faktorů je následně studován v rámci optimalizace za použití centrálně kompozitního designu.

Během optimalizace je zřídka sledován vliv různých faktorů na jednu „response“, ale většinou je potřeba znát jejich vliv na několik „response“ zároveň. V tomto případě je hledání optimálních podmínek také určitým kompromisem mezi více „response“. Určitým řešením je zahrnutí všech response do jedné zkoumané funkce. V některých případech může být definována takto:

$$\mu = \sum w_i r_i \quad \text{Rovnice 3-26}$$

kde μ je suma vážených příspěvků zkoumaných „response“, r_i představuje jednotlivé „response“ a w_i odpovídá významu příslušné „response“. Zde je nutno podotknout, že w_i záleží na kritériích zvolených analytikem (zda více upřednostňuje v rámci optimalizace dosáhnout lepšího rozlišení mezi analyty než kratší analýzy).

Jiný způsob zkoumání více „response“ v rámci jedné funkce představuje tzv. „desirability funktion“:

$$D = \sqrt[n]{d_1^{p_1} d_2^{p_2} \dots d_n^{p_n}} \quad \text{Rovnice 3-27}$$

Každá „response“ (d) nabývá hodnot od 0 do 1 (1 pro nejlepší výsledky a 0 pro neakceptovatelné výsledky). Pokud je jedna z „response“ nulová, potom celá funkce nabývá také nulové hodnoty a experimentální podmínky, při kterých byly tyto jednotlivé „response“ změřeny, jsou nevhodné. Hodnota p odpovídá významu jednotlivé „response“ a n je počet „response“.

Závěrem této části lze jen zmínit, že chemometrie umožňuje v rámci optimalizace zjistit, které faktory a jejich případné vzájemné interakce jsou klíčové pro zdárný průběh separace. Na druhou stranu není tento způsob optimalizace analytických metod všespásný. Například nesprávně zvolený experimentální design, matematické modelování, či špatná interpretace výsledků může vést k nalezení nesprávných optimálních podmínek.

3.6 Validace elektroforetických metod

Cílem validace analytických metod je prokázat vhodnost použití předkládané metody pro její zamýšlený účel. Pro farmaceutický průmysl jsou závazná kritéria stanovená lékopisy a dále lze čerpat i z obecných, ale nezávazných doporučení jako jsou např. stanovy ICH (International Conference on Harmonization) [83]. Kapilární elektroforéza je již několik let považována regulačními úřady jako plnohodnotná analytická metoda, což dokazuje její zahrnutí jak v Evropském lékopise (EP 6th Edition) [84], tak i Americkém lékopise (USP 30) [85]. V obecných částech těchto lékopisů jsou uvedeny obecné statě o kapilární elektroforéze, jejím provedení a případně další požadavky. Příkladem praktického využití CE v kontrole jakosti léčiv může být článek „*levocabastin hydrochlorid*“ v Evropském lékopisu, kde je pro stanovení jeho nečistot požadována kapilární elektroforéza [84].

Pro nově vyvíjené metody lze v průběhu validace postupovat dle směrnice ICH - Q2 (R1) [86]. Postup validace se liší podle účelu, pro který je testovaná metoda validována:

1. test(y) identity
2. stanovení achirálních a chirálních nečistot
3. limitní testy na nečistoty
4. stanovení hlavní obsahové látky v substanci, lékové formě či disolučním roztoku.

Mezi základní validační parametry, které se dle účelu metody testují, patří: selektivita, linearita, rozsah, správnost, přesnost, limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), robustnost a test vhodnosti systému [86][87] (viz tabulka 3-4).

Tabulka 3-4: Souhrn validačních parametrů, které musí být hodnoceny u různých druhů nově zaváděných metod. Vysvětlivky: (-) – tento parametr není hodnocen, (+) – tento parametr je hodnocen, ^a – v některých případech může být vyžadován. Upraveno dle zdroje [86].

| Druh analýzy | Identifikace | Limitní test na nečistoty | Kvantitativní stanovení nečistot | Stanovení hlavní účinné látky |
|-------------------------------|--------------|------------------------------|--|----------------------------------|
| Validační parametr | | | | |
| <i>Správnost</i> | - | - | + | + |
| <i>Přesnost</i> | - | - | + | + |
| <i>Selektivita</i> | + | + | + | + |
| <i>LOD</i> | - | + | ^a | - |
| <i>LOQ</i> | - | - | + | - |
| <i>Linearita</i> | - | - | + | + |
| <i>Rozsah</i> | - | - | + | + |

Selektivita⁴. Tento parametr se také označuje jako specifita a vyjadřuje schopnost analytické metody rozpoznat analyt od všech ostatních potenciálně interferujících látek (tzn., že signál analytu není vyvolán žádnou interferující látkou). Nejběžnějším způsobem, jak otestovat selektivitu, je analýza parentní látky spolu s pomocnými látkami a/nebo nečistotami. Pokud nejsou známy nečistoty, lze selektivitu testovat také paralelní plně ověřenou metodou. Výsledky obou metod se následně porovnávají. V tomto případě je vhodné analyzovat vzorky skladované za různých podmínek: světlo, teplo, vlhkost, oxidace, kyselá/zásaditá hydrolyza. Vedle tohoto způsobu lze charakterizovat selektivitu také jako čistotu píku. To je možné provést sledováním UV spektra analytu v případě DAD detekce či hmotnostním spektrem píku (což je běžnější v kapalinové chromatografii než v kapilární elektroforéze).

U kapilární elektroforézy je také nutné stanovit počet stanovení (analýz), které lze realizovat s jednou sadou vialek. Pokud je jedna sada vialek používána pro neúměrně vysoký počet analýz, dochází vlivem elektrického proudu k elektrolyze, která způsobí změny pH elektrolytu a následně může dojít ke změně EOF a ionizace analytů, což se může projevit změnou migračních časů a případně selektivity. Počet

⁴ Tento a další odstavce této kapitoly jsou zpracovány dle zdrojů [86] a [87], pokud není uvedeno jinak.

analýz, které lze provést s jednou sadou vialek, závisí na kapacitě pufru, objemu vialek, generovaném proudu a době analýzy.

V případě chirálních separací v prostředí BGE obsahujícím modifikované CD je nutno ověřit, zda se selektivita mění se stupněm substituce a mezi CD různých šarží a výrobců.

Linearita. Analýzou sady roztoků různé koncentrace se prověřuje, zda závislost odezvy detektoru je lineární se stoupající koncentrací. Běžně se testuje řada 5 různých koncentrací v požadovaném rozsahu, pro který je validovaná metoda určena. Linearita se hodnotí metodou lineární regrese, kde se hodnotí parametry rovnice přímky, korelační koeficient a residuální suma čtverců.

Pro hodnocení odezvy se počítá plocha pod píkem. Velmi často se také používají tzv. normalizované (korigované) plochy, které odpovídají poměru plochy a odpovídajícího migračního času. Tato metoda umožňuje provést korekci plochy píku jeho migračním časem. To souvisí se separačním mechanismem elektroforetických metod. Zatímco u HPLC všechny analyty putují detekční celou stejnou rychlostí (která odpovídá rychlosti toku mobilní fáze) a tím se zdržují v detekční cele po stejnou dobu, u kapilární elektroforézy se vzrůstajícím migračním časem vzrůstá i doba, kterou analyt stráví v detekční cele. U analytů s různým migračním časem, stejné koncentrace a stejné absorbance (v případě použití UV detektoru) roste odezva signálu se vzrůstajícím migračním časem, což se projeví rozdílem ploch. Normalizované plochy se používají zejména v případech horší reprodukovatelnosti migračních časů; tím se zlepšuje reprodukovatelnost kvantifikace.

Rozsah. Navrhovaná analytická metoda by měla být lineární, správná a přesná v celém rozsahu včetně jeho hraničních hodnot. Pro účely stanovení by měl být rozsah alespoň 80-120 % testované koncentrace.

Správnost. Správnost metody vyjadřuje shodu mezi nalezenou hodnotou a hodnotou, kterou lze považovat jako referenční. Tento validační parametr se velmi často hodnotí stanovením výtěžnosti (tzv. „recovery experiment“). Ten se realizuje známým přídatkem analytu k placebo (léková forma neobsahující analyt/y) a jeho stanovením testovanou metodou. Nalezený výsledek se porovná s hodnotou známého přídatku. Výtěžnost by se měla ověřit alespoň na třech koncentračních úrovních v sledovaném rozsahu.

Správnost lze také vyhodnotit porovnáním výsledků předkládané metody s metodou referenční (která je již plně validovaná a zavedená). Tato referenční metoda by měla být založena na jiném principu. Velmi často se tak v případě elektromigračních metod volí jako referenční metoda HPLC.

Přesnost. Tento údaj vyjadřuje míru shody v sérii měření provedených za předepsaných podmínek. Přesnost lze sledovat na třech úrovních, které představují různou míru přesnosti metody: Opakovatelnost (repeatability), intermediární přesnost (intermediate precision) a reprodukovatelnost (reproducibility).

Opakovatelnost se rozumí variabilita výsledků získaných jedním analytikem na stejném přístroji v krátkém časovém úseku. Nejčastěji se hodnotí opakovaným nástřikem reálného vzorku na 100% testovaného rozsahu (šest nástřiků) anebo na třech koncentračních úrovních (každá se nástřikuje třikrát). Stejně jako u dalších dvou úrovní přesnosti se hodnotí směrodatné odchylky migračního času a ploch (popřípadě korigovaných ploch). V případě metody vnitřního standardu lze hodnotit poměr ploch nebo korigovaných ploch analytu na vnitřní standard. Tímto se výrazně zlepší opakovatelnost, která je díky malým nástřikovaným objemům horší v porovnání s HPLC.

Intermediární přesnost vyjadřuje míru shody dosažených výsledků v jedné laboratoři při změně jednoho nebo více faktorů. V průběhu stanovení této míry přesnosti můžeme měnit: separační kapiláry různých šarží a výrobců v průběhu jednoho dne, den analýzy, kdy jsou každý den připraveny čerstvé elektrolyty a vzorky, a analytika, který si sám připraví vlastní kapiláru, elektrolyt a vzorek.

Reprodukovatelnost je nejvyšší stupeň přesnosti analytické metody a provádí se v interlaboratorním měřítku, kdy se stejný vzorek analyzuje v různých laboratořích, a získané výsledky se porovnají.

Robustnost. Při hodnocení robustnosti se sleduje, jak jsou výsledky získané navrženou metodou ovlivněny malými změnami jejích parametrů. Během testování robustnosti se u elektromigračních metod hodnotí, jakým způsobem tyto malé změny od optimálních podmínek ovlivní samotný výsledek separace. Nejčastěji se testuje vliv složení elektrolytu, objem nástřiku, nastavení detektoru (v případě UV-VIS vlnová délka), teplota a časy promývání mezi jednotlivými analýzami. Jelikož faktorů, které mohou ovlivnit separaci je mnoho a často se nemusí měnit jeden, ale i více faktorů

najednou, tak výsledný efekt těchto malých změn může mít výrazný vliv na robustnost metody, pokud se jejich efekty sčítají. Naopak v případě, že výsledky změn separačních parametrů jdou proti sobě, nemusí být pozorován žádný vliv na samotnou separaci. Z tohoto důvodu se také pro testování robustnosti používají různé statistické designy, které umožňují testování mnoha faktorů najednou s minimem potřebných experimentů. Vedle screeningových designů (částečně faktoriální design a Plackett-Burmanův design) se v případě výrazného vlivu některých faktorů používá i centrální kompozitní design k jejich hlubšímu studiu.

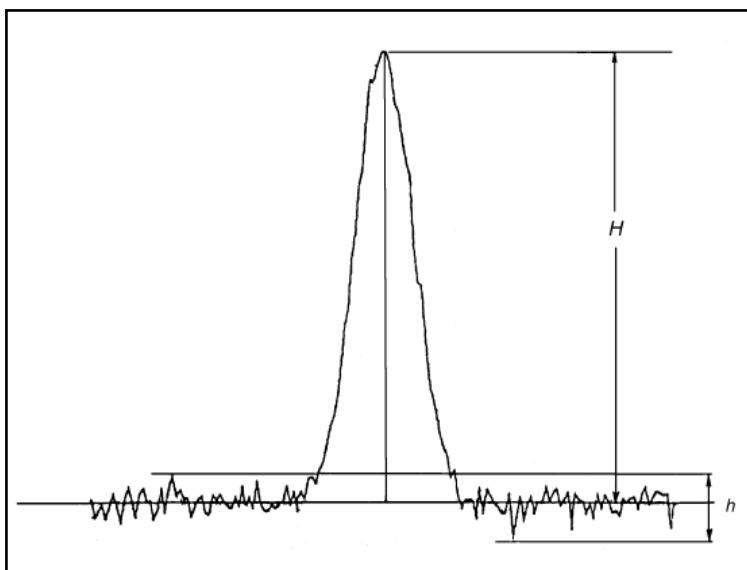
Na rozdíl od HPLC je testování robustnosti v případě CE výrazně jednodušší, protože čas nutný k ekvilibraci HPLC kolony je poměrně delší v případě změny mobilní fáze, než čas potřebný na ustálení kapiláry v případě změny BGE.

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). LOD odpovídá nejnižší koncentraci anebo množství sloučeniny, které je možno předkládanou analytickou metodou detekovat. Hodnota LOQ vyjadřuje nejnižší koncentraci či množství analytu, které může být metodou stanoveno s akceptovatelnou správností a přesností. Tyto parametry se nejčastěji vyčíslují u metod, které jsou určeny pro stanovení nečistot a/nebo degradačních produktů.

Existuje několik způsobů, jak tyto parametry určit. Nejčastěji se setkáme se stanovením těchto limitů na základě poměru signálu k šumu (S/N , signal-to-noise):

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h} \qquad \text{Rovnice 3-28}$$

kde „ H “ značí výšku píku měřenou mezi vrcholem píku a extrapolovanou základní linií signálu a „ h “ odpovídá rozsahu šumu na elektroforegramu slepého roztoku a zaznamenaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na elektroforegramu předepsaného porovnávacího roztoku. Pokud je to možné, bere se tato vzdálenost rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se tento pík nacházel“ [88].



Obrázek 3-29: Stanovení poměru signálu k šumu dle Evropského lékopisu. Převzato ze zdroje [88].

Pokud je poměr $S/N = 3$, odpovídá signál této koncentrace limitu detekce. Pokud je tento poměr 10, hovoříme o limitu kvantifikace. Další přístupy stanovení LOD a LOQ jsou založeny na vizuálním pozorování a na výpočtu z parametrů kalibrační křivky.

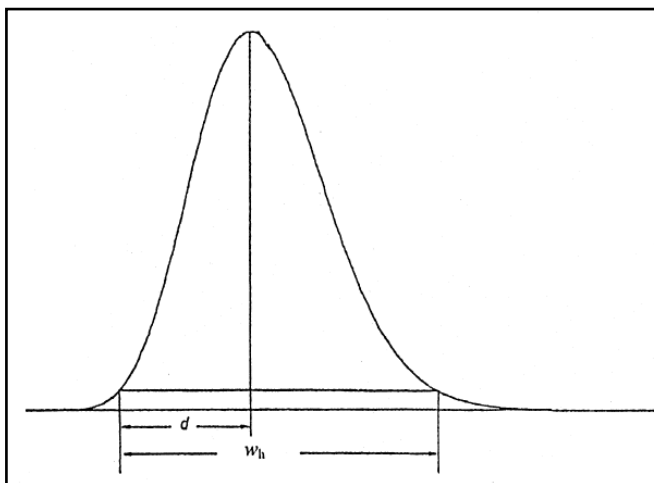
Test vhodnosti systému (SST, system suitability testing). Pro kontrolu chování celého elektroforetického systému se používá tzv. test vhodnosti systému (způsobilost systému). Mezi parametry, které se určují, řadí Evropský lékopis kapacitní faktor (jen pro MEKC), počet teoretických pater, faktor symetrie píku, rozlišení, RSD migračních časů a ploch (popř. korigovaných ploch) a citlivost (poměr signálu k šumu) [84]. Americký lékopis [85] předepisuje pro test vhodnosti systému stejné parametry jako Evropský lékopis. Všechny tyto parametry kromě symetrie píku již byly popsány v předchozím textu.

Faktor symetrie píku se vypočítá dle následujícího vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad \text{Rovnice 3-29}$$

kde „ $w_{0,05}$ “ odpovídá šířce píku v jedné dvacetině jeho výšky, d značí vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky“ [88]. Pokud poměr dosahuje hodnoty 1,0, tak se jedná o ideálně symetrický pík [85]. Jelikož je symetrie píku v elektroforéze ovlivněna mnoha faktory jako jsou podélná difúze, elektrodisperze, adsorpce vzorku na stěny kapiláry, Jouleho teplo, délka

nastříknuté zóny vzorku aj, lze s velkými obtížemi dosáhnout ideálně symetrických píků. Dle USP 30 lze akceptovat i silně asymetrické píky a to za podmínky, že jsou reprodukovatelné a nesnižují selektivitu [85].



Obrázek 3-30: Faktor symetrie píku. Převzato ze zdroje [88].

V rámci SST lze dle USP 30 zkoušený CE systém považovat za reprodukovatelný, pokud RSD z 5 či více opakovaných nástřiků není vyšší než 3,0% [85]. Evropský lékopis neurčuje žádný konkrétní limit.

Další rozdíl mezi USP 30 a Evropským lékopisem je výpočet rozlišení mezi dvěma sousedními píky. V kapitole 3.5.1 je uveden výpočet dle USP 30, zde je pro úplnost uveden i výpočet dle Evropského lékopisu:

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad \text{Rovnice 3-30}$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$ a w_{h1}, w_{h2} odpovídá šířce píků v polovině jejich výšky [84].

Jak je patrné z předešlého popisu, validace elektromigračních metod je v základních rysech velmi podobná validaci HPLC. Přesto existuje několik specifik, které mohou výrazně ovlivnit výsledek validace a které nelze podcenit: kondicionace nové kapiláry, rozdíly mezi kapilárami různých šarží a výrobců, čistota a původ používaných chemikálií, zkušenost operátora (řezání kapilár a nastavení detekčního okna vyžadují určitou manuální zručnost a trénink).

Aby mohla být elektroforetická metoda přenesena na jiný přístroj v jiné laboratoři, je potřeba nově zaváděnou metodu velmi dobře popsat. V popisu metody by mělo být vedle dalších parametrů uvedeno:

- celková a efektivní délka kapiláry,
- intenzita elektrického pole ve V/cm a velikost generovaného elektrického proudu,
- injikovaný objem,
- přesný popis promývání kapiláry mezi analýzami,
- maximální počet analýz, který lze provést s jednou sadou vialek,
- detailní popis přípravy elektrolytu,
- promývání kapiláry po použití a její uchování (voda vs. vzduch).

4 Výsledková část - Komentář k publikovaným pracím

V této kapitole je podán stručný komentář k publikovaným pracím. Úplný text publikovaných prací je uveden v kapitole 5. Plakátová sdělení prezentovaná na konferencích nejsou komentována; v tomto případě je pouze uvedeno plné znění abstraktu v kapitole 5.

4.1 Přehled publikovaných prací

Přehled přijatých publikací:

1. Jáč, P., Polášek, M., Pospíšilová, M.: **Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods**, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, 2006, 805-814. IF⁵ = 2,032. Citováno⁶: 10x.
2. Jáč, P., Polášek, M., Vaz Batista, A. I., Kaderová, L.: **Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate**, *Electrophoresis* 29, 2008, 843-851. IF = 4,101. Citováno: 0.
3. Sungthong, B., Jáč, P., Scriba, G. K. E.: **Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the R-enantiomer**, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 2008, 959-965. IF = 2,032. Citováno: 0.
4. Jáč, P., Los, P., Spáčil, Z., Pospíšilová, M., Polášek, M.: **Fast assay of glukosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection**, *Electrophoresis*, uncorrected proof. IF = 4,101. Citováno: 0.

Přehled plakátových sdělení:

1. Jáč, P., Polášek M., Pospíšilová, M.: **Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods; 11th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis**, Rimini, 25. - 28. 9. 2005.

⁵ Hodnota impact faktorů je z roku 2006.

⁶ Dle databáze Scopus k 10.6.2008. Autocitace nejsou zahrnuty.

2. Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I., Kaderová L.: **Comparative study of borate and tungstate as complex-forming reagents for the separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis**; *15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques*, Paříž, 28. - 30. 8. 2006.
3. Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I.: **Utilization of tungstate-based electrolyte for the determination of polyphenols in natural products by capillary electrophoresis**; *12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis*, Elba, 23. - 26. 9. 2007.

4.2 Analýza polyfenolů pomocí kapilární elektroforézy

4.2.1 Komentář k práci č. 1: „Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods“.

Polyfenolické sloučeniny (flavonoidy a polyfenolické kyseliny) spolu s dalšími látkami jako jsou vitamin C, E a karotenoidy vykazují antioxidační účinky. Tyto látky přírodního charakteru jsou součástí potravy a byla prokázána souvislost s jejich zvýšeným příjmem v potravě a nižší incidencí srdečních onemocnění, některých druhů nádorů a zánětlivých procesů. Tento účinek je připisován snížení oxidačního stresu, který bývá uváděn jako jedna z příčin vzniku těchto onemocnění.

Z tohoto důvodu se studiem polyfenolů zabývá mnoho vědeckých pracovišť. Analytická chemie v rámci tohoto výzkumu přispívá zaváděním moderních analytických metod určených pro stanovení těchto analytů v různých matricích (rostlinný materiál, metabolity těchto látek v živých organismech aj.). Jelikož rostlinný materiál obsahuje ve většině případů širokou škálu těchto látek, patří separační metody mezi nejpoužívanější analytické techniky pro jejich stanovení. Vedle chromatografických metod (HPLC, GC), které jsou nejčastěji používány v analýze polyfenolů, představují elektromigrační metody zajímavou alternativu.

Cílem této rešeršní práce bylo zmapovat nové trendy v analýze polyfenolů pomocí kapilární elektroforézy za období 5 let (1999-2005). V této publikaci jsou tři tabulky shrnující separační podmínky citovaných prací, seznam matricí, ve kterých byly polyfenoly stanoveny, a seznam analytů. V některých případech jsou v textu podrobněji diskutovány separační podmínky a dosažené výsledky.

Z celkem 47 původních prací, které jsou v práci citovány, byla nejčastěji používána kapilární zónová elektroforéza (32 článků) následovaná micelární elektrokinetickou chromatografií (11 článků). Izotachoforéza byla použita pouze jako prekoncentrační metoda k CZE. Nevodná elektroforéza a elektroforéza v čipovém měřítku byly použity pouze jedenkrát.

Nejčastěji používanou složkou základního elektrolytu byl borátový pufr, u něhož se s velkou oblibou využívá jeho komplexačních schopností se sloučeninami obsahující vicinální –OH skupiny. Určitou nevýhodou tohoto elektrolytu může být alkalické pH (9-10), které může usnadnit oxidaci sledovaných analytů, jak již bylo dříve diskutováno (viz kapitola 3.4).

Pro zlepšení selektivity byl v mnoha pracích použit přídavek organického rozpouštědla k základnímu elektrolytu (MeOH, ACN). Také vliv cyklodextrinů na selektivitu byl využit jak u chirálních, tak i nechirálních separací.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie našla uplatnění zejména v separaci lipofilních látek podobné struktury. Oproti CZE je zde separace založena vedle elektromigrace (popřípadě tvorby komplexů v případě borátových pufrů) také na rozdělávání mezi micelární pseudostacionární fází a vodným prostředím. Např. methoxylace –OH skupin skeletu polyfenolů vede ke zvýšení jejich lipofility a tím i k jejich vyšší afinitě k micelární fázi a následně prodloužení migračních časů takovýchto analytů. Opačně glykosylace a vyšší počet –OH skupin zvyšuje hydrofilitu studovaných analytů a ty potom migrují rychleji. Nejčastěji používaným tenzidem pro analýzu polyfenolů pomocí MEKC patří SDS. Bylo také popsáno použití tzv. smíšených micel (SDS-cholát sodný; SDS-taurodeoxycholát; SDS-CHAPS) pro ovlivnění selektivity v těch případech, kdy konvenční MEKC selhává. Pro separaci syntetických polyfenolů byla použita MEKC využívající bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný (AOT) ke tvorbě vesikulární pseudostacionární fáze.

Některé z citovaných publikací se zabývají porovnáním CE a HPLC metod vyvinutých pro analýzu polyfenolů. Výsledky těchto prací demonstrují srovnatelnost kapilární elektroforézy s HPLC ve smyslu přesnosti, citlivosti a linearity.

Velkou předností elektromigračních metod je možnost „on-line“ kombinace předúpravy a/nebo zakoncentrování vzorku se separačním procesem, což je obzvláště velmi výhodné u tak komplexní matrice jakou je rostlinný materiál. Na našem pracovišti

bylo v minulosti vyvinuto několik metod kombinujících ITP s CZE v dvoukolonovém uspořádání. V průběhu ITP analýzy dojde k oddělení analytů (polyfenolů) od matrice a jiných složek. V dalším kroku jsou studované analyty rozseparovány pomocí CZE. Jiným způsobem umožňujícím „on-line“ úpravu vzorku a separaci je propojení průtokových metod (FI) s CE analyzátozem. V průběhu FI kroku dochází k úpravě vzorku pomocí extrakce na pevnou fázi (SPE), po které následuje separace analytů pomocí CE.

Nejčastěji používanou detekční technikou byla UV spektrofotometrie (35 článků), která je následovaná elektrochemickou detekcí (11 článků)⁷. Obecně je elektrochemická detekce (v našem případě amperometrická) citlivější než UV detekce a zároveň se vyznačuje dobrou selektivitou, protože proteiny, cukry a tuky, které jsou přítomny v rostlinném materiálu, obvykle neinterferují. Hmotnostní spektrometrie byla použita jen jednou a výsledná citlivost byla stejná či horší v porovnání s UV detekcí. Chemiluminiscenční detekce je jiným zřídka používaným způsobem, jak v CE detekovat analyty (z rešeršovaných prací jen 1 publikace). Její značnou nevýhodou je, že není komerčně dostupná a její realizace vyžaduje úpravu přístroje.

Kapilární elektroforéza byla také využita k hodnocení antioxidační aktivity jednotlivých polyfenolů či rostlinných extraktů. Kromě metody založené na nepřímém stanovení hydroxylového radikálu byl nedávno představen „on-column“ způsob stanovení antioxidační aktivity různých polyfenolů. Posledně jmenovaná metoda využívá reakce H_2O_2 se studovanými látkami přímo v kapiláře a po určité inkubační době je možno separovat reakční produkty.

Závěrem lze konstatovat, že kapilární elektroforéza je vhodnou separační metodou k analýze polyfenolů v různých maticích a případnému studiu jejich antioxidační aktivity. Zároveň ji lze považovat za plnohodnotnou alternativu k HPLC, jak bylo doloženo některými publikacemi.

⁷ Zde je ale nutno podotknout, že poměr 35:11 je značně zkreslen skutečností, že všechny publikované práce využívající ED byly vypracovány jedním pracovištěm.

4.2.2 Komentář k práci č. 2: „Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate“

V této práci je představen nový typ základního elektrolytu využívající přídavek WO_4^{2-} jako komplexačního činidla pro separaci polyfenolů. Výzkum v této oblasti navázal na práci provedenou na našem pracovišti, kdy byl zkoumán vliv molybdenanu na separaci stejných analytů.

Důvodem použití tohoto typu elektrolytu je možnost pracovat v mírně alkalické až neutrální oblasti, kde je menší riziko oxidace analytů vzdušným kyslíkem (viz kapitola 3.4). Na základě literární rešerše (Web of Knowledge) nebyl dosud přídavek wolframanu k základnímu elektrolytu pro separaci organických analytů aplikován.

Pro separaci modelové směsi (apigenin, luteolin, hyperosid, kvercetin, rutin, kyselina chlorogenová a p-kumarová) byly nalezeny následující optimální podmínky: 50 mM HEPES, 2,2 mM Na_2WO_4 , pH 7,4, 25% MeOH (v/v). Separace byla provedena v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 75 μm , celkové délky 75 cm (efektivní délka 42 cm) při 30 kV. Analyty byly detekovány při 275 nm. Vzorčky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund. Paralelně k tomuto novému elektrolytovému systému byl pro stejnou modelovou směs vyvinut a optimalizován běžně používaný borátový pufr. V tomto případě ale nedošlo k úplné separaci všech analytů; nejlepších výsledků bylo dosaženo v systému 20 mM tetraborát pH 9,0 (upraveno kyselinou boritou), 20 kV. Ostatní podmínky byly identické jako u předchozí metody. Jako vnitřní standard byla použita u obou metod kyselina skořicová.

U obou metod byla porovnána selektivita (rozlišení mezi analyty), linearita, citlivost, účinnost separačního procesu a opakovatelnost. Všechny numerické výsledky jsou přehledně tabelovány v článku. Souhrnně lze konstatovat, že se všechny analyty modelové směsi podařilo separovat použitím prakticky neutrálního BGE s přídavkem WO_4^{2-} . V případě borátu se nepodařilo v průběhu optimalizace od sebe rozdělit apigenin od kyseliny p-kumarové. Na druhou stranu separační medium založené na borátovém pufru poskytlo rychlejší separaci, lepší citlivost a vyšší separační účinnost. Linearita byla pro obě metody studována v rozsahu 25-175 $\mu\text{g/ml}$ (pro všechny analyty) a poskytla podobné výsledky. Opakovatelnost migračních časů a ploch v rámci jednoho dne (šest nástřiků) a dvou dnů (každý den šest nástřiků) je v porovnání s údaji v literatuře poněkud horší, ale přesto pro většinu analytů akceptovatelná. V rámci

jednodenní opakovatelnosti je RSD migračních časů ($RSD < 1,4$) a ploch ($RSD < 5,6$) lepší pro wolframan než pro borát ($RSD_{čas} < 4,7$; $RSD_{plocha} < 10,9$). Meزيدenní přesnost poskytla srovnatelné výsledky pro obě metody.

Nově vyvinutá metoda založená na BGE obsahujícím Na_2WO_4 byla aplikována na analýzu obsahu polyfenolů v extraktu *Hypericum perforatum*. Obsah nalezeného rutinu a hyperosidu v lyofilizovaném extraktu odpovídal 0,92% pro každou z látek (vztaženo na suchou drogu). Výtěžnost byla vyšší než 94,5% ($n=6$). Kromě těchto dvou flavonoidů byl v extraktu identifikován kvercetin a kyselina chlorogenová (v množství nedosahující LOQ).

Výsledky publikované v této práci demonstrují první využití wolframanu jako komplexačního činidla při elektroforetické analýze polyfenolů. Jistou nevýhodou této metody je nižší citlivost v porovnání s borátovým elektrolytem, výhodou je možnost provést analýzu v neutrálním prostředí.

4.3 Využití kapilární elektroforézy ve farmaceutické analýze

4.3.1 Komentář k práci č. 3: „Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the R-enantiomer“

Cílem této práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat kapilárně elektroforetickou metodu pro stanovení nečistot escitalopramu. Jako nečistoty byly vybrány inaktivní enantiomer (*R*)-citalopram a syntetický prekurzor účinné látky ((*R,S*)-citadiol). V průběhu vývoje bylo vyzkoušeno mnoho chirálních selektorů ze skupiny cyklodextrinů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v duálním systému obsahujícím ~15 mg/ml sulfatovaného β -CD a ~ 1 mg/ml β -CD. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr o pH 2,5. Pro dosažení akceptovatelné symetrie píků a vysoké separační účinnosti bylo nutné provádět separaci při otočené polaritě (anoda na straně detektoru). Jelikož je citalopram v lékových formách přítomen ve formě solí (nejčastěji ve formě bromidu či oxalátu), bylo nutné metodu vyvinout tak, aby tyto anionty neovlivňovaly selektivitu separačního procesu. V průběhu samotné optimalizace byl studován vliv 4 faktorů (koncentrace sulfatovaného β -CD, koncentrace fosfátového pufru, vkládané napětí a teplota) na rozlišení mezi oběma enantiomery citalopramu, rozlišení mezi oxalátem a (*R*)-citalopramem, migrační čas poslední sloučeniny ((*R*)-citadiol) a

generovaný proud. Optimalizace byla provedena pomocí centrálně kompozitního designu a byly nalezeny tyto optimální separační podmínky: 20 mM fosfátový pufr, pH 2,5 (upraveno NaOH) obsahující 22 mg/ml sulfatovaného β -CD a 0,5 mg/ml β -CD. Separace za optimálních podmínek probíhá při 28°C a -20 kV v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 50 μ m a celkové délce 47 cm (efektivní délka 40 cm). Analyty byly detekovány při 205 nm. Nástřik vzorků byl realizován pomocí hydrodynamického dávkování tlakem 0,5 psi po dobu 6 vteřin. Migrační pořadí studovaných látek je za optimálních podmínek následující: bromid, oxalát, (*R*)-citalopram, escitalopram, (*S*)-citadiol, (*R*)-citadiol.

V průběhu validace, která byla provedena pro případné nečistoty (*R*)-citalopram, (*R*)-citadiol a (*S*)-citadiol dle ICH Q2(R1), byly sledovány tyto parametry: selektivita, linearita, LOD, LOQ a přesnost. Samotná validace metody pro analýzu nečistot by měla být provedena v přítomnosti přebytku parentní látky. V našem případě to nebylo možné, protože substance escitalopramu obsahovala cca 2,4% (*R*)-citalopramu (dle normalizovaných ploch). Validace metody byla provedena použitím racemického citalopramu a citadiolu v rozmezí 0,05-3,0% pro (*R*)-citalopram a 0,05-1,0% pro enantiomery citadiolu vzhledem ke koncentraci escitalopramu 5 mg/ml. Validace byla provedena za použití vnitřního standardu kyseliny salicylové, která migruje mezi oběma enantiomery citadiolu. Výsledky validace jsou uvedeny ve formě tabulek v samotném článku.

Vyvinutá a validovaná metoda byla aplikována ke stanovení čistoty escitalopramu v substanci a v tabletách. Kromě toho byly také analyzovány tablety obsahující racemický citalopram. Výsledky stanovení v tabletách jsou uvedeny v článku ve formě tabulky. Pro stanovení výtěžnosti extrakce z tablet byla provedena druhá extrakce, po které nebyl nalezen žádný (*R*)-citalopram a asi 7% (*S*)-citadiolu, který nebyl extrahován v prvním kroku. Po druhé extrakci byly ke zbytku tabletoviny přidány studované nečistoty o známé koncentraci a stanoven jejich obsah. Výtěžnost pro všechny tři sloučeniny byla vyšší než 88%, což lze považovat za uspokojivý výsledek u analýz minoritních složek.

Dosažené výsledky demonstrují využitelnost vyvinuté metody pro stanovení čistoty escitalopramu a to jak substance, tak i ve formě tablet. Ačkoliv tato metoda

nebyla vyvinuta a validována pro stanovení citalopramu, může být po revalidaci použita pro stanovení citalopramu v racemické směsi.

4.3.2 Komentář k práci č. 4: „Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection“

Glukosamin je aminocukr, který je přirozenou součástí chrupavky a používá se buď samostatný anebo v kombinaci s jinými účinnými látkami k terapii osteoartrózy. V Evropském lékopisu není uvedena monografie věnující se glukosaminu, zatímco Americký lékopis pro jeho stanovení v substanci či lékových formách předepisuje HPLC.

Stanovení glukosaminu pomocí UV detekce je poměrně obtížné, protože vyžaduje pro docílení dobré citlivosti derivatizaci analytu. Pro analýzu v biologických vzorcích se nejčastěji používají separační metody ve spojení s MS detekcí či LIF po nezbytné derivatizaci analytu.

Bezkontaktní vodivostní detekce ve spojení s kapilární elektroforézou pro stanovení tohoto analytu postrádajícího výrazné chromofory představovala zajímavou alternativu.

Cílem této práce bylo navrhnout rychlou, reprodukovatelnou a správnou metodu využívající spojení CE a CCD detekce. Jelikož je glukosamin velmi často formulován v pevných perorálních lékových formách spolu s chloridem či síranem draselným, byla nová metoda vyvinuta takovým způsobem, aby umožňovala stanovení účinné látky vedle draselných iontů.

Separace probíhala v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 50 μm , celkové délky 75 cm a efektivní délky 27 cm. Základní elektrolyt obsahoval 30 mM octanový pufr o pH 5,2 (upraveno 1M NaOH). Analyty byly separovány při 30 kV a 25°C. Vzorky byly dávkovány tlakem 50 mbar po dobu šesti vteřin.

V průběhu validace byla testována selektivita, rozsah, linearita a opakovatelnost jak pro glukosamin, tak i pro draselné ionty. Intermediární přesnost a správnost byly zkoumány jen pro glukosamin. Jako vnitřní standard byl použit ethanolamin. Využitelnost předkládané metody byla demonstrována na analýze tří léčivých přípravků a jednoho potravinového doplňku. V těchto vzorcích byl stanoven jen obsah glukosaminu, nikoliv draselných iontů, jelikož stanovení jejich obsahu není požadováno

Americkým lékopisem. Výsledky validace a kvantifikace glukosaminu v reálných vzorcích jsou přehledně zpracovány ve formě tabulek.

Výsledky uvedené v této publikaci jasně demonstrují využitelnost CE/CCD pro stanovení glukosaminu v léčivých přípravcích či potravinových doplňcích. V rámci testování správnosti výsledků nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi novou CE/CCD metodou a již validovanou metodou založenou na HPLC stanovení glukosaminu s UV detekcí.

5 Přílohy

5.1 Publikované články

- 5.1.1 Příloha 1: Jáč, P., Polášek, M., Pospíšilová, M.: Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods, J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 2006, 805-814.**

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 40 (2006) 805–814

 JOURNAL OF
 PHARMACEUTICAL
 AND BIOMEDICAL
 ANALYSIS
www.elsevier.com/locate/jpba

Review

Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods

Pavel Jáč*, Miroslav Polášek, Marie Pospíšilová

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

Received 21 October 2005; received in revised form 6 December 2005; accepted 6 December 2005

Available online 18 January 2006

Abstract

An overview mapping recent trends in the determination of polyphenols of natural origin (mostly flavonoids) and their synthetic derivatives by electromigration methods is presented. The overview (covering the period of the recent 5 years and comprising 61 references) is focused on capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with various detection methods. Techniques comprising on-line pre-separation such as isotachopheresis (ITP)-CZE and flow-injection-CZE, chiral separations and CZE evaluation of antioxidation activity are also discussed.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Electromigration methods; Polyphenols; Chiral separations; Detection techniques; Antioxidants; Review

Contents

| | |
|---|-----|
| 1. Introduction | 805 |
| 2. General characteristics of the electrophoretic methods reviewed | 807 |
| 2.1. Background electrolytes (BGEs) | 807 |
| 3. Micellar electrokinetic capillary chromatography (comparison with CZE and HPLC) | 807 |
| 4. Electrophoretic determination of various kinds of isomers including chiral separations | 810 |
| 5. On-line methods utilized for the sample pretreatment | 811 |
| 6. Detection techniques | 812 |
| 7. Evaluation of antioxidation activity of polyphenols by electromigration methods | 813 |
| 8. Miscellaneous | 813 |
| 9. Concluding remarks | 813 |
| Acknowledgements | 814 |
| References | 814 |

Abbreviations: AOT, bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinate; BGE, background electrolyte; BHA, butylated hydroxyanisole; BHQ, butylated hydroquinone; BHT, butylated hydroxytoluene; CD, cyclodextrin; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate; CS, catechin sulfate; ECS, epicatechin sulfate; ED, electrochemical detection; EOF, electroosmotic flow; FEP, fluorinated ethylene-propylene copolymer; FI, flow injection; 6G- β -CD, 6-*O*- α -D-glucosyl- β -cyclodextrin; HEC, 2-hydroxyethylcellulose; HP-CD, hydroxypropyl cyclodextrin; HPLC, high performance liquid chromatography; ITP, isotachopheresis; LE, leading electrolyte; NACE, non-aqueous capillary electrophoresis; SC, sodium cholate; S/N, signal to noise ratio; TE, terminating (trailing) electrolyte

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 482; fax: +420 495 518 718.

E-mail address: jacp@faf.cuni.cz (P. Jáč).0731-7085/\$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jpba.2005.12.008

1. Introduction

Antioxidants are both natural and synthetic compounds possessing ability to scavenge free radicals and to inhibit oxidation processes. Polyphenols (flavonoids and polyphenolic acids) together with ascorbic acid, vitamin E and carotenoids are the most important natural reducing agents occurring in diet that are believed to protect biological tissues from oxidative stress. As evidenced by results published by some authors, a diet rich in these substances can reduce the incidence of coronary heart disease, some kinds of cancer and inflammation processes [1,2].

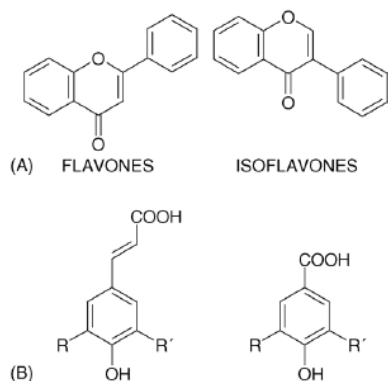


Fig. 1. The basic skeleton of flavonoids (A) and hydroxyphenylcarboxylic acids (B).

The main structural types of polyphenols are represented by hydroxyphenylcarboxylic acids and flavonoids (see Fig. 1). Their content was determined in many herbs and natural products such as olive oil, wines and propolis. It is assumed that the consumption and use of these nutritional products in France (red wine) and Mediterranean countries (Greece, Spain) is associated with lower incidence of heart diseases and cancer.

The number of papers dealing with the assay of antioxidants in various analytical matrices is increasing in accordance with growing interest in the investigation of their pharmacological and biological effects. Due to complex composition of plant materials, the separation methods play the most important role in the assay of antioxidants. In addition to chromatographic methods (LC and GC) that still occupy the leading position in pharmaceutical and phytochemical analysis, numerous papers dealing with the determination of antioxidants by means of electromigration methods have been published. High separation efficiency as well as short analysis time and low consumption of solvents and samples are characteristic features of electrophoretic separation techniques. On the other hand their drawbacks are generally lower sensitivity and worse reproducibility compared to HPLC.

Capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) are the two “classical” modes of electromigration methods that are most frequently employed for the determination of various antioxidants in different herb materials.

CZE separation is based on different migration of charged solutes (caused by the differences in their charge to mass ratio) in a conductive liquid placed in a capillary under the influence of a high-voltage electric field. The movement of solutes in a silica capillary is also affected by the electroosmotic flow (EOF) that originates thanks to negatively charged silanolate groups of the capillary walls. Cations of the electrolyte are attracted by the negatively charged wall to form a fixed layer; other cations form a mobile layer which migrates toward the cathode while the bulk of the buffer solution co-migrates with it and gives rise to the

EOF. Since the EOF is greater than electrophoretic mobility of the negatively charged solutes (originally they tend to migrate toward the anode) both negatively and positively charged solutes can be analyzed within one run. On the other hand all neutral analytes migrate with the rate of the EOF and remain unseparated [3].

Neutral analytes can be separated by another electromigration technique called micellar electrokinetic chromatography (MEKC). In MEKC the BGE contains a charged surfactant (often sodium dodecyl sulfate, SDS) at a concentration level exceeding its critical micellar concentration (CMC). The micelles formed serve as a “pseudostationary phase” and the analytes undergo partitioning between the micelles (hydrophobic phase) and BGE (hydrophilic phase). Here the mechanism of separation is also based on the differences in the lipophilicity of analytes [3].

In isotachopheresis (ITP) a zone containing a mixture of analytes (cations or anions) is introduced between two different buffers. One buffer called “leading electrolyte” (LE) contains a leading ion (cation if the analytes are cations) that has higher mobility than that of any of the analytes and the other buffer called “terminating (or trailing) electrolyte” (TE) contains a terminating ion that has mobility lower than that of any of the analytes. When an electric field is applied to the capillary the analytes are stacked into zones according to their mobilities and in equilibrium state these distinct zones migrate at the same velocity. The analyte zones closely follow one another (with sharp boundaries, no gap between them) arranged according to their mobilities, with the fastest analyte ion moving behind the leading electrolyte, etc. In the steady state each ITP zone contains only one kind of analyte and common counter-ion. Due to the existence of the “Kohlrausch regulating function” the concentration effect exists; it means that the concentration of analyte in its zone is spontaneously adjusted to the concentration of the LE. In one run either cations or anions can be separated but not both. In comparison with CZE and MEKC the zone dispersion in ITP is significantly decreased [3].

Several reviews concerning the assay of polyphenols by electrophoretic methods were published earlier. Boyce [4] surveyed the use of CZE for the determination of additives involving synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (BHQ) and gallic acid esters in food. Another review published by Klampff et al. [5] focused on the CZE assay of polyphenols, low-molecular acids, amino acids and fatty acids in foods. Gu et al. [6] reviewed the CZE methods employed for the assay of resveratrol and some other flavonoids in wine. Recently a critical review [7] evaluating the merits and drawbacks of using CZE and HPLC in the analysis of phytochemical substances including flavonoids and phenolic acids has appeared. The author came to the conclusion that CZE will not eventually replace HPLC in the phytochemical analysis but it can be an alternative where analysis requires higher efficiency or resolution than HPLC, especially in cases of phenolic polymers, bioflavonoids and alkaloids. Two overviews recounting the determination of tea components were published. Dalluge et al. [8] reviewed the most important separation methods such

as HPLC, CZE, GC and TLC used for the determination of tea catechins that belong to the group of polyphenols possessing strong antioxidant and anticarcinogenic activity. Horie et al. [9] summarized the information about the analysis of tea components (amino acids, polyphenols, purine alkaloids and vitamins) by HPLC and CZE. Other reviews focused on the determination of active components in *Rhododendron dauricum* [10], *Scutellarie baicalensis* [11] and *Hippophae rhamnoides* [12] by various separation methods including also the CE. A comprehensive overview devoted to separation methods currently in use to determine flavonoids in various matrices was published recently [13] but only nine out of 133 references appearing in the review are related to electromigration methods.

The aim of the present compilation is to indicate new trends in the use of electrophoretic methods that have been utilized for the determination of polyphenols during the last 5 years. The list of separation conditions, analytical matrices, and analytes are presented in the form of tables (see Tables 1–3). Other details, where appropriate, are discussed in the text.

2. General characteristics of the electrophoretic methods reviewed

On the basis of the overview of 47 original papers concerning electrophoretic analysis of polyphenols it is clearly seen that the most exploited mode is conventional CZE (32 papers) followed by MEKC (11 papers). Isotachopheresis (ITP) was employed three times [30–32] but solely as a pre-concentration technique coupled to CZE (see Section 5). Merely two papers dealing with the separation of polyphenols are based on novel techniques of non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) [14] and microchip-CE [15].

2.1. Background electrolytes (BGEs)

It is well known that the separation mechanism in CZE is based on the differences between the charge/mass ratio of the solutes and that the degree of ionization of polyphenols (the pK_a values of –OH groups ranging between ≈ 7 and 12, depending on the structure of the polyphenol molecule, see, e.g., [21]) can be simply manipulated by using BGEs comprising alkaline buffers. As follows from the data collected in Table 1, for conventional CZE the pH of the most frequently exploited BGEs range between 9 and 10. Such BGEs are typically based on tetraborate buffers; here the ability of borate to form negatively charged complexes with vicinal –OH groups of polyhydric phenols is utilized as well. It must be noted that until now practically no attention has been paid to possible oxidation of rather reactive polyphenols with oxygen in alkaline BGEs. A tendency of using organic solvents (such as methanol and acetonitrile) as modifiers for improving efficiency in both CZE and MEKC is also notable [14,17,18,20,21,25,29–32,44,52–54,60]. Furthermore various types of cyclodextrins (CDs) were employed as components of the BGEs acting as chiral selectors or just improving the efficiency of separation of non-chiral analytes [16].

3. Micellar electrokinetic capillary chromatography (comparison with CZE and HPLC)

Even though it is generally believed that MEKC possesses higher separation efficiency than CZE the utilization of MEKC in the determination of flavonoids was about three times less frequent than that of CZE in recent 5 years. It seems that the use of borate-based buffers in conventional CZE allows sufficient resolution of polyphenols in relatively complicated mixtures most probably thanks to the above-mentioned complex-formation effects of borate. On the other hand in the case of compounds with similar structure but different lipophilicity, the use of micelles is advantageous since the separation process is affected by more factors compared to CZE (e.g., unsaturation of C-ring lowers the migration time; methylation of hydroxyl group increases the hydrophobicity of analyte and consequently its affinity to the micelles which results in increase in migration times; glycosylation and higher number of –OH groups increases hydrophilicity and therefore migration times are decreased) [21].

In the MEKC of polyphenols sodium dodecylsulphate is the most widely used surfactant as can be traced in the data of Table 1 [17,19,21,22,26,29,49,54,59,60]. Sodium cholate (SC) was reported as an auxiliary additive to SDS-containing BGE in the so called “mixed MEKC”. This separation technique utilizes the formation of mixed micelles formed from both surfactants to improve the resolution of either polar or non-polar analytes that could not be separated by conventional MEKC [17,18].

Favorable properties of BGEs containing mixed micelles were reported by Gotti et al. [19] who added sodium taurodeoxycholate and 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) to the SDS-containing BGE. The separation efficiency of these buffers in “mixed MEKC” was compared with the CD-modified-MEKC when determining catechins and xanthines in chocolate and cocoa. The best results were obtained with the addition of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) to the SDS-containing buffer but satisfactory results were attained also with the above-mentioned mixed-micelles systems based on taurodeoxycholate and CHAPS.

Sodium bis(2-ethylhexyl) sulphosuccinate (AOT) as the vesicles-forming surfactant was employed in the assay of BHQ, BHA, BHT, propyl-, octyl-, dodecyl-gallate and vitamin E in olive oil [20].

In a number of papers the merits and drawbacks of HPLC and the electromigration methods as utilized in routine analysis of polyphenols were discussed [17,22–24].

Bonoli et al. [22] validated RP-HPLC and MEKC methods employed for the determination of tea catechins. In this study the MEKC surpassed HPLC by higher sensitivity (the LODs for CE ranged from 0.0013 to 0.0051 $\mu\text{g/ml}$ whereas for HPLC the LOD values varied from 0.0250 to 0.385 $\mu\text{g/ml}$ at S/N ratio = 3), resolution and migration time repeatability (R.S.D. of retention times in HPLC ranged from 0.2 to 4.14% whereas the R.S.D. of migration times in MEKC did not exceed 1.78%). The MEKC lost to HPLC in the repeatability of the quantification of the overall content of catechins (the R.S.D. values ranged from 0.77 to 1.72% and from 1.01 to 5.54% for HPLC and MEKC, respectively).

Table 1
General characteristics of the reviewed methods

| Analytes/matrix | BGE | Capillary/voltage | Detection | Reference |
|---|---|---|-------------------------------------|-----------|
| Catechin, epicatechin, myricetin, quercetin, <i>trans</i> -resveratrol/wine | 5 mM malonate, 9.6 mM TBAOH in 100% MeOH | poly (GMA-co-NVP), 58.5 cm (8.5 cm) × 50 μm/30 kV | UV 230 nm | [14] |
| Chlorogenic, ferulic, gentisic and vanilic acid/wine | 15 mM borate (pH 9.5) | Microchip CE/2000 V | ED-carbon working electrode, +1.0 V | [15] |
| Isorhamnetin, kaempferol, quercetin/ <i>Hippophae rhamnoides</i> | 20 mM borate, 5 mg/ml DM-β-CD (pH 10.00) | 35 cm (30 cm) × 50 μm/15 kV | UV 270 nm | [16] |
| Ascorbic acid, butylated hydroxyanisole, <i>tert</i> -butylhydroquinone, butylated hydroxytoluene, propyl-, octyl-, dodecyl-gallate, isoascorbic acid, tocopherol/olive oil, wine | 10 mM borate, 40 mM SC, 15 mM SDS, 10% MeOH (pH 9.3) | 60 cm (52 cm) × 75 μm/18 kV | UV 254 nm, 214 nm | [17] |
| <i>Tert</i> -butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl-, octyl-, dodecyl-gallate/jam | 35 mM SC, 15 mM SDS, 20 mM borate, 10% MeOH (pH 9.3) | 60 cm (52 cm) × 75 μm/18 kV | UV 214 nm | [18] |
| Caffeine, catechin, cAMP, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, galocatechin, theobromine, theophylline/chocolate, cocoa | Detailed in text | 38.5 cm (8.5 cm) × 50 μm/15 kV | UV 220 nm | [19] |
| <i>Tert</i> -butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl-, octyl-, dodecyl-gallate, vitamin E/olive oil | 20 mM borate, 20% ACN, 20 mM AOT (pH 9.4) | 57 cm (50 cm) × 75 μm/24 kV | UV 280 nm | [20] |
| Catechin, epicatechin, hesperidin, icariin, ikarissoside, kaempferol, kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnoside, naringin, quercetin, 2''- <i>O</i> -rhamnosylcariside, tiliroside, wogonin/- | 10 mM H ₂ PO ₄ , 5 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 90 mM SDS, 10% ACN (pH 7.3) | 50 cm (42.4 cm) × 75 μm/18 kV | UV 214 nm | [21] |
| Gallic acid, catechin, catechin-3-gallate, epigallocatechin, epigallocatechin-3-gallate, epicatechingallate, galocatechin, gallocatechingallate | 20 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 200 mM SDS (3:1:2) (pH 7.0) | 47 cm (40 cm) × 50 μm/30 kV | UV 200 nm | [22] |
| Chlorogenic acid, hyperoside, rutin/ <i>Fagopyrum esculentum</i> | 60 mM borate (pH 10.0) | 64.5 cm (56 cm) × 50 μm/30 kV | UV 206 nm | [23] |
| Apigenin, baicalin, caffeic acid, galangin, hesperetin, kaempferol, luteolin, myricetin, naringenin, quercetin/wine grape | 35 mM borate (pH 8.9) | 70 cm (45 cm) × 75 μm/16.8 kV | UV 250 nm | [24] |
| Medicarpin, vestitone | 25 mM borate, 2 mM HP-β-CD, 20 mM HP-γ-CD, 10% MeOH (pH 10.0) | 80 cm (50 cm) × 50 μm/15 kV | UV 210 nm | [25] |
| Caffeine, catechin, epicatechin, catechin gallate, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate/tea beverage | 200 mM borate, 20 mM phosphate, 240 mM SDS, 25 mM 6- <i>O</i> -α- <i>D</i> -glucosyl-β-CD (pH 6.4) | 64.5 cm (56 cm) × 50 μm/25 kV | UV 210 nm | [26] |
| Apigenin sulfate, catechin sulfate, epicatechin sulfate, 6,2', 3'-flavonoid sulfate, quercetin sulfate | 20 mM phosphate buffer, 15% β-CD (pH 3.5) | 32.5 cm × 50 μm/-5, -10 kV | UV 230, 280 nm | [27] |
| <i>Cis/trans</i> -resveratrol/wine | 40 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.5) | 25 cm × 75 μm/5 kV | UV 320 nm | [28] |
| <i>Cis/trans</i> -resveratrol/wine | 75 mM SDS, 30 mM H ₃ BO ₃ , 30 mM Na ₂ HPO ₄ , 15% ACN (pH 9.2) | 37 cm (30 cm) × 50 μm/25 kV | UV 314 nm | [29] |
| Caffeic, chlorogenic, cinnamic, ferulic, isoferulic, pivalic and <i>p</i> -coumaric acid, hyperosid, isoquercitrin, quercetin, rutin, vitexin, vitexin-2- <i>O</i> '-rhamnoside/ <i>Sambucus</i> , <i>Crataegus</i> | 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS, 10 mM H ₃ BO ₃ , 0.2% HEC, 20% MeOH (pH 9.0) | FEP 16 cm × 0.3 mm | UV 254 nm, conductivity | [30] |
| Chlorogenic acid, hyperoside, isoquercitrin, quercetin, quercitrin, rutin/ <i>Hypericum perforatum</i> | 25 mM MOPSO (TAPS), 50 mM TRIS, 55 mM H ₃ BO ₃ , 0.2 % HEC, 20% MeOH (pH 8.3; 8.75) | FEP 16 cm × 0.3 mm | UV 254 nm, conductivity | [31] |

Table 1 (Continued)

| Analytes/matrix | BGE | Capillary/voltage | Detection | Reference |
|---|---|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Caffeic, ferulic, gallic, <i>p</i> -coumaric, protocatechuic, syringic and vanillic acid, apigenin, catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, kaempferol, rutin, vitexin/red wine | 25 mM MOPSO (TAPS), 50 mM TRIS, 15 (40) mM H ₂ BO ₃ , 0.2 % HEC, 5 mM β-CD, 20% MeOH (pH 8.5) | FEP 16 cm × 0.3 mm | UV 254 nm, conductivity | [32] |
| Caffeic, gallic, gentisic, <i>p</i> -coumaric acids, catechin, epicatechin, myricetin, quercetin, <i>trans</i> -resveratrol/wine | 0.1 M Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.5) | 67 cm × 75 μm/20 kV | UV 280 nm | [33] |
| Epicatechin, hyperoside, quercetin, rutin/ <i>Fagopyrum esculentum</i> | 50 mM borate (pH 8.7) | NA/NA | ED-carbon disc electrode, +0.9 V | [34] |
| Baicalin, baicalin, quercetin/ <i>Scutellaria radix</i> | 100 mM borate (pH 9.0) | 40 cm × 25 μm/12 kV | ED-carbon disc electrode, +0.9 V | [36] |
| Daidzein, quercetin, rutin/ <i>Cinnamomum camphora</i> , <i>Ligustrum lucidum</i> , <i>Flos sophorae</i> | 100 mM borate (pH 9.0) | 40 cm × 25 μm/12 kV | ED-carbon disc electrode, +0.9 V | [37] |
| Apigenin, catechin, epicatechin, luteolin, quercetin, rutin/ <i>Ginkgo biloba</i> | 50 mM borate (pH 9.0) | 70 cm × 25 μm/16 kV | ED-carbon disc electrode, +1.00 V | [38] |
| Catechin, epicatechin, kaempferol, quercetin, rutin/ <i>Hippophae rhamnoides</i> | 50 mM borate (pH 9.0) | 75 cm × 25 μm/14 kV | ED-carbon disc electrode, +950 mV | [39] |
| Chlorogenic acid, baicalin, baicalin | 15 mM borate (pH 9.2) | 60 cm/20 kV | ED-carbon disc electrode, +0.9 V | [40] |
| Acacetin, caffeic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid, quercetin, rutin/ <i>Herba cephalanoplois segeti</i> , <i>Herba cirsii japonici</i> | 50 mM borate (pH 8.4) | 75 cm × 25 μm/15 kV | ED-carbon disc electrode, +0.95 V | [41] |
| Farrerol, hyperoside, kaempferol, quercetin, scopoletin, umbeliferone/ <i>Rhododendron dauricum</i> | 70 mM borate (pH 9.2) | 75 cm × 25 μm/16 kV | ED-carbon disc electrode | [42] |
| Genistein, genistin, kaempferol, quercetin, rutin/ <i>Flos sophorae</i> | 50 mM borate (pH 9.0) | 75 cm × 25 μm/16 kV | ED-carbon disc electrode | [43] |
| Biochanin A, hesperetin, 5-methoxyflavone, naringenin/- | 40 mM ammonium acetate, 15 % ACN (pH 9.5) | NA/NA | Quadrupole ESI-MS | [44] |
| Chlorogenic acid, rutin/cigarettes | 20 mM borate (pH 10) | 50 cm × 75 μm/13 kV | Indirect chemiluminescence | [45] |
| Rutin/ <i>Aponycum venetum</i> , <i>Jinkgo biloba</i> , <i>Morus alba</i> , <i>Rhododendron dauricum</i> | 20 mM phosphate (pH 7.4) | 45 cm × 25 μm/20 kV | ED-carbon disc electrode | [46] |
| Caffeic acid, chlorogenic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, catechin, kaempferol, morin, myricetin, quercetin, <i>trans</i> -resveratrol, rutin/ <i>Hippophae rhamnoides</i> | 20 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.3) | 60 cm (41 cm) × 50 μm/20 kV | UV 210 nm | [47] |
| Biochanin A, daidzein, daidzin, genistein, puerarin/ <i>Puerarie radix</i> | 20 mM borax-NaOH (pH 10.1) | 47 cm (40 cm) × 50 μm/21 kV | UV 200 nm | [48] |
| Caffeine, catechin, epicatechin, epigallocatechinate, epigallocatechin, epigallocatechinate/tea (black, green) | 4 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 12 mM K ₂ HPO ₄ , 40 mM SDS (pH 7.0) | 85 cm (70 cm) × 50 μm/30 kV | UV 200 nm, 266 nm | [49] |
| Calycosin, licochalcone A, licoisoflavone A, liquiritin/ <i>Glycyrrhizae radix</i> | 100 mM borate (pH 10.5) | 58.5 cm (50 cm) × 50 μm/30 kV | UV 210 nm | [50] |
| Caffeic, cinnamic, dihydrocaffeic, ferulic, gallic, gentisic, <i>o</i> -coumaric, <i>p</i> -coumaric, protocatechuic, syringic and vanillic acid, hydroxytyrosol, quercetin, luteolin, oleuropein glycoside, taxifolin, tyrosol/olive oil | 45 mM borate (pH 9.6) | 47 cm (40 cm) × 50 μm/27 kV | UV 200 nm | [51] |
| Ascorbic acid, didymin, ferulic acid, hesperidin, narirutin, phenylalanin, phlorin, synephrine, tyrosine/orange juice | 35 mM borate, 5% ACN (pH 9.3) | 70 cm × 50 μm/21 kV | 200–360 nm | [52] |
| Apigenin, apigenin-7- <i>O</i> -glucoside, chlorogenic acid, isoorientin, isoschaftoside, luteolin-4'- <i>O</i> -glucoside, luteolin-7- <i>O</i> -glucoside, orientin, rutin, schaftoside, vicenin-2, vitexin/ <i>Achillea setacea</i> | 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 20% MeOH (pH 9.3) | 65.5 cm (58 cm) × 50 μm/30 kV | UV 275 nm | [53] |
| Apigenin, diplacone, mimulone/ <i>Paulownia tomentosa</i> | 20 mM borate, 10 mM SDS, 5% MeOH (pH 10.0) | 35 cm (30 cm) × 50 μm/15 kV | UV 280 nm | [54] |

Table 1 (Continued)

| Analytes/matrix | BGE | Capillary/voltage | Detection | Reference |
|---|--|-------------------------------|----------------|-----------|
| Acteoside, 3,7-dihydroxyquercetin, 20-hydroxyecdysone, rutin/ <i>Lamium maculatum</i> | 30 mM borate (pH 9.47) | 51 cm (43.4 cm) × 75 μm/20 kV | UV 254 nm | [55] |
| Catechin, gallic acid, kaempferol, quercetin, quercitrin/ <i>Morus alba</i> | 150 mM boric acid (pH 10.0) | 51 cm (42.5 cm) × 50 μm/18 kV | UV 270 nm | [56] |
| Apigenin, caffeic acid, ferulic acid, luteolin, quercetin, rutin/propolis | 50 mM borate (pH 9.2) | 60 cm (50 cm) × 75 μm/23 kV | UV 262 nm | [57] |
| Baicalin, baicalin, oroxylin A, oroxylin A-7-O-glucuronide, wogonin, wogonin-7-O-glucuronide/ <i>Scutellariae radix</i> | 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 7.24) | NA/NA | UV 254 nm | [58] |
| Quercetin, naringenin | 200 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 50 mM SDS (pH 8.5) | 50 cm × 50 μm/18 kV | UV 200–360 nm | [59] |
| Benzoic, cinnamic, 3,4-dimethoxycinnamic and p-coumaric acids, chrysin, galangin, methyl and propyl 4-hydroxybenzoates, pinocembrin and its 12 derivatives/propolis | 25 mM borate, 50 mM SDS, 10% ACN (pH 9.3) | 64.5 cm (56 cm) × 50 μm/30 kV | UV 200 nm | [60] |
| Caffeic, chlorogenic, ferulic and protocatechuic acid, flavone, quercitrin, rutin/- | 30 mM NaH ₂ PO ₄ , 30 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0) | 87 cm (80 cm) × 50 μm/30 kV | UV 220 nm | [61] |
| D-catechin, epicatechin, myricetin, quercetin, rutin/- | 30 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 8.85) | 67 cm (60 cm) × 50 μm/20 kV | UV 220, 380 nm | [61] |

Abbreviations: ACN: acetonitrile, AOT: bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinate, cAMP: cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, CD: cyclodextrin, ED: electrochemical detection, FEP: fluorinated ethylene-propylene copolymer, HEC: 2-hydroxyethylcellulose, HP-CD: hydroxypropyl-cyclodextrin, MeOH: methanol, MOPSO: β-hydroxy-4-morpholinopropanesulfonic acid, NA: not available, poly-(GMA-co-NVP): poly(glycidylmethacrylate-co-N-vinylpyrrolidone), SC: sodium cholate, TAPS-N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid, TBAOH: tetrabutylammonium hydroxide, TRIS: tris(hydroxymethylamino)methane.

The results of other studies [17,23,24] indicate that the CE compares well with HPLC in terms of precision, linearity and limit of detection. For example Wang et al. [24] developed both CZE and HPLC methods for the assay of nine flavonoids in wine grapes. In this case the CZE seems to be slightly more sensitive than HPLC (the LODs fell within 0.08–0.21 and 0.030–0.210 μg/ml for HPLC and CZE, respectively). Reproducibility of either method was very similar (e.g. R. S. D. of run-to-run reproducibility of retention times ranged from 0.34 to 0.53% for HPLC and from 0.24 to 0.39% for CZE; R. S. D. of run-to-run integrated peak area varied from 0.70 to 3.82% for HPLC and 0.79 to 3.91% for CZE). Also the recovery experiment gave comparable results for both methods (93.3–107% for HPLC and 90.1–99.8% for CZE). Linear range is similar for both methods (0.1–80 and 0.100–150 μg/ml for HPLC and CZE, respectively; $r \geq 0.9990$).

4. Electrophoretic determination of various kinds of isomers including chiral separations

Allen et al. [25] applied CZE for fast screening of the enantiomeric purity of flavonoids biosynthesized by transgenic leguminous plants. Simultaneous chiral separation of mixtures containing four enantiomers, namely *R*-vestitone, *S*-vestitone and their metabolites (+)-medicarpin and (–)-medicarpin was achieved by adding two different cyclodextrins into the BGE (HP-β-CD and HP-γ-CD facilitated the separation of the vestitones and the medicarpins, respectively). The addition of

methanol into the BGE with the two CDs improved also the separation.

Various types of cyclodextrins were tested to resolve enantiomers of catechin and epicatechin. Only 6-*O*-α-D-glucosyl-β-cyclodextrin (6G-β-CD) and HP-γ-CD were effective in their separation, but only 6G-β-CD allowed to separate them from other catechins. The method was applied to the analysis of real samples of teas and tea beverages [26].

Dantuluri et al. [27] were the first in finding separation conditions for the resolution of highly sulfated flavanoids and flavonoids. The possibility of chiral separation of (±)-catechin sulfate (CS) enantiomers and (–)-epicatechin sulfate (ECS) and (+)-CS diastereomers was examined by applying various chiral selectors. Because of high charge density of these compounds it was possible to separate them with BGEs containing β-CD either in pressurized capillary under the positive voltage or under the reversed polarity conditions; the latter technique gave better results.

Two papers dealing with the separation of *cis*- and *trans*-resveratrol as positional isomers were published [28,29]. Nevado et al. [28] used simple borate buffer to separate these isomers whereas Gu et al. [29] devised a MEKC method for the same purpose. In either case the limits of detection and migration times of both isomers were similar but in [29] the linear calibration range for *trans*-resveratrol was wider (45.6 μg to 22.8 mg/l in [29] and 500 μg to 20 mg/l in [28]). Both methods were applied for the determination of *cis*- and *trans*-resveratrol in wines but SPE with C-18 cartridge for the sample pretreatment was required.

Table 2
List of analytical matrices

| Plant/drug | References |
|--|------------------------|
| <i>Achillea setacea</i> | [53] |
| <i>Aponycum venetum</i> | [46] |
| <i>Cephalanoplosis segeti herba</i> | [41] |
| Chocolate | [19] |
| Cigarettes | [45] |
| <i>Cinnamomum camphora</i> | [37] |
| <i>Cirsii japonici herba</i> | [41] |
| Cocoa | [19] |
| <i>Crataegus</i> | [30] |
| <i>Fagopyrum esculentum</i> | [23,34] |
| <i>Ginkgo biloba</i> | [38,46] |
| <i>Glycyrrhizae radix</i> | [50] |
| <i>Hippophae rhamnoides</i> | [16,39,47] |
| <i>Hypericum perforatum</i> | [31] |
| Jam | [18] |
| <i>Lantium maculatum</i> | [55] |
| <i>Ligustrum lucidum</i> | [37] |
| <i>Morus alba</i> | [46,56] |
| Olive (oil, leaves— <i>Eucomnia ulmoides</i>) | [20,51] |
| Orange juice | [52] |
| <i>Paulownia tomentosa</i> | [54] |
| Propolis | [57,60] |
| <i>Puerariae radix</i> | [48] |
| <i>Rhododendron dauricum</i> | [42,46] |
| <i>Sambucus flos</i> | [30] |
| <i>Scutellariae radix</i> | [36,58] |
| Sesame oil | [17] |
| <i>Sophorae flos</i> | [37,43] |
| Tea beverage | [26] |
| Tea (black, green) | [49] |
| Wine | [14,15,17,28,29,32,33] |
| Wine (grapes) | [24] |

5. On-line methods utilized for the sample pretreatment

On-line coupling of ITP and CZE (ITP-CZE) has been used recently for the determination of antioxidants in various matrices; here the background electrolyte used in the CZE step may be generally different from the LE and TE used in the preceding ITP phase but the simplest way is to utilize the TE or LE from the ITP step as the BGE in the CZE phase. The ITP-CZE technique allows improving the limits of detection substantially and at the same time it involves a pre-separation step enabling the removal of unwanted matrix from the minor analytes of interest when analyzing complex samples such as plant materials or wines [30–32].

The ITP pre-separation and pre-concentration step was carried out in fluorinated ethylene-propylene copolymer capillary (9.0 cm × 0.8 mm i.d.) linked to a CZE column operated with UV detection. Picric acid and 1-nitroso-2-naphthol were used as coloured markers to ensure proper timing of the introduction of the stacked flavonoid ITP zones into the CZE capillary.

Another example of possible on-line pre-concentration of analytes leading to the improvement of limits of quantification is integration of a flow-injection (FI) system with a CE analyzer [33]. The FI system conducted automated solid-phase extraction (SPE) of analytes before the CE analysis of wine samples for flavonoids. The analytes were initially retained on a C-18

Table 3
List of analytes

| Substance | References |
|------------------------------------|--|
| Acacetin | [41] |
| Apigenin | [24,32,38,53,54,57] |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside | [53] |
| Apigenin sulfate | [27] |
| Baicalcin | [40] |
| Baicalein | [24,36,58] |
| Baicalin | [36,40,58] |
| Biochanin A | [44,48] |
| Caffeic acid | [24,30,32,33,41,47,51,57,61] |
| Calycosin | [50] |
| Catechin | [14,19,21,22,26,32,33,38,39,47,49,56,61] |
| Catechin-3-gallate | [22,26] |
| Catechin sulfate | [27] |
| Chlorogenic acid | [15,23,30,31,40,41,45,47,53,61] |
| Chrysin | [60] |
| Cinnamic acid | [30,51,60] |
| Daidzein | [37,48] |
| Daidzin | [48] |
| Didymin | [52] |
| Dihydrocaffeic acid | [51] |
| 3,7-Dihydroxyquercetin | [55] |
| 3,4-Dimethoxycinnamic acid | [60] |
| Diplacone | [54] |
| Dodecylgallate | [17,18,20] |
| Epicatechin | [14,19,21,26,32-34,38,39,49,61] |
| Epicatechingallate | [19,22,26,49] |
| Epicatechin sulfate | [27] |
| Epigallocatechin | [19,22,26,49] |
| Epigallocatechin-3-gallate | [19,22,26,49] |
| Farrerol | [42] |
| Ferulic acid | [15,30,32,47,51,52,57,61] |
| Flavone | [61] |
| 6,2',3'-Flavonoid sulfate | [27] |
| Galangin | [24,60] |
| Gallic acid | [22,32,33,47,51,56] |
| Gallocatechin | [19,22] |
| Gallocatechingallate | [22] |
| Genistein | [43,48] |
| Genistin | [43] |
| Genistic acid | [15,33,51] |
| Hesperetin | [24,44] |
| Hesperidin | [21,52] |
| Hyperoside | [23,30,31,34,42] |
| Icariin | [21] |
| Ikarisoid A | [21] |
| Isoferulic acid | [30] |
| Isoorientin | [53] |
| Isoquercitrin | [30,31] |
| Isorhamnetin | [16] |
| Isoschaftoside | [53] |
| Kaempferol | [16,21,24,32,39,42,43,47,56] |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnoside | [21] |
| Licochalcone A | [50] |
| Licoisoflavone A | [50] |
| Liquiritin | [50] |
| Luteolin | [24,38,51,57] |
| Luteolin-4'- <i>O</i> -glucoside | [53] |
| Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside | [53] |
| Medicarpin | [25] |
| 5-Methoxyflavone | [44] |
| Mimulone | [54] |
| Morin | [47] |
| Myricetin | [14,24,33,47,61] |

Table 3 (Continued)

| Substance | References |
|-------------------------------------|--|
| Naringenin | [24,44,59] |
| Naringin | [21] |
| Narirutin | [52] |
| <i>o</i> -Coumaric acid | [51] |
| Octylgallate | [17,18,20] |
| Orientin | [53] |
| Oroxylin A | [58] |
| Oroxylin A-7- <i>O</i> -glucuronide | [58] |
| <i>p</i> -Coumaric acid | [30,32,33,47,51,60] |
| Pinocembrin | [60] |
| Propylgallate | [17,18,20] |
| Protocatechuic acid | [32,41,51,61] |
| Puerarin | [48] |
| Quercetin | [14,16,21,24,30-32,34,36-39,41-43,47,51,56,57,59,61] |
| Quercetin sulfate | [27] |
| Quercitrin | [31,32,56,61] |
| Resveratrol | [14,28,29,33,47] |
| 2''- <i>O</i> -Rhamnosylcariside | [21] |
| Rutin | [23,30-32,34,37-39,41,43,45-47,53,55,57,61] |
| Schaftoside | [53] |
| Scopoletin | [42] |
| Syringic acid | [32,51] |
| Taxifolin | [51] |
| Tiliroside | [21] |
| Umbeliferone | [42] |
| Vanillic acid | [15,32,51] |
| Vestitone | [25] |
| Vicenin-2 | [53] |
| Vitexin | [30,32,53] |
| Vitexin-2- <i>O</i> ''-rhamnoside | [30] |
| Wogonin | [21,58] |
| Wogonin-7- <i>O</i> -glucuronide | [58] |

SPE minicolumn and thereafter they were eluted by methanol directly into the CE autosampler through a programmable arm. Compared to ITP-CZE the FI-CE method was approximately 10-times less sensitive (the LODs of most analytes were 0.03 mg/l in the case of ITP-CZE [32] whereas for FI-CE [33] the LODs ranged from 0.14 to 0.36 mg/l except of *trans*-resveratrol whose LOD was 0.05 mg/l). On the other hand the calibration range for FI-CE was much wider (0.05–100 mg/l) compared to ITP-CZE (0.125–5 µg/ml [32]). The repeatability of migration times ($n=6$) was favourable (the R.S.D. values did not exceed 1.9% but they were below 1% for most analytes). The repeatability of peak areas ($n=6$) was worse: for nine substances the R.S.D. ranged from 0.01 to 1.59% but for ferulic acid and quercetin the R.S.D. were 8.02 and 10.98%, respectively [32]. In the case of FI-CE only the repeatability data of peak areas ($n=11$) were available (the R.S.D. ranged from 3.2 to 7.1%). The recovery experiments were accomplished only in the FI-CE paper [33] and the recoveries varied between 92 and 110% (at different concentration levels).

6. Detection techniques

Besides the widely used UV spectrophotometric detection in CZE of polyphenols (35 papers) electrochemical detection (ED)

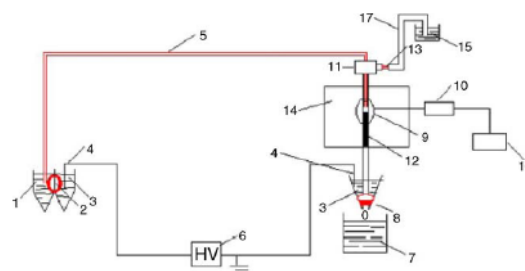


Fig. 2. Schematic diagram of CE chemiluminescence system: (1) running buffer cell; (2) frit; (3) electrode buffer cells; (4) Pt electrodes; (5) electrophoretic capillary; (6) high-voltage power supply; (7) waste reservoir; (8) silicone seal; (9) PMT; (10) amplifier; (11) T-connector; (12) reaction tube; (13) capillary restrictor; (14) dark box; (15) $K_3Fe(CN)_6$ bottle; (16) computer with A/D card; (17) reagent tube. Reprinted from [45] with permission from Elsevier.

was a frequent alternative (11 papers) thanks to the fact that most of the polyphenols are easily oxidized. Although the UV detection is the most common detection technique in CZE, its main disadvantage is usually lower sensitivity compared to UV detection in HPLC. This can be overcome either by the extension of light pathway (wider bore capillaries or the so called “bubble cells” [23]) or by applying the technique of sample stacking (see Section 5). Generally ED afforded higher sensitivity than UV detection (LOD values ranged from 10^{-8} to 10^{-7} g/ml of an analyte for ED and from 10^{-5} to 10^{-7} g/ml for UV detection) and good selectivity [10]; consequently the ED is favorable in the CZE analysis of plant materials for polyphenols because compounds such as proteins, carbohydrates and lipids normally do not interfere. The “bubble cell” extended capillary [23] and ED [34] were employed in the analysis of phenolic compounds in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*); the latter detection techniques was slightly more sensitive (the LOD ranged from 0.5 to 2.5 µg/ml of an analyte for UV detection and from 0.2 to 0.5 µg/ml for ED).

Chinese authors used an ED (amperometric) system based on the end-column wall-jet configuration in which the working electrode is placed at the outlet of the separation capillary and detection is performed in the same solution reservoir that contains the grounding electrode for the CE instrument [35]. In all papers cited a three-electrode cell consisting of a carbon disc working electrode, a platinum auxiliary electrode and saturated calomel electrode as the reference electrode was utilized; working potentials were optimized by hydrodynamic voltammetry [34,36–43,46].

Surprisingly mass-spectrometric detection appeared only once [44] in the papers reviewed and its sensitivity was the same (0.5 mg/l for hesperetin and naringenin) or 10-times worse (2 mg/l for biochanin A) compared to UV detection.

Pre-separation step in the ITP-CZE [30–32] was monitored by auxiliary conductivity detection.

On-column chemiluminescence quenching was another option for detecting separated analytes (see Fig. 2) [45]. Luminol was added to the BGE and introduced at the head of separation capillary during electrophoresis. An alkaline potassium hexacyanoferrate solution merged with the BGE at the outlet of the

separation capillary. The limits of detection were by two orders lower (10^{-5} mol/l) compared to the UV detection (10^{-3} mol/l) when the analysis was performed under the same separation conditions and with the same capillary. On the other the presence of relatively wide reaction capillary (0.8 mm i.d.) connected to the end of the separation capillary influenced negatively the separation efficiency and resolution. Such indirect chemiluminescence detection was applied for the determination of rutin and chlorogenic acid in cigarettes. Since the sample matrix inhibited the chemiluminescence reaction too, correction by means of the standard addition method was necessary.

7. Evaluation of antioxidation activity of polyphenols by electromigration methods

CZE was utilized for evaluating antioxidation activity of polyphenols and plant extracts. Cao et al. [46] developed an indirect CZE method capable of determining hydroxyl radical generated by Fenton reaction. Salicylic acid is allowed to react with hydroxyl radical to originate 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) that are separated and determined by CZE with ED. If rutin or plant extracts containing rutin are introduced into the reaction mixture, the generation of hydroxyl radical and accordingly the formation of 2,3-DHBA and 2,5-DHBA is suppressed. Rapid and simple determination of hydroxyl radical scavenging activity of plant extracts can be carried out in this way.

Recently paper dealing with the on-column monitoring of reaction kinetics for the determination of antioxidation potential of various polyphenols was published [47]. Both antioxidants and hydrogen peroxide were introduced into the CZE capillary by means of autosampler. After fixed incubation period the voltage was switched on and the reaction products were separated. Rutin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, caffeic acid and gallic acid were tested either as individual compounds or in various combinations. The rate constant of their oxidation was calculated and compared with that of ascorbic acid as the reference substance. This method was also applied to the determination of antioxidant potential of *Hippophae rhamnoides* extract. Unavailability of commercial pneumatic autosampler utilized in this study is certain disadvantage of this method.

8. Miscellaneous

Demianová et al. [14] devised a quick and repeatable NACE method using 5 mM malonate and 9.6 mM tetrabutylammoniumhydroxide in anhydrous methanol as the BGE and coated (poly(glycidylmethacrylate-co-*N*-vinylpyrrolidone)) capillaries for the determination of polyphenols in wines. Application of such capillaries shortened the time of analysis and improved repeatability in comparison with conventional bare capillaries. The electroosmotic flow (EOF) in coated capillaries was significantly reduced (4×10^{-9} m² V⁻¹ s⁻¹). The lifetime of treated capillaries was 40–45 days.

In spite of the fact that lab-on-chip technology undergoes rapid development in recent decade, only one paper using the microchip-CE technique was dealing with the separation of

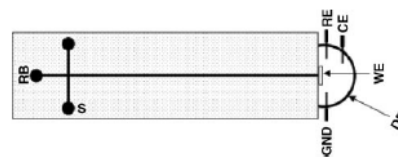


Fig. 3. Schematic diagram of the electrophoretic glass microchip system coupled with a screen-printed working electrode detector. S, sample reservoir; RB, run buffer reservoir; WE, working electrode; RE, reference electrode; CE, counter electrode; GND, ground electrode; DR, detector reservoir. Reprinted from [15] with permission from Elsevier.

phenol derivatives of natural origin. Scampicchio et al. [15] employed the microchip-CE method with amperometric detection (see Fig. 3) for the separation of hydroxyphenylcarboxylic acids, namely chlorogenic, ferulic, gentisic and vanilic acid and for their determination in real wine samples. The method was fairly reproducible (R.S.D. corresponding to the repeatability of migration times ranged from 1.4 to 3.0% and that of peak areas from 3.1 to 6.7%) with good linearity (linear range 50–300 μ M for chlorogenic acid and gentisic acid with correlations coefficients 0.998 and 0.996, respectively) and high sensitivity (LOD 10 μ M of chlorogenic and gentisic acid; S/N = 3); simple sample pre-treatment and insignificant sample and BGE consumption were the major advantages.

9. Concluding remarks

In spite of the fact that the MEKC of polyphenols possesses higher separation efficiency than classical CZE, the CZE has been utilized more frequently than MEKC for the determination of flavonoids (the ratio of the number of CZE/MEKC papers dealing with flavonoids and published in the recent 5 years is 3). Apparently the conventional CZE with alkaline borate-based BGEs exhibits sufficient separation effect for the resolution of polyphenols in complex mixtures probably thanks to the complex-formation ability of borate. On the other hand, it seems that the danger of using alkaline BGEs for the analysis of such strong reductants as polyphenols (that can be easily oxidized by dissolved oxygen) has not yet been much considered by practicing analysts. In some cases, especially for compounds with similar structure but different lipophilicity, the use of micelles is advantageous since the electrophoretic behaviour of the analytes is affected by more factors (compared to CZE) that can be appropriately manipulated and optimized (surfactant concentration, addition of organic solvent).

In addition to the CE analysis of complex mixtures of polyphenols including chiral separations, the determination of the level of antioxidation activity of individual compounds or plant extracts is feasible. On-line coupling of electromigration methods with pre-separation methods (especially with ITP) facilitates integration of automated sample clean-up and analyte pre-concentration with the analysis proper. Microchip CE provides rapid analysis with small sample and solvent consumption.

When considering these facts it can be noted that CE became a powerful analytical technique suitable for the separation of

polyphenols that often compares well with HPLC in terms of precision, linearity and limit of detection.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of Charles University No. 296/2005/BCH, Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. NL/7689-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

References

- [1] H. Tapiero, K.D. Tew, G. Nguyen Ba, G. Mathé, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 200–207.
- [2] K.L. Tuck, P.J. Hayball, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 636–644.
- [3] M.G. Khalefi, *High Performance Capillary Electrophoresis (Theory, Techniques, and Applications)*, John Wiley and Sons, Inc., Toronto, 1998.
- [4] M.C. Boyce, *Electrophoresis* 22 (2001) 1447–1459.
- [5] C.W. Klampff, W. Buchberger, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 357–364.
- [6] X. Gu, Q. Chu, M. O'Dwyer, M. Zeece, *J. Chromatogr.* 881 (2000) 471–481.
- [7] L. Suntornsuk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 679–698.
- [8] J.J. Dalluge, B.C. Nelson, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 411–424.
- [9] H. Horie, K. Kohata, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 425–438.
- [10] Y. Cao, Q. Chu, J. Ye, *J. Chromatogr. B* 812 (2004) 231–240.
- [11] B. Li, Y. Jiang, F. Chen, *J. Chromatogr. B* 812 (2004) 277–290.
- [12] V.B. Guliyev, M. Gul, A. Yildirim, *J. Chromatogr. B* 812 (2004) 291–307.
- [13] I. Molnár-Perl, Zs. Füzfai, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 201–227.
- [14] Z. Demianová, H. Sirén, R. Kuldvee, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 24 (2003) 4264–4271.
- [15] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 189–194.
- [16] M. Yue, T.-F. Jiang, Y.-P. Shi, *Talanta* 62 (2004) 695–699.
- [17] M.C. Boyce, E.E. Spickett, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1970–1975.
- [18] M.C. Boyce, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 369–375.
- [19] R. Gotti, J. Fiori, F. Mancini, V. Cavriani, *Electrophoresis* 25 (2004) 3282–3291.
- [20] M.M. Delgado-Zamarreño, A. Sánchez-Peréz, I. González Maza, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 403–414.
- [21] S.F. Wang, J.Y. Zhang, X.G. Chen, Z.D. Hu, *Chromatographia* 59 (2004) 507–511.
- [22] M. Bonoli, M. Pelillo, T.G. Toshi, G. Lercker, *Food Chem.* 81 (2003) 631–638.
- [23] I. Hinneburg, Y. Mrestani, R.H.H. Neubert, *Chromatographia* 59 (2004) 591–594.
- [24] S.-P. Wang, K.-J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 273–279.
- [25] D.J. Allen, J.C. Gray, N.L. Paiva, J.T. Smith, *Electrophoresis* 21 (2000) 2051–2057.
- [26] S. Kodama, A. Yamamoto, A. Matsunaga, H. Yanai, *Electrophoresis* 25 (2004) 2892–2898.
- [27] M. Dantuluri, G.T. Gunnarsson, M. Riaz, H. Nguyen, U.R. Desai, *Anal. Biochem.* 336 (2005) 316–322.
- [28] J.J.B. Nevado, A.M.C. Salcedo, G.C. Peñalvo, *Analyst* 124 (1999) 61–66.
- [29] X. Gu, L. Creasy, A. Kester, M. Zeece, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3223–3227.
- [30] M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polásek, *Electrophoresis* 23 (2002) 1045–1052.
- [31] M. Urbánek, L. Blechtová, M. Pospíšilová, M. Polásek, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 261–271.
- [32] R. Hamoudová, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polásek, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 281–287.
- [33] L. Arce, M.T. Tena, A. Rios, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 27–38.
- [34] Y.Y. Peng, F.H. Liu, J.N. Ye, *Anal. Lett.* 37 (2004) 2789–2803.
- [35] J. Ye, R.P. Baldwin, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3525–3527.
- [36] G. Chen, H. Zhang, J. Ye, *Talanta* 53 (2000) 471–479.
- [37] G. Chen, H. Zhang, J. Ye, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 69–76.
- [38] Y. Cao, Q. Chu, Y. Fang, J. Ye, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 294–299.
- [39] Q.C. Chu, W.Q. Qu, Y.Y. Peng, Q.H. Cao, J.N. Ye, *Chromatographia* 58 (2003) 67–71.
- [40] Y.Y. Peng, X.H. Ding, Q.C. Chu, J.N. Ye, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2793–2803.
- [41] Q.C. Chu, Y.H. Cao, Y.Y. Peng, L. Fu, J.N. Ye, *Chromatographia* 60 (2004) 125–130.
- [42] Y.Y. Peng, F.H. Liu, J.N. Ye, *Chromatographia* 60 (2004) 597–602.
- [43] Q.C. Chu, T. Wu, L. Fu, J.N. Ye, *Microchim. Acta* 148 (2004) 311–315.
- [44] C.W. Huck, G. Stecher, W. Ahler, W.M. Stoeckl, W. Buchberger, G.K. Bonn, *J. Separ. Sci.* 25 (2002) 904–908.
- [45] H.L. Jiang, Y.Z. He, H.Z. Zhao, Y.Y. Hu, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 111–119.
- [46] Y. Cao, Q. Chu, J. Ye, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 691–695.
- [47] M. Vaher, S. Ehala, M. Kaljurand, *Electrophoresis* 26 (2005) 990–1000.
- [48] C.Y. Wang, H.Y. Huang, K.L. Kuo, Y.Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 225–231.
- [49] M.B. Barroso, G. Werken, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 225–230.
- [50] T. Bo, K.A. Li, H. Liu, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 345–354.
- [51] M. Bonoli, M. Montanucci, T.G. Toschi, G. Lercker, *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 163–172.
- [52] P.F. Candalon, *LC-GC-Europe* 16 (2003) 151–153.
- [53] E. Marchart, B. Kopp, *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 363–368.
- [54] T.F. Jiang, X. Du, Y.P. Shi, *Chromatographia* 59 (2004) 255–258.
- [55] C. Shuya, C. Xingguo, H. Zhide, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 477–482.
- [56] L. Suntornsuk, S. Kasemsook, S. Wongyai, *Electrophoresis* 24 (2003) 1236–1241.
- [57] Y.H. Cao, Y. Wang, Q. Yuan, *Chromatographia* 59 (2004) 135–140.
- [58] L. Qi, R. Zhou, Y.F. Wang, Y.C. Zhu, *J. Capillary Electrophor.* 5 (1998) 181–184.
- [59] Bio-Rad Application Note, 1575-57, January 1999, 3 pp.
- [60] M.J. Hillhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 608–612.
- [61] A. Kulomaa, H. Sirén, M.L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 523–532.

5.1.2 Příloha 2: Jáč, P., Polášek, M., Vaz Batista, A. I., Kaderová, L.: Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate, *Electrophoresis* 29, 2008, 843-851.

Pavel Jáč
Miroslav Polášek
Ana I. V. Batista
Lenka Kaderová

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

Received August 11, 2007
Revised October 4, 2007
Accepted October 11, 2007

Research Article

Tungstate as complex-forming reagent facilitating separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis and its comparison with borate

A novel electrophoretic BGE containing tungstate as complex-forming reagent is suitable for the separation of polyphenols. Similar to molybdate-containing BGE reported earlier (*cf.* M. Polášek, *et al.*, *Talanta* 2006, 69, 192) addition of tungstate to BGE affects significantly migration of compounds/ligands with vicinal –OH groups due to the formation of negatively charged complexes involving W(VI) as central ion. Baseline separation of mixtures of flavonoids (apigenin, luteolin, hyperoside, quercetin, and rutin) and phenolic acids (chlorogenic and *p*-coumaric acid) was achieved within 15 min with optimized BGE of pH 7.4 containing 50 mM *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-2'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), 2.2 mM tungstate, and 25% v/v of methanol. The separation was performed in a 75 cm (effective length 42 cm) × 75 μm id uncoated fused-silica capillary at 30 kV with spectrophotometric detection at 275 nm. The calibration curves were rectilinear for 25–175 μg/mL of all analytes (cinnamic acid as the internal standard). The LODs ranged from 1.8 to 6 μg/mL for all analytes except for chlorogenic acid. Intraday precision ($n = 6$) of migration times ($RSD \leq 1.2\%$) and peak areas ($RSD \leq 5.6\%$) was evaluated. The tungstate-based BGEs can be alternatively utilized for the analysis of polyphenols at considerably lower pH than with conventional alkaline borate-based BGEs.

Keywords:

Borate / Complexation / Flavonoids / Phenolic acids / Polyphenols / Tungstate selector
DOI 10.1002/elps.200700598

1 Introduction

Improvement of separation selectivity is of fundamental importance in separation methods. In CE this can be achieved through addition of various additives to BGE. Several complexation additives were applied in CE to enhance separation selectivity. For example, EDTA acid was used for the simultaneous CE separation of small anions and cations [1]. The employment of complexation for enhancing separation selectivity in the analysis of metal ions or organic ligands by the addition of appropriate reagents into the BGEs was discussed by Chiari [2]. In this context utilization of borate buffers achieved relatively high popularity in CE

analyses of different compounds possessing vicinal hydroxyl groups. A comprehensive study dealing with the complex formation of borate with electroneutral carbohydrates lacking significant chromophores was published earlier [3]. Here the authors also paid attention to the structure of negatively charged complexes and their spectroscopic properties. In this case the formation of negatively charged borate–hydrocarbon complexes absorbing in the UV region enabled both the CE separation of carbohydrates and their relatively sensitive UV detection at 195 nm. Carboxylated carbohydrates and their related 1,4-lactones with aliphatic 1,2- or 1,3-diol moieties were separated by CZE using BGE containing 400 mM borate as complex-forming additive [4]. Though of negligible buffering capacity, such borate-based buffer of extremely low pH 7.1 was employed to avoid rapid hydrolysis of the lactones during the separation runs. Borate was also applied in the CE determination of naturally occurring polyphenols, for example, in *Fagopyrum esculentum* [5], wine grapes [6], red wine [7], and olive oil [8]. Tea catechins were separated in a borate–phosphate–SDS system [9, 10]. For other details concerning analysis of polyphenols by CE see relevant reviews [11, 12].

Correspondence: Dr. Miroslav Polášek, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05, Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: miroslav.polasek@faf.cuni.cz
Fax: +420-495-067-164

Abbreviations: IS, internal standard; MeOH, methanol

A relatively high pH of borate BGEs (~9–10) may be a drawback since the polyphenols can be oxidized by the air oxygen in alkaline aqueous media. Possible risk of spontaneous analyte oxidation with oxygen during the sample processing could be reduced by performing the CE separation under anaerobic conditions (which is not always effortlessly feasible) or in less alkaline or neutral BGEs [13–16]. For instance, tea catechins [13, 15] are stable toward oxidation in acidic medium. By increasing the pH from 5.0 to 7.4, the oxidation of tea catechins became faster. At pH values higher than 8 almost complete degradation was observed in a few minutes [13]. Recently Zenkevich *et al.* [16] examined the stability of aqueous solutions of quercetin (pH 8–10, ambient temperature, air bubbled through the test solution) by HPLC. After 1 h of air oxidation 86% of the original amount of quercetin was oxidized and after 3.5 h no quercetin could be detected by HPLC.

A new molybdate-based BGE suitable for the separation of polyhydric phenols at nearly neutral pH was introduced recently [17]. In that study, addition of molybdate (~mM concentrations) to neutral BGEs affected the electrophoretic migration of compounds with vicinal –OH groups but the electrophoretic behavior of monohydroxy compounds was unaffected. This effect is similar to that of borate but the complex formation with Mo(VI) occurs at considerably lower pH due to generally higher stability of Mo(VI) complexes with 1,2-dihydroxy ligands, such as 1,2-dihydroxybenzene (H₂L) forming [MoO₂L₂]²⁻ species [18].

It is well known that tungstate exhibits complex-formation properties similar to those of molybdate [18]. Several papers dealing with the structural studies of W(VI) and/or Mo(VI) complexes with sugar acids were published. For example, D-gulonic acid forms a number of different complex species with W(VI) or Mo(VI) and the complex formation is influenced by pH and metal–ligand concentration ratio [19]. Formation of various mono- and polynuclear complexes involving W(VI) or Mo(VI) as the central ion and D-gluconic [20], L-mannonic [21], D-galactonic [22], D-galacturonic [23], D-glucuronic [23], D-galactaric [24], and D-mannaric [24] acid as ligands was investigated by NMR previously. Complex formation of organic hydroxy acids (citric [25], lactic [26], and mandelic [27] acid) with tungstate or molybdate was investigated using potentiometric and enthalpimetric titrations. Amin *et al.* [28] investigated complexation equilibria between quinolone ligands (ciprofloxacin, ofloxacin, and norfloxacin) and tungstate, molybdate, or vanadate. A mixed phosphate-tungstate reagent forming a heteropoly anion [P(W₁₁O₃₉)]⁷⁻ was employed to determine trace amounts of Sb(III) and Bi(III) by CE [29].

To our best knowledge tungstate has not yet been used as a complex-forming selector in CE analysis of organic analytes. The aim of the paper presented is to examine the effect of sodium tungstate on the electrophoretic separation of a model mixture of polyphenols (containing apigenin, luteolin, hyperoside, quercetin, rutin, chlorogenic

acid, and *p*-coumaric acid) and to compare the figures of merit of the devised tungstate-based method with those of concurrently developed CE method based on borate BGE that is conventionally employed for the separation of polyphenols.

2 Materials and methods

2.1 Instrumentation

All experiments were carried out with a PrinCE 650 system (PrinCE Technologies B.V., The Netherlands) equipped with Lambda 1010 UV–VIS detector (Leonberg, Germany) and WinPrinCe software (as an integrated module of DAX data acquisition and analysis package). The pH of BGEs was measured by the PHM 220 pH-meter (Radiometer, France) with PHC2401-8 combined glass electrode calibrated with standard aqueous Radiometer buffers. Absorption spectra of solutions of the analytes in the BGEs were measured by Hewlett-Packard 8453 spectrophotometer.

2.2 Electrophoretic procedure

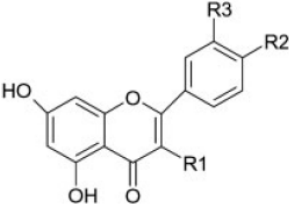
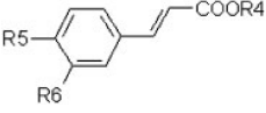
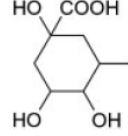
Uncoated fused-silica capillaries (75 μm id, total length 75 cm, 42 cm to detector; lot ANF02A) were obtained from Composite Metal Services (The Chase, Hallow, Worcester, UK). Before the first use the capillary was rinsed at 750 mbar successively with methanol (MeOH) for 5 min, ultra-pure water for 3 min, 0.1 M HCl for 20 min, ultra-pure water for 3 min, 1 M NaOH for 30 min, and ultra-pure water for 30 min. Daily the capillary was conditioned before the first and after the last analysis with 0.1 M NaOH followed by ultra-pure water (each step for 10 min at 1000 mbar). Between the runs the capillary was successively rinsed at 1000 mbar with 0.1 M NaOH for 2 min, ultra-pure water for 2 min, and appropriate BGE for 4 min. The capillary temperature was maintained at 25°C. Samples were injected hydrodynamically at 50 mbar for 6 s. The UV spectrophotometric detection was carried out at 275 nm. DMSO was used as the EOF marker.

2.3 Chemicals

Apigenin, boric acid, chlorogenic acid, DMSO, MeOH, *p*-coumaric acid, quercetin, *trans*-cinnamic acid, rutin, sodium tetraborate, and Tris were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). HEPES and luteolin were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium tungstate dihydrate was from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and hyperoside was from Roth (Karlsruhe, Germany). The structures of compounds under the study and their literature pK_a values (where available) are shown in Table 1.

Ultra-pure water produced by the Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout.

Table 1. Structural formulas of analytes and their ionization constants (pK_a)

| Structural formula | Analyte | R1 | R2 | R3 | pK_a |
|---|-------------------------|---|----|----|-----------|
|  | Apigenin | H | OH | H | 8.54 [30] |
| | Rutin | <i>O</i> -Rutinoside | OH | OH | 7.10 [31] |
| | Hyperoside | <i>O</i> -Galactose | OH | OH | – |
| | Quercetin | OH | OH | OH | 6.74 [31] |
| | Luteolin | H | OH | OH | – |
| Structural formula | Analyte | R4 | R5 | R6 | pK_a |
|  | <i>p</i> -Coumaric acid | H | OH | H | 4.64 [32] |
| | Chlorogenic acid |  | OH | OH | 3.59 [32] |
| | Cinnamic acid (IS) | H | H | H | 4.43 [32] |

2.4 Standard and electrolyte solutions

A stock solution containing 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each analyte (apigenin, chlorogenic acid, hyperoside, luteolin, *p*-coumaric acid, quercetin, and rutin) and internal standard (IS) solution containing 2 mg/mL of cinnamic acid were prepared in MeOH. The final calibration solutions were prepared by the dilution of the stock solution with MeOH to obtain solutions containing 25–175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each analyte. The concentration of cinnamic acid as IS in the final calibration solutions was 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Two different BGEs were prepared. The conventionally used borate electrolyte was prepared by dissolving weighted amount of sodium tetraborate in water and adjusting the pH by the addition of boric acid. For the novel tungstate electrolyte appropriate amount of HEPES was dissolved in 25% MeOH v/v followed by the addition of sodium tungstate. The apparent (pseudo) pH value (pH^*) was adjusted by the addition of Tris.

All standard and electrolyte solutions were degassed in an ultrasonic bath for 5 min. The BGEs were filtered through 0.45 μm nylon membrane syringe filters (Teknokroma, Barcelona, Spain).

2.5 Method optimization

2.5.1 Optimization of the tungstate-based method

HEPES, ACES, BES (*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), HEPPSO (*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-hydroxypropanesulfonic acid)), and MOPSO (3-morpholino-2-hydroxypropanesulfonic acid) were examined to select suitable buffering component of BGE and appropriate

detection wavelength was chosen. After these preliminary experiments the CE system was optimized by step-by-step optimization procedure in terms of HEPES concentration (10–100 mM), tungstate concentration (0–3.3 mM), pH^* of BGE (6.8–7.8), MeOH content (0–30% v/v), and separation voltage (20–30 kV).

2.5.2 Optimization of the borate-based method

The effect of borate buffer concentration (10–25 mM tetraborate), pH (8.4–9.2), MeOH content (5–15% v/v), and separation voltage (10–25 kV) was tested to find optimum separation conditions.

2.6 Qualitative and quantitative analysis

Resolution (R_s) was calculated as $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$ where t_1 and t_2 are migration times of two neighboring analytes and w_1 and w_2 are their respective peak widths measured at the baseline.

Linearity of calibration curves (involving five calibration solutions; each injected in triplicate) was evaluated by linear regression under the optimum separation conditions (see Sections 3.1.1 and 3.1.2). The concentration ranges of the analytes were 25–175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with cinnamic acid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as the IS. The calibration curves related the ratio (A_x/A_{IS}) of the normalized peak area of each analyte (A_x) and that of the IS (A_{IS}) to the concentration of the analyte C_x ($\mu\text{g}/\text{mL}$). The LOD was determined as $S/N = 3$. Similarly LOQ was calculated as $S/N = 10$.

Run-to-run ($n = 6$) and day-to-day ($n = 12$) repeatability of migration times of analytes as well as of corrected peak area ratios A_x/A_{IS} was examined at 75 $\mu\text{g/mL}$ analyte concentration level and expressed as RSD values.

2.7 Preparation of plant extract (*Hypericum perforatum* leaves)

Fifty-one grams of pulverized antidepressant tea was macerated overnight in 480 g of 80% v/v ethanol, thereafter the mixture was sonicated at -10°C for 10 min, filtered through dry paper filter, the residue on the filter was washed three times by 80 g of 80% ethanol, and the combined filtrate was lyophilized for 180 min; 250 mg of the lyophilized extract was dissolved in 25 mL of MeOH, and 1.0 mL aliquot of this solution was diluted to 10 mL with MeOH in a graduated flask (final test solution). This final test solution was injected. The analytes were identified by spiking the final test solution with appropriate standard solutions of analytes. For quantitative analysis the final test solution contained also 50 $\mu\text{g/mL}$ of IS (cinnamic acid). For recovery experiments the final test solution was treated with standard solutions of rutin and hyperoside to increase their concentration by 50 $\mu\text{g/mL}$.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of the methods

3.1.1 Optimization of separation in tungstate-containing BGE

It was expected that the separation mechanism and therefore the migration order of analytes in the tungstate-based BGE would be similar to that observed previously with molybdate-based BGE reported elsewhere [17]. The results of preliminary experiments (detailed data not shown) revealed that the best separation efficiency and peak shape is achieved with HEPES (pK_a 7.51) as the buffering component of the BGE and that the optimum detection wavelength is 275 nm. After these preliminary experiments the effect of HEPES and tungstate concentration, pH^* of BGE, content of MeOH in BGE, and separation voltage on the migration times of the analytes was studied to find conditions for baseline separation of the analytes under the study. The results are demonstrated in Fig. 1 (for clarity the curves of only four analytes, namely chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, and rutin are shown).

The effect of 10–100 mM HEPES (other separation conditions were maintained at 2.2 mM sodium tungstate, pH^* 7.4, 25% v/v of MeOH, 25 kV) was as expected, *i.e.*, generally the migration times of analytes were prolonged with increasing the concentration of HEPES. In BGEs containing 10 or 100 mM HEPES comigration of some analytes occurred. Best separation (in terms of resolution) was

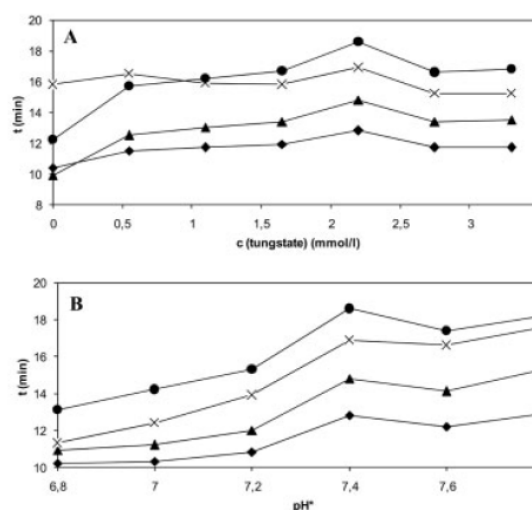


Figure 1. Optimization of the tungstate-based BGE: (A) effect of sodium tungstate concentration; (B) effect of pH^* . Markers: rutin -◆-; quercetin -▲-; *p*-coumaric acid -×-; chlorogenic acid -●-. See Section 3.1.1 for details.

achieved with 50 or 75 mM HEPES. Considering better peak symmetry, shorter migration times and lower risk of Joule heat generation 50 mM HEPES was preferred for further experiments.

Buffers with variable concentration of sodium tungstate (0–3.3 mM) acting as complex-forming reagent were investigated (other parameters were maintained constant: 50 mM HEPES, pH^* 7.4, 25% v/v of MeOH, 25 kV). In the absence of tungstate in the BGE the resolution of the analytes was influenced merely by their different acid–base properties and molecular mass. While at pH^* 7.4 the flavonoids quercetin and rutin comigrated (both partially ionized, with similar pK_a values, *cf.* Table 1, and certain difference in the size of their molecules) *p*-coumaric and chlorogenic acid (fully ionized at pH^* 7.4 but with significantly different M_r) were baseline separated. Addition of tungstate to the BGE resulted in the increase of migration times of quercetin and rutin and to their baseline separation. Resolution of both analytes was improved by increasing concentration of tungstate in the BGE up to 2.2 mM and thereafter it remained practically unchanged (*cf.* Fig. 1A). Both quercetin and rutin possess vicinal phenolic –OH groups; this is essential structural prerequisite enabling formation of their anionic complexes with tungstate. Because of the bigger molecule of rutin (comprising the sugar moiety) compared to quercetin the anionic tungstate complex of rutin exhibited lower migration time than that of quercetin. In the presence of tungstate the electrophoretic behavior of phenolic acids (chlorogenic and *p*-coumaric acid) was in good accordance with their structural ability/inability to interact with the selector. The migration time of *p*-coumaric acid (having no vicinal phe-

nolic groups in its molecule) was practically not influenced by the concentration of tungstate. On the other hand increasing concentration of tungstate caused a considerable increase of the migration time of chlorogenic acid due to formation of anionic complex species. This is well illustrated in Fig. 1A where at 1.1 mM tungstate concentration in the BGE the resolution of *p*-coumaric and chlorogenic acid worsened to total comigration while with further addition of tungstate the migration order of these acids was reversed and their baseline separation was attained in the presence of 2.2 mM tungstate. Analogically hyperoside and luteolin possess vicinal –OH groups, so their electromigration was influenced by complex formation with tungstate, whereas apigenin and cinnamic acid (IS) lack any vicinal hydroxy groups and therefore their migration times were affected by their own ionization and EOF only. Considering the resolution of all analytes and IS and the peak symmetry the optimum concentration of tungstate was set to 2.2 mmol/L.

The effect of pH* on the separation of the analytes is shown in Fig. 1B (other separation conditions were constant: 50 mM HEPES, 2.2 mM sodium tungstate, 25% v/v of MeOH, 25 kV). At low pH* 6.8 insufficient resolution of quercetin with rutin and *p*-coumaric acid with quercetin, respectively, was observed. With increasing pH up to 7.4 both migration times and resolution were increased. Additional increase of pH* led to worse separation of *p*-coumaric and chlorogenic acid. In order to obtain better peak symmetry pH* 7.4 was selected as optimal pH of the BGE. Evidently the increase of pH* of the BGE in the investigated range of pH 6.8–7.8 leads to the enhancement of EOF. Theoretically, in the absence of changes of analyte ionization and non-existence of the formation of negatively charged complexes the migration times of the analytes should decrease in this pH range. Therefore, by considering the pH-dependent increase of migration times of the analytes shown in Fig. 1B, this change could be caused by progressive ionization of the –OH groups of the analytes as well as by the formation of $[\text{WO}_2\text{L}_2]^{2-}$ type complexes but the contributions of these two effects to the overall observed mobilities are difficult to distinguish.

The effect of the content of MeOH (as organic modifier) in the BGE on the electrophoretic behavior of the analytes was examined in the range of 0–30% v/v. In the absence of MeOH total comigration of quercetin and *p*-coumaric acid was observed. The resolving power of the method was improved by increasing the content of MeOH to 25% v/v. Further addition of MeOH up to 30% v/v led to reduction of both migration times and resolution. With respect to peak symmetry, analysis time and resolution, 25% v/v of MeOH was found as the optimal content of organic modifier.

The last step of the method optimization was the selection of optimal voltage in the range of 20–30 kV. The applied voltage of 30 kV provided shortest analysis time and sufficient resolution.

Under the optimized conditions (50 mM HEPES, 2.2 mM sodium tungstate, pH* 7.4, 25% v/v of MeOH, and

30 kV) model mixture containing all the analytes and cinnamic acid as IS could be separated.

3.1.2 Optimization of separation in borate-based BGE

Borate buffer is conventionally applied as alkaline BGE for the separation of polyphenols and also for other molecules possessing vicinal –OH groups (e.g., carbohydrates). Generally, neutral analytes with vicinal –OH groups form negatively charged complexes with borate that are responsible for better resolving power when analyzing complex samples. Hence the fundamental mechanism of separation is similar to the molybdate- or tungstate-based BGEs but the structure, stability, and spectral properties of these complexes may be different.

When increasing the concentration of tetraborate from 10 to 25 mM (pH 9.2, no MeOH, voltage 20 kV) the analysis time was increased and simultaneously the resolution was improved. Nevertheless, *p*-coumaric acid and apigenin comigrated in a single zone that could not be resolved by changing the borate concentration. Considering the resolution and total analysis time, 20 mM borate was selected for further optimization experiments.

The influence of pH of borate buffer (pK_a of boric acid 9.23) on the separation of the analytes was investigated in the range of pH 8.4–9.2 (other parameters were unmodified: 20 mM tetraborate, no MeOH, 20 kV). The separation of *p*-coumaric acid from apigenin was not achieved by changing the pH of the BGE; these two analytes still migrated in a single zone, at pH 8.6 even together with chlorogenic acid. The best separation of all analytes except for the above-mentioned apigenin–*p*-coumaric acid couple was achieved at pH 9.0.

The applied voltage was tested in the range of 10–25 kV (other conditions were unmodified: 20 mM borate, pH 9.0, no MeOH). At 20 kV relatively good separation in short analysis time (migration times 6–10 min) was achieved. At 25 kV the migration times ranged between 5 and 7 and the resolution became significantly worse. On the other hand at 10 or 15 kV the analysis time was significantly prolonged (migration times 16–22 min) but the resolution was not substantially improved (especially for cinnamic acid–hyperoside, and hyperoside–chlorogenic acid pairs).

The influence of MeOH was also investigated. With increasing content of MeOH in the BGE the migration times of all analytes increased monotonously but no sufficient improvement in resolution was achieved. The migration order of hyperoside and cinnamic acid was reversed in the presence of 10% of MeOH and with additional increase of MeOH content partial comigration with chlorogenic acid appeared. No positive effect of MeOH on the separation of *p*-coumaric acid from apigenin was observed.

In view of these facts we identified the following “optimal” conditions: 20 mM tetraborate of pH 9.0 (adjusted by boric acid), 20 kV, no MeOH addition. It must be noted that optimal is written in parentheses because not all analytes were baseline-

separated and the *p*-coumaric acid + apigenin pair was not separated at all but it was the best result we were able to reach.

Electropherograms showing separation of the model mixture of the phenolic compounds under optimum conditions are depicted in Figs. 2A and 2B for the tungstate- and borate-based BGE, respectively.

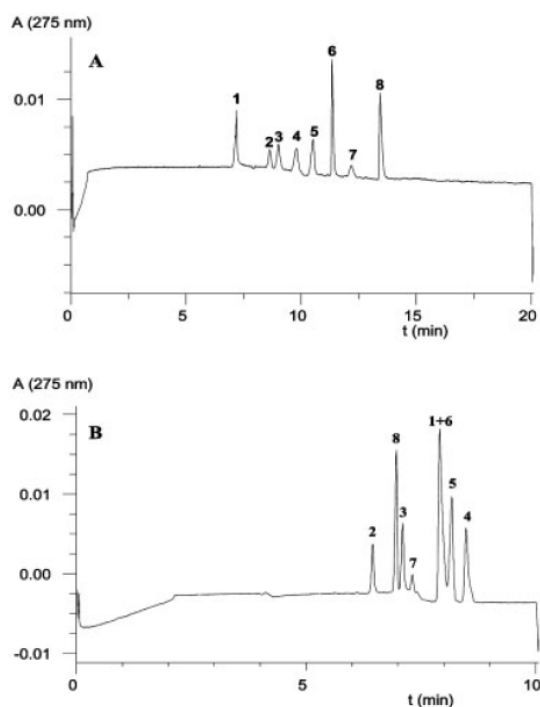


Figure 2. Electropherograms of a model mixture of polyphenols with tungstate-based BGE (A) and with borate-based BGE (B) 75 $\mu\text{g/mL}$ of each analyte; 50 $\mu\text{g/mL}$ of IS; measured under the optimal conditions. Peak identification: apigenin (1), rutin (2), hyperoside (3), quercetin (4), luteolin (5), *p*-coumaric acid (6), chlorogenic acid (7), IS cinnamic acid (8).

3.2 Comparison of separation characteristics for the tungstate- and borate-based BGEs

To compare separation characteristics of the novel tungstate-based method with those of conventionally used borate-based method the R_s values of neighboring analytes (see Table 2), electrophoretic mobilities, and number of theoretical plates were calculated (*cf.* Table 3).

In the case of the tungstate method the baseline separation of most of the analytes was achieved though for rutin–hyperoside and luteolin–quercetin pairs the R_s values were not ideal (<1.5) but still acceptable. The migration order of the analytes was the same as in the molybdate-based method devised earlier [17]. On the other hand in the borate-based system the separation was notably poorer. Apigenin and

Table 2. Resolution of adjacent peaks – comparison between tungstate- and borate-based BGEs

| Tungstate BGE | R_s |
|--|-------|
| Rutin–apigenin | 3.9 |
| Hyperoside–rutin | 1.0 |
| Quercetin–hyperoside | 1.6 |
| Luteolin–quercetin | 1.3 |
| <i>p</i> -Coumaric–luteolin | 2.1 |
| Chlorogenic acid– <i>p</i> -coumaric acid | 2.1 |
| Cinnamic acid–chlorogenic acid | 2.8 |
| Borate BGE | R_s |
| Rutin–cinnamic acid | 3.3 |
| Cinnamic acid–hyperoside | 0.9 |
| Hyperoside–chlorogenic acid | 1.6 |
| Chlorogenic acid–(<i>p</i> -coumaric acid + apigenin) | 2.8 |
| (<i>p</i> -Coumaric acid + apigenin)–luteolin | 1.1 |
| Luteolin–quercetin | 1.5 |

p-Coumaric acid and apigenin totally comigrate in the borate-based BGE.

p-coumaric acid could not be resolved at all. Furthermore cinnamic acid was not well separated from hyperoside (R_s 0.9) and the mixed zone of comigrating apigenin and *p*-coumaric acid was not perfectly resolved from luteolin (R_s 1.1). The R_s of the rest of peaks varied from 1.5 to 3.36 (refer to Table 2).

The efficiency expressed in Table 3 in terms of the number of theoretical plates *per meter* (N/m) is surprisingly low for either method compared to values typically achieved in CE (hundreds of thousands). The borate-based method is characterized by more favorable N/m values compared to the tungstate-containing system.

In accordance with higher pH of the borate-based BGE a much stronger EOF ($u\text{EOF} = 6.60 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) occurred in the borate system whereas for the tungstate system the $u\text{EOF}$ was $3.23 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. The electrophoretic mobilities (see Table 3) ranged from $-2.30 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ (for rutin) to $-3.36 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ (for quercetin) in the borate system while lower values were determined in the tungstate system (from $-6.28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ for apigenin to $-1.79 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ for chlorogenic acid). Therefore, the overall time of analysis was shorter in the borate-based BGE.

3.3 Quantitative analysis

The linear regression equations, analytical figures of merit, electrophoretic mobilities, and number of theoretical plates are summarized in Table 3 for both methods. The methods are comparable in terms of linearity but the borate-based method exhibits lower LOD values especially for rutin, hyperoside, quercetin, and chlorogenic acid.

The results of the evaluation of repeatability are shown in Table 4. The tungstate-based method exhibits lower RSDs of

Table 3. Comparison of calibration characteristics, LOD, LOQ, electrophoretic mobilities, and efficiency between tungstate- and borate-based BGEs

| Analyte | Equation ^{a)} | r^2 | LOD/LOQ ($\mu\text{g/mL}$) | Mobility ($\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) | N/m |
|-------------------------|------------------------|--------|---------------------------------|---|---------|
| Tungstate | | | | | |
| Apigenin | $y = 0.0123x + 0.0302$ | 0.9986 | 4.5/15 | -6.28×10^{-5} | 6214 |
| Rutin | $y = 0.0048x - 0.0038$ | 0.9997 | 6/20 | -1.02×10^{-4} | 21 087 |
| Hyperoside | $y = 0.0066x + 0.0374$ | 0.9975 | 6/20 | -1.11×10^{-4} | 12 881 |
| Quercetin | $y = 0.0078x - 0.0113$ | 0.9975 | 6/20 | -1.26×10^{-4} | 8386 |
| Luteolin | $y = 0.0086x + 0.125$ | 0.9933 | 3.6/12 | -1.39×10^{-4} | 11 501 |
| <i>p</i> -Coumaric acid | $y = 0.0172x - 0.0606$ | 0.9996 | 1.8/6 | -1.54×10^{-4} | 38 163 |
| Chlorogenic acid | $y = 0.0033x + 0.0019$ | 0.9971 | 18/60 | -1.63×10^{-4} | 26 563 |
| Borate | | | | | |
| Apigenin | – | – | – | – | – |
| Rutin | $y = 0.0063x - 0.0226$ | 0.9988 | 1.9/6.3 | -2.30×10^{-4} | 51 786 |
| Hyperoside | $y = 0.0074x + 0.0317$ | 0.9979 | 1.0/3.2 | -2.71×10^{-4} | 76 431 |
| Quercetin | $y = 0.012x - 0.0661$ | 0.9991 | 1.0/3.2 | -3.36×10^{-4} | 34 342 |
| Luteolin | $y = 0.013x + 0.019$ | 0.9987 | 1.0/3.2 | -3.23×10^{-4} | 32 143 |
| <i>p</i> -Coumaric acid | – | – | – | – | – |
| Chlorogenic acid | $y = 0.0021x - 0.0066$ | 0.995 | 4.7/15.8 | -2.84×10^{-4} | 104 267 |

a) y is peak area ratio of analyte and IS (A_x/A_{IS}); x stands for the concentration of analyte ($\mu\text{g/mL}$); r is the correlation coefficient; number of calibration points $n = 5$.

Table 4. Migration times and run-to-run and day-to-day repeatability of migration times and peak area ratios (analyte/IS)

| Analyte | Mean migration time (min) ($n = 12$) | Run-to-run ($n = 6$) RSD % of migration time/area | Day-to-day ($n = 12$) RSD % of migration time/area |
|----------------------------|---|--|--|
| Tungstate-based BGE | | | |
| Apigenin | 7.2 | 1.2/4.5 | 5.0/5.3 |
| Rutin | 8.6 | 1.2/4.2 | 2.3/13.9 |
| Hyperoside | 9.0 | 1.3/4.7 | 3.0/11.7 |
| Quercetin | 9.7 | 1.4/5.6 | 3.0/7.7 |
| Luteolin | 10.5 | 1.3/2.6 | 3.2/7.7 |
| <i>p</i> -Coumaric acid | 11.4 | 1.2/3.6 | 2.7/3.5 |
| Chlorogenic acid | 12.1 | 1.3/4.6 | 1.8/5.0 |
| Borate-based BGE | | | |
| Apigenin | 7.8 | 3.6/- | 3.4/- |
| Rutin | 6.3 | 3.0/5.9 | 2.6/3.9 |
| Hyperoside | 7.0 | 3.0/6.7 | 2.7/4.4 |
| Quercetin | 8.4 | 4.5/10.9 | 3.6/11.2 |
| Luteolin | 8.1 | 4.7/4.7 | 3.7/6.3 |
| <i>p</i> -Coumaric acid | 7.8 | 3.6/- | 3.4/- |
| Chlorogenic acid | 7.2 | 3.5/4.9 | 2.9/9.7 |

migration times in run-to-run experiments; on the other hand the RSDs of the peak areas are similar for both methods. Generally both methods show somewhat poorer repeatability than other CE and HPLC assays of similar compounds [6].

3.4 Analysis of plant extract (*H. perforatum* leaves)

The tungstate-based electrolyte was applied to the CE assay of rutin and hyperoside content in *H. perforatum* leaves. It

was found that the sample contains 0.92% of rutin (RSD = 5.1%; $n = 3$) and 0.92% of hyperoside (RSD = 3.3%; $n = 3$) in the dried plant material. The recoveries were 95.8% (RSD = 3.5%; $n = 6$) and 94.8% (RSD = 2.7%; $n = 6$) for hyperoside and rutin, respectively. The electropherogram of real extract sample is depicted in Fig. 3. Besides rutin and hyperoside, quercetin and chlorogenic acid were identified (but not quantified, because of their low signal) in *H. perforatum* leaves. These results demonstrate that the tungstate-

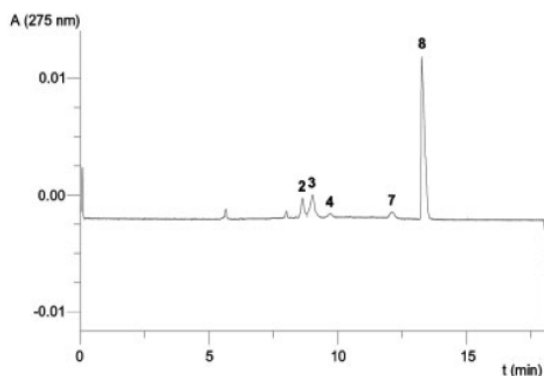


Figure 3. Electropherogram of methanolic extract of *H. perforatum* leaves. For peak identification see Fig. 2. The concentration of cinnamic acid (IS) is 50 $\mu\text{g/mL}$.

based CE method is suitable for the analysis of medicinal plant extracts but further improvement of the sensitivity of the method by developing, *e.g.*, suitable stacking procedure would be desirable to make the novel method more applicable in phytochemical analysis.

4 Concluding remarks

A new kind of BGE utilizing millimolar concentrations of sodium tungstate as complex-forming reagent was firstly investigated in this study. Addition of tungstate to BGEs affected significantly electrophoretic migration of compounds with vicinal $-\text{OH}$ groups as a result of the formation of negatively charged complexes involving W(VI) as central ion. The mobility of monohydroxy compounds was not influenced. The migration behavior of selected flavonoids was analogical to that observed in a molybdate-based system introduced earlier [17] but the calibration parameters, LODs and repeatability were generally worse in the tungstate-based BGE. The traditionally applied borate-based BGE was optimized in parallel to the novel tungstate BGE to compare their separation characteristics and analytical figures of merit in the analysis of polyphenols.

Whereas the separation selectivity was higher in the case of the tungstate-based method, the borate-based BGE surpassed the novel system in sensitivity. On the other hand, the tungstate-based system enabled separation of polyphenols at lower (nearly neutral) pH^* values and therefore the risk of spontaneous oxidation of polyphenols by the air oxygen is reduced in comparison with the alkaline medium of borate BGE [13–16]. Our findings suggest that the novel tungstate-based BGE represents an alternative to the routinely applied borate system when analyzing multicomponent mixtures of polyphenols by CE. The development of a stacking technique for increasing the

sensitivity of the novel tungstate method and making it more suitable for the analysis of real samples of plant extracts is in progress.

This work was supported by the Czech Ministry of Education Research Project MSM 0021620822 and by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (Project NR8964-3/2006).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Kubáň, P., Kubáň, P., Kubáň, V., *J. Chromatogr. A* 1999, **836**, 75–80.
- [2] Chiari, M., *J. Chromatogr. A* 1998, **805**, 1–15.
- [3] Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1991, **63**, 1541–1547.
- [4] Schmitt-Kopplin, Ph., Fischer, K., Freitag, D., Kettrup, A., *J. Chromatogr. A* 1998, **807**, 89–100.
- [5] Hinneburg, I., Mrestani, Y., Neubert, R. H. H., *Chromatographia* 2004, **59**, 591–594.
- [6] Wang, S.-P., Huang, K.-J., *J. Chromatogr. A* 2004, **1032**, 273–279.
- [7] Arce, L., Tena, M. T., Rios, Á., Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta* 1998, **359**, 27–38.
- [8] Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G., Lercker, G., *J. Chromatogr. A* 2003, **1011**, 163–172.
- [9] Bonoli, M., Pelillo, M., Toshi, T. G., Lercker, G., *Food Chem.* 2003, **81**, 631–638.
- [10] Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., Yanai, H., *Electrophoresis* 2004, **25**, 2892–2898.
- [11] Suntornsuk, L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, **27**, 679–698.
- [12] Jáč, P., Polášek, M., Pospíšilová, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, **40**, 805–814.
- [13] Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z. Y., *J. Agric. Food. Chem.* 1997, **45**, 4624–4628.
- [14] Liu, Y., Chen, H.-B., Zhao, Y.-Y., Wang, B., Zhang, Q.-Y., Zhang, L., Tu, P., *J. Agric. Food. Chem.* 2006, **54**, 6634–6639.
- [15] Zimeri, J., Tong, C. H., *J. Food Sci.* 1999, **64**, 753–758.
- [16] Zenkevich, I. G., Eshchenko, A. Y., Makarova, S. V., Vitenberg, A. G. *et al.*, *Molecules* 2007, **12**, 654–672.
- [17] Polášek, M., Petříška, I., Pospíšilová, M., Jahodář, L., *Talanta* 2006, **69**, 192–198.
- [18] Sillén, G. L., Martell, A. E., Stability Constants of Metal-Ion Complexes Special Publication No. 17, *The Chemical Society*, London 1964, p. 472.
- [19] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., *Carbohydr. Res.* 2000, **329**, 387–397.
- [20] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., *Carbohydr. Res.* 1997, **304**, 97–109.
- [21] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., *Carbohydr. Res.* 1997, **299**, 209–220.

Electrophoresis 2008, 29, 843–851

CE and CEC 851

- [22] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., *Carbohydr. Res.* 1997, 297, 191–200.
- [23] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., *Carbohydr. Res.* 1996, 286, 1–15.
- [24] Ramos, M. L., Caldeira, M. M., Gil, V. M. S., Vanbekkum, H., Peters, J. A., *J. Coord. Chem.* 1994, 33, 319–329.
- [25] Cruywagen, J. J., Kruger, L., Rohwer, E. A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1991, 7, 1727–1731.
- [26] Cruywagen, J. J., Kruger, L., Rohwer, E. A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1993, 1, 105–109.
- [27] Cruywagen, J. J., Rohwer, E. A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1995, 21, 3433–3438.
- [28] Amin, A. S., Moustafa, M. E., Dessouki, H. A., Abd-Allah, A., *Quim. Anal.* 2001, 20, 93–98.
- [29] Himeno, S., Kitazumi, I., Takamoto, M., Nakashima, Y., *Talanta* 2003, 61, 591–596.
- [30] Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielenski, R. *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 869–881.
- [31] Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M. G., *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 4846–4851.
- [32] Serjeant, E. P., Dempsey, B., *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution IUPAC Chemical Data Series No. 23*, Pergamon Press, Oxford 1979.

- 5.1.3 Příloha 3: Sungthong, B., Jáč, P., Scriba, G. K. E.: Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the *R*-enantiomer, J. Pharm. Biomed. Anal. 46, 2008, 959-965.**



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 959–965

 JOURNAL OF
 PHARMACEUTICAL
 AND BIOMEDICAL
 ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Short communication

Development and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of impurities of escitalopram including the *R*-enantiomer

Bunleu Sungthong^a, Pavel Jáč^{a,b}, Gerhard K.E. Scriba^{a,*}^a Department of Medicinal/Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05, Hradec Králové, Czech Republic

Received 26 January 2007; received in revised form 23 April 2007; accepted 19 May 2007

Available online 29 May 2007

Abstract

A stereospecific capillary electrophoresis assay for the simultaneous determination of related substances and the enantiomeric purity of escitalopram was developed by a central composite face-centered factorial design and subsequently validated. Separations were carried out in a 50 μm , 47/40 cm fused-silica capillary. The optimized conditions included 20 mM phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.5 mg/ml β -cyclodextrin and 22 mg/ml sulfated β -cyclodextrin as background electrolyte, an applied voltage of -20 kV and a temperature of 28°C . Salicylic acid was used as internal standard. The assay was validated for the (*R*)-enantiomer of citalopram and the enantiomers of the impurity citadiol in the range of 2.5–150 $\mu\text{g/ml}$ and 2.5–50 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The limit of detection was 0.02% for all compounds, the limit of quantitation 0.05%, relative to a concentration of escitalopram of 5 mg/ml. Intraday precision of migration time and peak area ratio were in the range of 0.17–0.44% and 1.64% and 6.25%, respectively. Relative standard deviations of interday precision ranged between 0.84% and 1.85% in the case of migration times and between 5.20% and 9.28% for peak area ratio. The assay was applied to the determination of the purity of escitalopram in bulk drug and tablets. (*R*)-Citalopram and (*S*)-citadiol were detected as impurities.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Escitalopram; Citadiol; Related compounds; Chiral separation; Cyclodextrin

1. Introduction

Citalopram (1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile) is a selective serotonin reuptake inhibitor used as an antidepressant drug [1]. The compound is also applied to treat panic, anxiety and obsessive compulsive disorders of pathological laughing and crying [2]. The pharmacological activity is associated with the (*S*)-(+)-enantiomer (escitalopram, Fig. 1) while the (*R*)-(–)-enantiomer ((*R*)-citalopram, Fig. 1) is essentially inactive [3] and even counteracts the activity of escitalopram [4,5]. The key intermediate in the synthesis of citalopram is citadiol (Fig. 1) which is cyclized to yield the dihydroisobenzofuran moiety. Escitalopram is produced from (*S*)-citadiol which is obtained either by preparative chromatographic

enantioresolution of racemic citadiol [6] or more frequently by fractionated crystallization of citadiol using, for example, (+)-di-*p*-toluoyl-D-tartaric acid [7,8]. Thus, the chiral purity of escitalopram depends on the purity of starting material (*S*)-citadiol.

The analytical enantioresolution of citalopram has been reported by enantioselective high-performance liquid chromatography (HPLC) for studying the stereoselective pharmacokinetics and metabolism of citalopram [9–12]. HPLC has also been applied to determine the enantiomeric purity of escitalopram in bulk drug and tablets [13]. The separation of the enantiomers of citadiol by HPLC using a Chiralpack AD-H column has been reported recently [14]. Capillary electrophoresis (CE) has been used to study the enantiomeric composition of citalopram and its metabolites in plasma [15] and urine [16] using sulfated β -CD and carboxymethyl- γ -CD, respectively, as chiral selectors. Sulfated β -CD was used for the simultaneous enantioresolution of citalopram and its *N*-demethyl analogs [17] while carboxymethyl- γ -CD was applied to the determination

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949830; fax: +49 3641 949802.
 E-mail address: gerhard.scriba@uni-jena.de (G.K.E. Scriba).

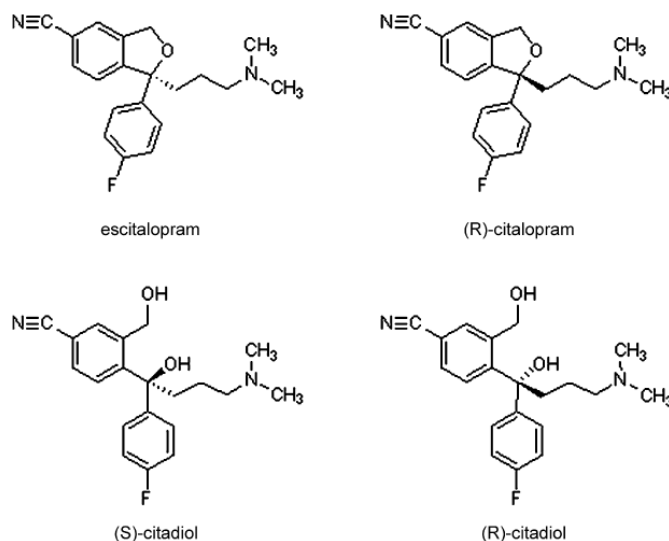


Fig. 1. Structures of escitalopram, (R)-citalopram and citadiol enantiomers.

of citalopram and escitalopram in tablets [18]. Moreover, separation of the enantiomers of citalopram upon addition of dextrin to the background electrolyte has been reported [19].

No study has been published describing the simultaneous determination of related substances as well as the analysis of the chiral purity of escitalopram. Generally, CE has been recognized as a versatile analytical technique also allowing the simultaneous analysis of chiral compounds with closely related structures [20–22]. Thus, the aim of the present study was the development and validation of a chiral CE assay for escitalopram allowing the simultaneous determination of the (R)-enantiomer as well as the synthetic intermediate citadiol.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical grade. Sulfated β -CD sodium salt was obtained from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany), β -CD was from Wacker-Chemie GmbH (Burghausen, Germany), sodium hydroxide solution was from Fisher Scientific (Schwerte, Germany) and phosphoric acid was from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Salicylic acid was purchased from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) and methanol from VWR International (Bruchsal, Germany). Escitalopram oxalate, citalopram hydrobromide, racemic citadiol were produced by Hygro Chemical Pharmtek Pvt. Ltd. (Hyderabad, India) and donated by Dr. Ramiseti Nageswara Rao (Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad, India). Escitalopram and citalopram tablets were also gifts by Dr. Nageswara Rao.

2.2. Instrumentation

All analyses were carried out on Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Germany) equipped with a diode array detector using 50 μ m i.d., 360 μ m o.d. fused-silica capillaries (BGB Analytik, Schloßböckelheim, Germany). The total length of the capillary was 47 cm with an effective length of 40 cm. Detection was carried out at 205 nm. The optimized background electrolyte consisted of 20 mM phosphate buffer, pH 2.5, containing 0.5 mg/ml β -CD and 22 mg/ml sulfated β -CD. The applied voltage was -20 kV, the capillary was operated at a temperature of 28 °C. A new capillary was treated with 1 M sodium hydroxide for 10 min, 0.1 M sodium hydroxide for 20 min, 0.1 M phosphoric acid and water for 10 min each. At the beginning of the day, the capillary was rinsed with water, 0.1 M sodium hydroxide and 0.1 M phosphoric acid for 5 min each followed by flushing with water for 10 min. Prior to the injections, the capillary was washed subsequently with 0.1 M sodium hydroxide and water for 2 min each followed by a rinse with the background electrolyte for 5 min. At the end of the day, the capillary was flushed with water for 2 min, 0.1 M sodium hydroxide for 10 min, water for 1 min, 0.1 M phosphoric acid for 5 min and water for 10 min. Prior to storage, the capillary was purged with nitrogen for 5 min. Samples were introduced by hydrodynamic injection at 0.5 psi for 6 s. Normalized peak areas were used for quantitative determinations.

2.3. Standard and sample preparation

Stock solutions of escitalopram oxalate, citalopram hydrobromide and citadiol were prepared in water and diluted to the appropriate concentrations. Salicylic acid was diluted in

water and added to the samples to give a final concentration of 21.7 $\mu\text{g/ml}$.

Four different commercial brands, three containing escitalopram oxalate and one containing citalopram hydrobromide, were investigated. Five tablets were weighed and ground to a fine powder. An equivalent of the powder corresponding to 10 mg of the drug was extracted with 10 ml methanol by sonication for 15 min. The solutions were filtered and the filtrates were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 40 °C. The residue was reconstituted in 1 ml water and filtered through a 0.2 μm PET membrane filter. Two hundred and fifty microliters of the filtrate were added to 250 μl water containing 43.4 $\mu\text{g/ml}$ salicylic acid and vortexed.

2.4. Chemometrics

Chemometrics for method optimization was carried out by central composite face-centered factorial design using MODDE 7.0 (Umetrics, Umea, Sweden). Four variables were applied, i.e. concentration of sulfated β -CD, buffer concentration, separation temperature, and applied voltage. The experiments were run in a randomized order. The data were fitted by partial least square (PLS) regression.

For each model, interaction and quadratic terms were included. The fraction of variation of the response that can be explained by the model ($R^2 = (\text{total sum of squares} - \text{sum of squares for residuals}) / \text{total sum of squares}$) and the fraction of variation of the response that can be predicted by the model ($Q^2 = 1 - (\text{prediction residual sum of squares} / \text{total sum of squares})$) were subsequently examined. For a good model, R^2 and Q^2 are as close to 1 as possible. The model estimated the coefficients (b_n), which represent half the effect of a factor. The confidence interval of each coefficient (95% of confidence) was studied to see if the factors had any effect on the responses. Some of the coefficients (interaction or quadratic terms) that did not have a significant effect were subsequently removed from the current model, and a new model was calculated. If R^2 and Q^2 decreased following the removal of an insignificant coefficient, the coefficient was added to the model again. To identify outliers, a normal probability plot of the residuals was examined. The observed response versus predicted plot was examined to evaluate the predictability of each model and the observed response versus run order plot was examined to ensure the absence of systematic errors. A logarithmic transformation of the responses improved the model.

2.5. Method validation

The assay was validated for concentrations that referred to a range of 0.05–3.0% for (*R*)-citalopram (5–300 $\mu\text{g/ml}$ racemic citalopram) and 0.05–1.0% for the citadiol enantiomers (5–100 $\mu\text{g/ml}$ racemic citadiol) based on a final concentration of escitalopram of 5.0 mg/ml. Method validation was conducted according to ICH guideline Q2(R1) [23] with regard to range, linearity, limit of detection and quantitation, and precision. Precision was determined at a low concentration (0.1% for each compound) and a high concentration (0.6% for cita-

diol and 2% for (*R*)-citalopram). Linearity was estimated by unweighted linear regression using the least square method. Detection and quantitation limits were based on signal to noise ratio, 3:1 and 10:1, respectively. Intraday precision was calculated from six replicate injections in the same day while interday precision was based on six injections on three consecutive days.

3. Results and discussion

3.1. Selection of cyclodextrins and initial conditions

Based on the published enantioseparations of citalopram which were performed in the pH range 2.5–7 [15–18] where citalopram is positively charged, several neutral CD derivatives such as α -CD, β -CD, γ -CD, 2-hydroxypropyl- β -CD and 2,6-dimethyl- β -CD as well as the negatively charged sulfated β -CD were screened for the chiral resolution ability for the enantiomers of citalopram and citadiol in the pH range 2.3–6.2. Baseline separation of the analyte enantiomers was observed using 5 mg/ml sulfated β -CD in 20 mM phosphate buffer, pH 2.5, but especially the peaks of the citalopram enantiomers revealed strong tailing. This has also been observed previously [17]. The peak shape could not be improved substantially by a variation of the CD concentration. Mandrioli et al. exploited the carrier ability of sulfated β -CD under reversed polarity conditions to separate the enantiomers of citalopram and its *N*-demethylated metabolites [17]. Thus, a background electrolyte consisting of 15 mg/ml sulfated β -CD in 35 mM phosphate buffer, pH 2.5, and reversing the polarity of the applied voltage was studied. Generally, good separation of the enantiomers was observed ($R_S \geq 2$) but the peaks showed considerable fronting. Peak shape improved significantly when 0.5–1 mg/ml β -CD was added to the sulfated β -CD containing background electrolyte as also observed by Mandrioli et al. [17]. It has been shown in many examples that dual CD systems based on combinations of charged and neutral CDs can result in efficient chiral CE separations [24–26]. Essentially the same effect on the peak shape was observed when α -CD or γ -CD was added instead of β -CD. Employing short end injection using a citrate buffer, pH 5.5, as described as a fast method for the chiral separation of citalopram by Mandrioli et al. [17] did not result in satisfactory separations as citalopram and citadiol migrated too close to achieve a simultaneous enantioseparation of both compounds. As citalopram is typically marketed as the oxalate or hydrobromide salts the migration times of oxalic acid and bromide were also recorded. Using 35 mM sodium phosphate buffer, pH 2.5, containing 15 mg/ml sulfated β -CD and 0.5 mg/ml β -CD as background electrolyte the anionic compounds migrated in front of the citalopram and citadiol resulting in the migration order bromide > oxalate > (*R*)-citalopram > escitalopram > (*S*)-citadiol > (*R*)-citadiol. Oxalate and bromide peaks were identified by injection of solutions of oxalic acid and potassium bromide. The migration order of the citadiol enantiomers was tentatively assigned due to the fact that a small impurity with the migration time of the (*S*)-citadiol was found in escitalopram substance as well as tablets.

Table 1
Central composite face-centered factorial design and results

| Experiment no. | Run order | Concentration S- β -CD (mg/ml) | Temperature ($^{\circ}$ C) | Voltage (kV) | Concentration buffer (mM) | R_S , ox/(R)-cit | R_S , (S)-cit/(R)-cit | MT last (min) | Current (μ A) |
|----------------|-----------|--------------------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------|
| 1 | 15 | 10 | 20 | 15 | 20 | 2.73 | 5.82 | 15.5 | 27.5 |
| 2 | 2 | 30 | 20 | 15 | 20 | 3.98 | 6.89 | 13.8 | 52.5 |
| 3 | 9 | 10 | 30 | 15 | 20 | 2.39 | 5.35 | 14.9 | 33 |
| 4 | 22 | 30 | 30 | 15 | 20 | 3.61 | 5.88 | 10.9 | 66 |
| 5 | 13 | 10 | 20 | 25 | 20 | 4.13 | 5.06 | 9.8 | 48.5 |
| 6 | 11 | 30 | 20 | 25 | 20 | 4.06 | 8.49 | 7.0 | 102.5 |
| 7 | 23 | 10 | 30 | 25 | 20 | 2.26 | 4.62 | 9.7 | 60 |
| 8 | 10 | 30 | 30 | 25 | 20 | 3.79 | 6.48 | 6.6 | 130 |
| 9 | 1 | 10 | 20 | 15 | 50 | 0.93 | 11.45 | 28.6 | 39 |
| 10 | 21 | 30 | 20 | 15 | 50 | 5.36 | 4.56 | 14.6 | 79 |
| 11 | 25 | 10 | 30 | 15 | 50 | 0.74 | 7.00 | 22.0 | 48 |
| 12 | 27 | 30 | 30 | 15 | 50 | 5.00 | 4.07 | 12.0 | 98 |
| 13 | 5 | 10 | 20 | 25 | 50 | 0.96 | 8.52 | 14.6 | 72 |
| 14 | 18 | 30 | 20 | 25 | 50 | 5.74 | 4.33 | 7.9 | 164 |
| 15 | 16 | 10 | 30 | 25 | 50 | 0.39 | 6.56 | 17.2 | 88 |
| 16 | 8 | 30 | 30 | 25 | 50 | 4.00 | 5.43 | 7.5 | 195 |
| 17 | 14 | 10 | 25 | 20 | 35 | 1.71 | 6.38 | 17.3 | 49.5 |
| 18 | 19 | 30 | 25 | 20 | 35 | 3.07 | 6.95 | 9.7 | 92 |
| 19 | 3 | 20 | 20 | 20 | 35 | 7.64 | 8.70 | 11.8 | 71.5 |
| 20 | 6 | 20 | 30 | 20 | 35 | 3.09 | 7.26 | 10.4 | 88.4 |
| 21 | 4 | 20 | 25 | 15 | 35 | 3.06 | 7.60 | 14.8 | 56.5 |
| 22 | 26 | 20 | 25 | 25 | 35 | 2.69 | 6.30 | 7.9 | 110.5 |
| 23 | 12 | 20 | 25 | 20 | 20 | 3.99 | 5.43 | 9.2 | 63.5 |
| 24 | 7 | 20 | 25 | 20 | 50 | 2.78 | 7.37 | 12.4 | 90 |
| 25 | 24 | 20 | 25 | 20 | 35 | 3.01 | 6.87 | 9.9 | 81 |
| 26 | 17 | 20 | 25 | 20 | 35 | 3.14 | 6.91 | 10.5 | 80 |
| 27 | 20 | 20 | 25 | 20 | 35 | 3.16 | 6.87 | 10.5 | 82 |

3.2. Method optimization

A central composite face-centered factorial design was used for method optimization. Four factors, concentration of sulfated β -CD (10–30 mg/ml), buffer concentration (20–50 mM), applied voltage (15–25 kV) and temperature (20–30 $^{\circ}$ C), were studied. The concentration of β -CD was kept constant at 0.5 mg/ml as preliminary experiments revealed not significant effect in the range of 0.5–2 mg/ml. Moreover, pH was set at 2.5 and variations were not investigated either as citalopram and citadiol are both basic compounds which are essentially protonated up to pH 7–8. The resolution between the citalopram enantiomers as well as the resolution between oxalate and (R)-citalopram, the migration time of the last migrating compound (R)-citadiol, and the generated current were initially selected as responses. The current was included because it increased with increasing concentrations of sulfated β -CD. High currents will lead to loss in resolution and instable run conditions due to extensive Joule heating. All experiments were performed in random order to avoid a systematic error. Three experiments (nos. 25–27) were carried out in the center of the design matrix in order to obtain the information about day-to-day variability. The individual experiments and the respective results of the runs are summarized in Table 1. The resolution between the enantiomers of citalopram always exceeded 4.0 and was therefore excluded from further considerations. The resolution between oxalate and (R)-citalopram exceeded 2 except for experiments with low concentrations of sulfated β -CD. Thus, essentially only

the CD concentration is affecting this value as was also deduced from analysis of the respective coefficients (data not shown). The scaled and centered coefficients of migration time and current are shown in Fig. 2. CD concentration and applied voltage had positive effects on the current while a negative effect on migration time was observed. Upon increase of the buffer concentration migration time as well as current increased.

The method was further optimized utilizing the “optimizer” mode of the software (based on the Nelder–Mead simplex method [27]). As resolution between the citalopram enantiomers and between oxalate and (R)-citalopram was not really an issue as outlined above, only the migration time of the last migrating citadiol enantiomer (maximum 10 min) and the current (maximum 80 μ A) were minimized. Optimized conditions were a 20 mM sodium phosphate buffer, pH 2.5 containing 22 mg/ml sulfated β -CD and 0.5 mg/ml β -CD, at a capillary temperature of 28 $^{\circ}$ C and an applied voltage of –20 kV. The predicted values for migration time and current of the optimized method were 8.7 min and –73 μ A. The observed experimental values of 8.4 min and –68 μ A are in reasonable agreement. A typical electropherogram of escitalopram oxalate containing (R)-citalopram and citadiol as impurities analyzed under optimized conditions is shown in Fig. 3.

3.3. Method validation

Salicylic acid was used as internal standard in order to compensate for fluctuations of the migration time and injection

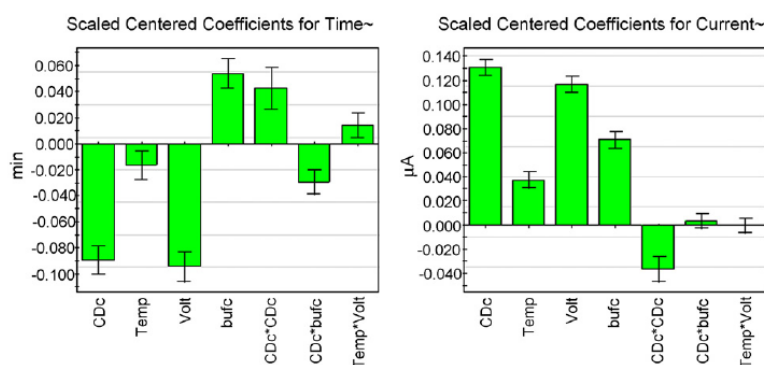


Fig. 2. Scaled and centered coefficients of the logarithms of the migration time of (*R*)-citadiol (left) and electrophoretic current (right). The respective 95% confidence intervals are shown as error bars. Coefficients with 95% confidence intervals including zero are insignificant. CDC: concentration of sulfated β -CD; Temp: temperature; Volt: applied voltage; bufc: phosphate buffer concentration.

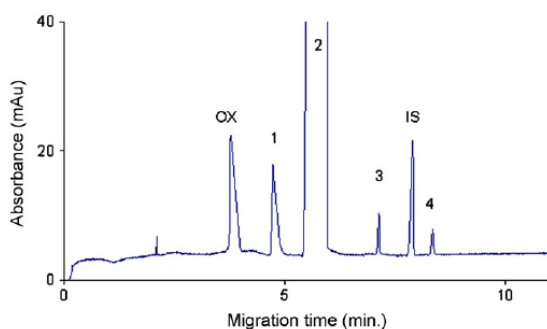


Fig. 3. Electropherogram of 5 mg/ml escitalopram oxalate containing approximately 2.4% of (*R*)-citalopram and 0.1% of the citadiol enantiomers. Experimental conditions: 47/40 cm fused-silica capillary, 50 μ m i.d., 20 mM sodium phosphate buffer, pH 2.5, containing 22 mg/ml sulfated β -CD and 0.5 mg/ml β -CD, -20 kV, 205 nm. Peak identification: (1) (*R*)-citalopram; (2) escitalopram; (3) (*S*)-citadiol; (4) (*R*)-citadiol; (IS) internal standard (salicylic acid); (OX) oxalic acid.

errors. The compound was selected from a series of basic and acidic compounds based on the migration between the citadiol enantiomers. Most basic compounds and several acidic compounds which were tested as internal standards migrated either too close or even comigrated with bromide or oxalate.

The final method was subsequently validated according to the ICH guideline Q2(R1) [23] with respect to specificity, linearity

range, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), and precision. With respect to specificity, all compounds were well separated (Fig. 3). When developing assays for the determination of related substances as well as stereoisomeric impurities it is always desirable to validate the impurities in the presence of a large excess of the parent compound. However, this could not be carried out in the present study as the escitalopram substance that was available contained approximately 2.4% (*R*)-citalopram based on peak area normalization. Thus, method validation was performed using racemic citalopram and citadiol in the range of 2.5–150 μ g/ml and 2.5–50 μ g/ml, respectively, corresponding to a relative range of 0.05–3.0% in the case of (*R*)-citalopram and 0.05–1.0% for the citadiol enantiomers based on a target concentration of escitalopram in the samples of 5 mg/ml (the concentrations refer to the respective enantiomers). At 5 mg/ml the peak shape of escitalopram was still acceptable. The concentration of the internal standard in the samples was 21.7 μ g/ml corresponding to a relative concentration of 0.43%. The calibration data are summarized in Table 2. Correlation coefficients of at least 0.9964 were determined. The 95% confidence intervals of the *y*-intercept for all compounds included zero. Thus, a systematic error can be excluded.

The LOD of (*R*)-citalopram and the citadiol enantiomers defined as a signal-to-noise ratio of 3:1 were about 1 μ g/ml corresponding to a relative concentration of 0.02% of the compounds based on a concentration of escitalopram of 5 mg/ml. The LOQ defined as the signal-to-noise ratio of 10:1 was 2.5 μ g/ml

Table 2
Calibration data: range, linearity, LOD and LOQ

| Parameter | (<i>R</i>)-Citalopram | (<i>S</i>)-Citadiol | (<i>R</i>)-Citadiol |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Range (μ g/ml) | 2.5–150 | 2.5–50 | 2.5–50 |
| Correlation coefficient | 0.9964 | 0.9992 | 0.9989 |
| Slope | 1.15 | 1.59 | 1.55 |
| Intercept | -0.0163 | -0.0156 | -0.0097 |
| 95% confidence interval of intercept | -0.0980 to 0.0653 | -0.0321 to 0.0008 | -0.0280 to 0.0086 |
| Relative residual S.D. (%) | 8.18 | 3.41 | 3.90 |
| LOD/LOQ (μ g/ml) | 1.0/2.5 | 1.0/2.5 | 1.0/2.5 |

Table 3
Assay precision

| | <i>(R)</i> -Citalopram | | <i>(S)</i> -Citadiol | | <i>(R)</i> -Citadiol | |
|------------------------------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | 0.1% level | 2% level | 0.1% level | 0.6% level | 0.1% level | 0.6% level |
| Intraday precision | | | | | | |
| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | 4.85 (6.25) | 97.0 (2.51) | 5.45 (4.63) | 32.7 (1.64) | 5.45 (4.68) | 32.7 (1.95) |
| Migration time (min) | 4.49 (0.17) | 4.54 (0.19) | 6.67 (0.40) | 6.73 (0.32) | 7.81 (0.44) | 7.87 (0.36) |
| Interday precision | | | | | | |
| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | 4.85 (8.56) | 97.0 (8.05) | 5.45 (9.28) | 32.7 (5.90) | 5.45 (7.57) | 32.7 (5.20) |
| Migration time (min) | 4.54 (1.17) | 4.53 (0.84) | 6.76 (1.61) | 6.64 (1.35) | 7.93 (1.85) | 7.88 (1.59) |

The R.S.D. is listed in parenthesis.

corresponding to 0.05%. The observed LOQ values are identical with the requirement of the reporting limit for impurities as stated by the ICH guideline Q3A "Impurities in New Drug Substances" [28] as well as international pharmacopoeias such as the United States Pharmacopeia [29] or the European Pharmacopoeia [30].

Precision was investigated at a relative concentration of approximately 0.1% and 2.0% or 0.6% in the case of the citalopram and citadiol enantiomers, respectively. The respective concentrations based on the target concentration of 5 mg/ml escitalopram were 9.7 $\mu\text{g/ml}$ and 194 $\mu\text{g/ml}$ for racemic citalopram and 10.9 $\mu\text{g/ml}$ and 65.4 $\mu\text{g/ml}$ in the case of racemic citadiol. Sample solutions were injected six times on 1 day (intraday precision) and on three consecutive days (interday precision). The migration times as well as the concentrations of the compounds are summarized in Table 3. Generally acceptable relative standard deviation (R.S.D.) values of the peak area ratios ranging between 1.64% and 6.25% for intraday precision and between 5.20% and 9.28% for interday precision were observed.

3.4. Method application

The method was applied to determine (*R*)-citalopram and the citadiol enantiomers in escitalopram bulk and tablets. In addition, one tablet containing racemic citalopram was investigated. An electropherogram of an escitalopram tablet is shown in Fig. 4. In bulk drug about $2.30 \pm 0.11\%$ (*R*)-citalopram and $0.10 \pm 0.01\%$ (*S*)-citadiol could be detected. The results of the tablets are summarized in Table 4. Two brands contained about 0.3–0.4% (*R*)-citalopram and about 0.4–0.5% (*S*)-citadiol. A third brand contained approximately 10-fold higher concentrations of (*R*)-citalopram and 2-fold higher concentrations of (*S*)-citadiol. (*R*)-citadiol could not be detected in any samples of escitalopram. The tablet of racemic citalopram contained only very low levels of both citadiol enantiomers.

In order to estimate the recovery of (*R*)-citalopram and the citadiol enantiomers from the tablets a second extraction of the residue of sample 1 was performed. (*R*)-Citalopram could not be detected while a concentration of (*S*)-citadiol corresponding to about 0.03% was determined. This concentration is below the LOQ but considering the amount of the impu-

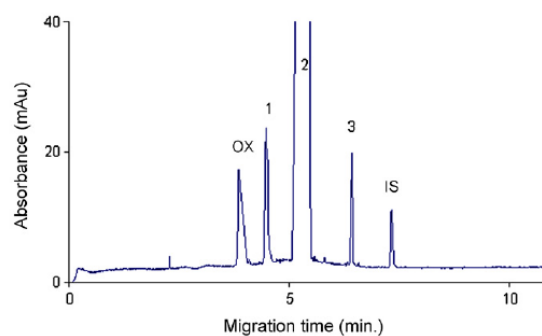


Fig. 4. Electropherogram of an escitalopram tablet (entry 3 in Table 4). For experimental conditions see Fig. 3. Peak identification: (1) (*R*)-citalopram; (2) escitalopram; (3) (*S*)-citadiol; (IS) internal standard (salicylic acid); (OX) oxalic acid.

rity found in the first extraction this value corresponds to about 7% of the compound not extracted in the first step. Moreover, the tablet residue of the second extraction was spiked at the 0.5% level. Concentrations of $0.49 \pm 0.01\%$, $0.44 \pm 0.02\%$ and $0.45 \pm 0.02\%$ were determined for (*R*)-citalopram, (*S*)-citadiol and (*R*)-citadiol, respectively. Thus, a sample recovery of at least 88% can be estimated for all compounds so that the analysis of the impurities following a single extraction can be regarded as representative.

Table 4
Impurity profile of commercial tablets

| Sample | Impurity (%) | | |
|----------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | <i>(R)</i> -Citalopram | <i>(S)</i> -Citadiol | <i>(R)</i> -Citadiol |
| 1 | 0.37 | 0.45 | ND ^a |
| 2 | 0.32 | 0.38 | ND |
| 3 | 2.01 | 0.72 | ND |
| 4 ^b | Racemate | 0.07 | 0.03 ^c |

The amount is listed relative to a concentration of escitalopram of 5 mg/ml (mean of two determinations).

^a ND: not detected.

^b Tablet containing racemic citalopram.

^c Below LOQ.

4. Conclusions

A stereoselective CE method employing a dual CD system has been developed and validated for the analysis of escitalopram with regard to its impurities (*R*)-citalopram and citadiol using chemometrics for method optimization. The assay is specific allowing the detection of the impurities at the 0.05% level relative to escitalopram at a concentration of 5 mg/ml. This is the equivalent of the reporting threshold of the ICH guideline Q3A [28]. The assay was subsequently applied to the analysis of bulk and tablets. The results demonstrated different qualities of the tablets with regard to the impurity profile clearly indicating the necessity of validated assays for purity control. Although not developed and validated for citalopram the assay can also be applied to analyze the racemic drug.

Acknowledgments

P. Jáč thanks for the financial support by MSM 0021620822. The help of Mrs. Manuela Hammitzsch-Wiedemann with chemometric method optimization and the gift of escitalopram samples and tablets by Dr. Ramiseti Nageswara Rao (Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad, India) are gratefully acknowledged.

References

- [1] P. Baumann, *Int. Clin. Psychopharm.* 11 (1996) 5–11.
- [2] U.M. Lesola, A.G. Wade, E.V. Leinonen, H.J. Koponen, J. Frazer, I. Sjodom, J.T. Penttinen, T. Pedersen, H.J. Lehto, *J. Clin. Psychiatr.* 59 (1998) 528–534.
- [3] J. Hyttel, K.P. Boefesoe, J. Perregaard, C. Sánchez, *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 88 (1992) 157–160.
- [4] C. Sánchez, K.P. Bogeso, B. Ebert, E.H. Reines, C. Braestrup, *Psychopharmacology* 174 (2004) 163–176.
- [5] A. Mørk, M. Kreilgaard, C. Sánchez, *Neuropharmacology* 45 (2003) 167–173.
- [6] M. Bech Sommer, O. Nielsen, H. Petersen, H. Ahmadian, H. Pedersen, P. Broesen, F. Geiser, J. Lee, G. Cox, O. Dapremont, C. Suteu, S.P. Assenza, S. Hariharan, U. Nair, Patent WO 2003006449 (2003).
- [7] S.L. Goankar, P.P. Das, A. Narahari Babu, S.G. Manjunatha, Patent WO 2006106531 (2006).
- [8] G. Coticelli, R. Salvetti, Patent WO 2006037714 (2006).
- [9] E.C. Kugelberg, B. Carlsson, J. Ahlner, F. Bengtsson, *Chirality* 15 (2003) 622–629.
- [10] D. Haupt, *J. Chromatogr. B* 685 (1996) 299–305.
- [11] B. Rochat, M. Amey, P. Baumann, *Ther. Drug Monit.* 17 (1995) 273–279.
- [12] B. Rochat, M. Amey, H.V. Gelderen, B. Testa, P. Baumann, *Ther. Drug Monit.* 22 (2000) 219–224.
- [13] R. Nageswara Rao, A. Narasa Raju, D. Nagaraju, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 280–285.
- [14] R. Nageswara Rao, A. Narasa Raju, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 311–314.
- [15] S. Andersen, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, L. Tanum, H. Refsum, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 263–273.
- [16] J.J. Berzas Nervado, M.J. Villaseñor Llerena, C. Guiberteau Cabanillas, V.R. Robledo, *Electrophoresis* 27 (2006) 905–917.
- [17] R. Mandrioli, S. Fanali, V. Pucci, M.A. Raggi, *Electrophoresis* 27 (2003) 2608–2616.
- [18] J.J. Berzas Nevado, C. Guiberteau Cabanillas, M.J. Villaseñor Llerena, V. Rodriguez Robledo, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 249–257.
- [19] S. Xiao, H. Xu, S. Tang, B. Feng, R. Tao, Y. Ying, Z. Xia, *Fenxi Huaxue* 33 (2005) 1527–1530.
- [20] K. Altria, A. Marsh, C. Sängler-van de Griend, *Electrophoresis* 27 (2006) 2263–2282.
- [21] G.K.E. Scriba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 373–399.
- [22] G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 24 (2003) 2409–2421.
- [23] Guideline Q2(R1), Validation of analytical procedures: methodology, International Conference on Harmonization, 2005, <http://www.ich.org>.
- [24] N. Matthijs, S. Van Hemelryck, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 247–263.
- [25] M. Fillet, B. Chankvetadze, B. Crommen, G. Blaschke, *Electrophoresis* 20 (1999) 2691–2697.
- [26] M. Hammitzsch, R. Nageswara Rao, G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 27 (2006) 4334–4344.
- [27] J.A. Nelder, R. Mead, *Comp. J.* 7 (1965) 308–313.
- [28] Guideline Q3A, Impurities in new drug substances, International Conference on Harmonization, 2002, <http://www.ich.org>.
- [29] United States Pharmacopeia 30, The United States Pharmacopeial convention, Rockville, MD, 2007.
- [30] European Pharmacopoeia, 5th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2005.

5.1.4 Příloha 4: Jáč, P., Los, P., Spáčil, Z., Pospíšilová, M., Polášek, M.: Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection, Electrophoresis, uncorrected proof.

Pavel Jáč
Petr Los
Zdeněk Spáčil
Marie Pospíšilová
Miroslav Polášek

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

Received January 29, 2008
Revised April 21, 2008
Accepted April 22, 2008

Research Article

Fast assay of glucosamine in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection

A novel capillary electrophoresis (CE) method with contactless conductivity detection suitable for the determination of glucosamine (GAm) and K^+ in pharmaceuticals was devised. Under the optimum conditions (aqueous 30 mM acetate buffer of pH 5.2 as the background electrolyte; voltage 30 kV; 25°C), GAm (migrating as glucosaminium cation) was well separated from K^+ that could occur in the dosage forms as excipient. The CE analysis was performed in fused-silica capillaries (50 μm i.d., 75 cm total length, 27 cm to detector) and the separation took < 3 min. The calibration graphs were linear for both GAm (100–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $r^2 = 0.997$) and K^+ (15–75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $r^2 = 0.997$) when using ethanolamine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as the internal standard. The LOD values ($S/N = 3$) were 9.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for GAm and 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for K^+ . The method was applied to the assay of GAm content in various dosage forms. Intermediate precision evaluated by determining the content of GAm in a single formulation on 3 consecutive days was characterized by RSD 2.35% ($n = 15$). Acceptable accuracy of the CE method was confirmed by the added/found GAm recovery experiments (recoveries 94.6–103.3%) and by statistical comparison of the results attained by the proposed CE and a reference HPLC method.

Keywords:

Contactless conductivity detection / CZE / Glucosamine / Nutraceuticals / Pharmaceuticals
DOI 10.1002/ELPS.2008-00068

1 Introduction

Glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose, GAm) affects biosynthesis of proteoglycans that are the main components of extracellular cartilage matrix [1]. Although serious clinical studies did not bring unambiguous results, GAm is believed to be effective in easing osteoarthritis pain, rehabilitating cartilage, renewing synovial fluid and repairing joints that have been damaged from osteoarthritis. Hence, GAm is frequently used in the treatment of osteoarthritis. Numerous nutraceutical supplements as well as pharmaceutical preparations containing GAm as a single active component or combined with other principles (such as chondroitin) are marketed worldwide.

There is no official method mentioned in the European Pharmacopoeia [2] concerning the assay of GAm as a bulk drug or as an active principle in pharmaceutical preparations. The United States Pharmacopoeia 30 [3] section Dietary Supplements involves articles on the assay of GAm bulk drug as well as on tablets by HPLC using octylsilane as the stationary phase, phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile (3:2) as the mobile phase and UV detection at 195 nm. Several papers report the determination of GAm content in blood plasma and in various dosage forms by capillary electrophoresis (CE), HPLC, high-performance thin-layer chromatography and spectrophotometry.

Because of the lack of chromophores in the molecules of common carbohydrates as well as in GAm molecule, it is difficult to detect these analytes in CE with direct UV detection. This problem can be essentially overcome by the application of strongly alkaline borate buffers resulting in the formation of negatively charged carbohydrate–borate complexes with enhanced absorption at 190 nm, allowing their direct UV detection [4]. Another approach for improving sensitivity in the CE analysis of GAm is the derivatization of the analyte, followed by UV detection [5], laser-induced fluorescence (LIF) detection [6, 7] or indirect UV detection [8]. Thus, GAm was quantified in nutraceuticals by CE with UV detection after the derivatization of

Correspondence: Dr. Miroslav Polášek, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové CZ-50005, Czech Republic
E-mail: Miroslav.Polasek@faf.cuni.cz
Fax: +420 495 067 164

Abbreviations: BGE, background electrolyte; CCD, contactless conductivity detection; CE, capillary electrophoresis; GAm, glucosamine; IS, internal standard; LIF, laser-induced fluorescence

GIAM with *o*-phthalaldehyde [5], but the linearity of calibration is far from ideal ($r^2 = 0.9615$). Microchip CE using derivatization with fluorescamine and fluorescence detection was recently applied to the analysis of α -D-glucosamine and β -D-glucosamine to follow their interconversion [6]. Zhang *et al.* [7] utilized 3-(*p*-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde to produce fluorescent derivatives of amino sugars including 1-GIAM and 2-GIAM for the CE assay coupled with LIF; favorable detection limit of 45 pM for 1-GIAM was achieved. Acidic, neutral and amino sugars including GIAM were separated by CE with indirect UV detection at 350 nm [8]. Here, the background electrolyte (BGE) of pH 12.1 contained 2,6-pyridinedicarboxylic acid (UV absorbing background) and CTAB to reverse the EOF. Under these conditions the negatively charged analytes migrated toward the anode. This method gave excellent results for GIAM, but the time of analysis was relatively long (16 min), which is a somewhat limiting feature for routine analysis.

Besides the CE, HPLC is often utilized to determine GIAM in human plasma or in nutraceuticals. For the HPLC assay of GIAM in body fluids, sensitive detection is desirable and therefore MS [9–11], pulsed amperometric detection [12] and fluorimetric detection [13, 14] of derivatized GIAM are methods of choice. HPLC assays with refractometric detection [15] or UV detection at 195 nm [16] were devised for the quality control of nutraceuticals containing GIAM.

Other miscellaneous techniques suitable for the determination of GIAM in dosage forms involve high-performance thin-layer chromatography/densitometry [17,18] and UV spectrophotometry [19] using derivatization with ninhydrin.

In addition to the above-mentioned detection techniques, contactless conductivity detection (CCD) firstly introduced by Gaš *et al.* [20] proved to be functional for the CE quantification of analytes lacking chromophores (including carbohydrates). The introduction of the so-called coaxial design of CCD in CE by Zeman *et al.* contributed substantially to the development of this technique [21]. In CE with CCD detection, the crucial point is the selection of suitable BGE. The conductivity of an optimal BGE must be different from that of the analyte and at the same time the mobility difference between the analyte ion and BGE co-ion must be small enough to attain acceptable peak symmetry [22]. Recent applications of CCD in CE are discussed in a review [23]. Da Silva used highly alkaline BGE with CTAB to determine sugars in beverages by CE with CCD [24]. Similar BGE was employed for the CE analysis of mixtures of saccharides (including GIAM), inorganic ions and anions of organic acids [25]. The applications of CE/CCD in the field of pharmaceutical analysis are rather scarce. Thus, Tanyanyiawa and Hauser [26] demonstrated feasibility of CE/CCD in the separation of β -blockers and other physiologically active amines including the analysis of drug formulations. These separations were carried out by conventional CZE and also in microchip scale. Later Felix *et al.* [27] developed a CE/CCD assay for the determination of salbutamol in syrups.

In the present paper, a novel fast CE/CCD method is proposed for the assay of GIAM where the analyte is separated in its cationic form. Practical applications of the method appropriately validated for the determination of GIAM in nutraceuticals and in various pharmaceutical dosage forms containing also K^+ are demonstrated.

2 Materials and methods

2.1 Instrumentation

All experiments were carried out with a PrinCE 650 system (PrinCE Technologies B.V., The Netherlands) electrophoretic analyzer equipped with Lambda 1010 UV–VIS detector (Leonberg, Germany), TraceDec[®] (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Austria) contactless conductivity detector and WinPrinCe software (as an integrated module of DAX data acquisition and analysis package). The pH of the BGEs was measured by the PHM 220 pH-meter (Radiometer, France) with PHC2401-8 combined glass electrode calibrated with standard aqueous Radiometer buffers. LC system consisting of Waters 1525 binary HPLC pump, Waters 717plus autosampler and Waters 2487 Dual λ Absorbance detector (Waters, Prague, Czech Republic) was utilized for the reference HPLC measurements (Breeze software was used for the HPLC data acquisition and processing).

2.2 Electrophoretic procedure

Uncoated fused-silica capillaries (50 μ m i.d., total length 75 cm, 27 cm to detector; lot: CLI03AAA) were obtained from Composite Metal Services (The Chase, Hallow, Worcester, UK). Before the first use the capillary was rinsed at 750 mbar successively with methanol (MeOH) for 5 min, ultra-pure water for 3 min, 0.1 M HCl for 20 min, ultra-pure water for 3 min, 1 M NaOH for 30 min and ultra-pure water for 30 min. Daily the capillary was conditioned before the first and after the last analysis with 0.1 M NaOH, followed by ultra-pure water (each step for 10 min at 1000 mbar). The capillary was rinsed at 1000 mbar successively with 0.1 M NaOH for 2 min and with appropriate BGE for 4 min between the individual runs. Separation capillary and CCD detection cell were maintained at 25 ± 0.1 °C. Samples were injected hydrodynamically at 50 mbar for 6 s. The settings of the CCD detector were fixed at the following values: gain 50; voltage –18 dB; offset 0.

2.3 Chemicals

D-(+)-glucosamine hydrochloride, ethanolamine and HPLC-grade acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Acetic acid was from Fluka (Buchs, Switzerland). Potassium chloride was obtained from Balex

(Pardubice, Czech Republic) and sodium hydroxide was obtained from Penta (Chrudim, Czech Republic). Potassium dihydrogen phosphate and 85% phosphoric acid (H_3PO_4) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); magnesium chloride, calcium chloride and aqueous 25% NH_4OH solution were obtained from Lachema (Neratovice, Czech Republic).

Pharmaceutical and nutraceutical preparations were purchased from a local pharmacy. Their labeled composition is shown in Table 1. Ultra-pure water produced by the Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout.

2.4 Standard and electrolyte solutions

Appropriate amount of acetic acid was dissolved in water and the pH was adjusted by 1 M NaOH to prepare the BGE.

Aqueous stock solutions of GIAM hydrochloride and ethanolamine (internal standard, IS) were prepared to obtain concentration of 1 mg/mL (calculated as free bases). Since some GIAM dosage forms contain KCl or K_2SO_4 as excipients, the separation of GIAM from K^+ as the second analyte had to be considered. Stock solution of KCl contained 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of K^+ . The final calibration solutions were prepared by mixing the stock solutions and diluting the mixture with water to obtain solutions containing 100–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GIAM (free base) and 15–75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of K^+ . Concentration of ethanolamine (IS) in the final calibration solutions was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. All standard and electrolyte solutions were degassed in an ultrasonic bath for 5 min. The BGEs were filtered through 0.45 μm nylon membrane syringe filters (Teknokroma, Barcelona, Spain).

2.5 Qualitative and quantitative analysis

Peak resolution (R_s) was calculated as $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$, where t_1 and t_2 are migration times of two neighboring analytes and w_1 and w_2 are their respective peak widths measured at the baseline. Normalized peak areas were

involved in all calculation during method validation and real sample analysis (also see Section 2.6).

Selectivity measurements were pursued by recording electropherograms of standard test solution containing 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of GIAM with successive additions of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of IS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of K^+ , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Ca^{2+} and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Mg^{2+} .

Linearity of calibration curves (involving five calibration solutions; each injected in triplicate) was evaluated by linear regression under the optimal separation conditions (see Section 3.1). The LOD was determined as signal-to-noise ratio ($S/N = 3$); LOQ was calculated as $S/N = 10$.

Run-to-run repeatability ($n = 6$) of migration times of analytes as well as of corrected peak area ratios A_x/A_{IS} was examined at two concentration levels (100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for GIAM and 15 and 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for K^+ , respectively) by six successive injections of the same solution. This solution was also injected six times after 24 and 48 h of the storage at $+8^\circ\text{C}$. In this case freshly prepared BGEs were used and the data were treated in the same manner as in the run-to-run repeatability experiment.

Intermediate precision was evaluated for formulation B (lot 07007). The sample was analyzed in three consecutive days. Each day five independent determinations were carried out; all test solutions were injected in triplicate. Every day fresh BGE, sample and standard GIAM solution were prepared. RSD values of migration times, peak area ratios A_x/A_{IS} and the content of GIAM found (% of the labeled content) were calculated.

2.6 Analysis of pharmaceutical preparation and nutritional supplements

Three pharmaceutical preparations and one dietary supplement in various dosage forms available in the local market (see Table 1) were analyzed to determine their content of GIAM.

To determine the GIAM content in the dosage forms, the electropherogram data obtained by the CE analyses of

Table 1. Composition of dosage forms analyzed

| Sample | Dosage form | Active substance | Excipients |
|----------------------------------|-------------|--|---|
| <i>Pharmaceuticals</i> | | | |
| A | Granulate | Glucosamine sulfate 1.5 g | Aspartame, citric acid, macrogolum, sorbitol |
| B | Granulate | Glucosamine sulfate 1.5 g | Aspartame, citric acid, macrogolum, sorbitol |
| C | Capsules | GIAM-potassium sulfate complex 676 mg | Magnesium stearate, titanium (IV) oxide |
| <i>Nutraceutical preparation</i> | | | |
| D | Tablets | Crystalline glucosamine sulfate · 2KCl 1060 mg | <i>Coating:</i> Talc, stearin ^a , (hydroxypropyl)methylcellulose, shellac, dyes E 171, E 132. <i>Tablet</i> microcrystalline cellulose, modified starch, magnesium stearate, polyvinylpyrrolidone, actitol, talc, calcium phosphate, tartaric, malic and citric acid |

Notes: E 171—titanium (IV) oxide; E 132—Indigotin.

a) Stearin is a mixture of stearic and palmitic acid.

three independently prepared final test solutions containing 150 µg/mL of GlAm (each solution injected in triplicate) were compared with those obtained by the CE analysis of the standard solution (150 µg/mL of GlAm) that was analyzed in parallel. For recovery experiments, the concentration of GlAm was increased by 75 µg/mL. The results of the assay of pharmaceutical preparation and nutritional supplements were expressed as percentage of the labeled amount of the active substance.

For each dosage form slightly different sample preparation was employed. Content of five sachets of formulation A or B was mixed together and its portion was just dissolved in water on ultrasonic bath and diluted. Part of the mixed content from 10 capsules of formulation C was dispersed in water and sonicated for several minutes to obtain colloidal solution, which was appropriately diluted with water and directly injected. Portion of 20 finely pulverized tablets was suspended in BGE and sonicated for 10 min and thereafter centrifuged for 15 min at 3000 r.p.m. An aliquot of the supernatant was further diluted with water to receive final test solution. For recovery experiments, the standard addition underwent the same procedure as the original sample.

2.7 Reference HPLC method for accuracy evaluation

The reference HPLC method was adopted from [16]. All separation conditions were identical to those reported in [16] except of the Phenomenex Luna amino column dimensions (100 mm × 3.00 mm i.d.) and injection volume (20 µL).

Simple revalidation including the system suitability test and linearity measurement (for six standard solutions containing 1.25–5.02 mg/mL of GlAm; each injected in triplicate) was effected during the HPLC method transfer. Ten times replicated injection of single standard solution containing 3.61 mg/mL of GlAm was employed in the system suitability test evaluation.

The sample processing in the HPLC assay of the formulation B (lot 07007) was analogical to that of the CE protocol except for higher concentration of GlAm (1.95 mg/mL) in the test solution injected; the GlAm standard addition in the recovery experiment was 1.03 mg/mL. Three independently taken weights of the powdered formulation B were analyzed and each test solution was injected in triplicate.

3 Results and discussion

3.1 Method development

Several BGEs of different pHs were examined to check their suitability for the GlAm determination by CZE/CCD. Only formate (pH 4) and acetate (pH 5.6) buffers gave satisfactory results in terms of sensitivity, migration times and peak shapes. Other BGEs tested (phosphate pH 7,

phosphate pH 2, HEPES, citrate/phosphate pH 5.5 and BGE according to [24]) were unsuitable mostly due to insufficient sensitivity. In HEPES-based BGE of pH ~7, two peaks were observed upon injection of GlAm solution; this was probably caused by the mutarotation of GlAm molecule and therefore this BGE was not selected for further CE method development. Finally, the acetate-based BGE was selected as optimal one because, in contrast to formate-based BGE, no “system peaks” occurred in the electropherograms. From a group of five basic compounds examined as potential IS (imidazole, glutamate, spermidin, *N,N*-dimethylethanolamine and ethanolamine), only *N,N*-dimethylethanolamine and ethanolamine gave distinct peaks. At last ethanolamine was chosen as appropriate IS since its resolution from the peaks of GlAm was better than that of the *N,N*-dimethylethanolamine–GlAm pair. This IS was also well separated from K⁺.

The method was further optimized with respect to the BGE concentration, pH and voltage.

When increasing the concentration of acetate from 20 to 60 mM (other conditions were pH 5.5, 20 kV, injection at 50 mbar for 0.2 min) the migration times of K⁺, ethanolamine and GlAm increased steadily. To maintain short time of separation and at the same time to achieve favorable analyte peak shape, 30 mM acetate buffer was selected for further optimization.

The effect of pH of 30 mM acetate (BGE) was examined in the range pH 5.1–5.6. The best separation of GlAm, ethanolamine and K⁺ was achieved at pH 5.2. Evidently at pH 5.2, the amino groups of GlAm (pKa 7.8; see [28]) and ethanolamine (pKa 9.52; see [29]) are practically fully protonated and these cations migrate toward the cathode.

Although increasing the voltage from 20 to 30 kV (with 30 mM acetate, pH 5.2, injection 50 mbar for 0.2 min) resulted in shorter time of analysis, the resolution of the peaks of K⁺, ethanolamine and GlAm remained excellent. Therefore, all further experiments were performed at 30 kV.

The injection mode was optimized to find a compromise between sensitivity and separation efficiency. When increasing the injection time from 6 to 18 s at both 50 and 100 mbar, the sensitivity was improved but the separation efficiency worsened because peak tailing of GlAm and IS became more pronounced. Therefore, the injection time of 6 s at 50 mbar was selected for further experiments.

The technique of capillary rinsing appeared to be crucial for achieving reproducible results. Rinsing the capillary just with the BGE at 1000 mbar for 2 min between runs resulted in gradual increase in the migration times of the analytes. This problem was solved by adopting the following rinsing scheme between successive runs: 0.1 M NaOH for 2 min and the BGE for 4 min (both at 1000 mbar); in this case, the RSD of migration times decreased from 9.6 to 0.08% (six successive injections).

The electropherogram of a standard solution and blank (water injected) analyzed under the optimal conditions is depicted in Fig. 1. The current generated under such conditions was approximately 38 µA.

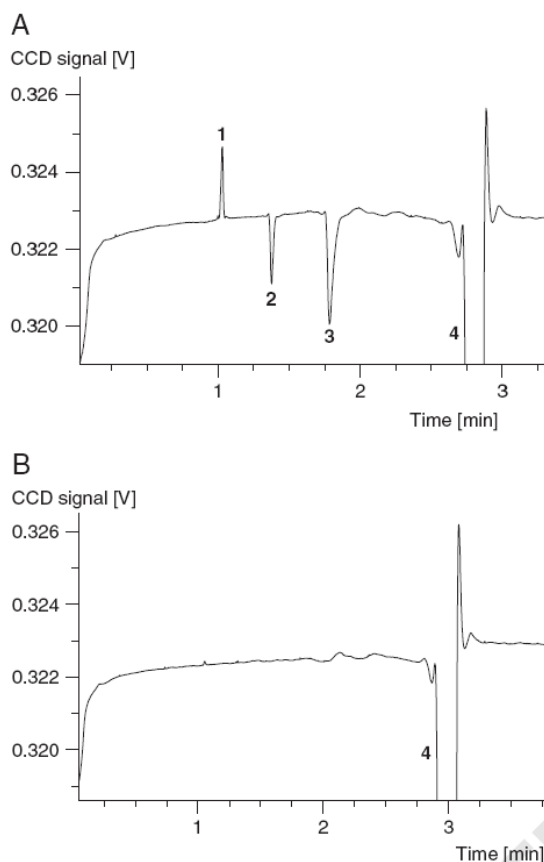


Figure 1. (A) Electropherogram of standard mixture (150 $\mu\text{g/mL}$ of glucosamine; 30 $\mu\text{g/mL}$ of K^+ and 100 $\mu\text{g/mL}$ of IS-ethanolamine); (B) blank electropherogram; peak identification: (1) K^+ , (2) ethanolamine (IS), (3) GlAm, (4) EOF. Experimental conditions: 30 mM acetate buffer, pH 5.2, 30 kV, 25 $^{\circ}\text{C}$, hydrodynamic injection 50 mbar for 6 s. Generated current is 38 μA .

The R_s values were 5.6 for the K^+ –IS pair, 4.5 for the GlAm–IS pair, and 7.0 for GlAm–EOF. The number of theoretical plates per meter was $\approx 13\,100$, 32 900, and 12 000 for K^+ , IS, and GlAm, respectively. Electrophoretic mobilities were calculated as $6.9 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ for K^+ , $4.2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ for IS, and $2.3 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ for GlAm. All these data were determined with the test solution containing 45 $\mu\text{g/mL}$ of K^+ , 200 $\mu\text{g/mL}$ of GlAm, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of IS analyzed under the optimal conditions.

3.2 Method validation

The proposed CE method was validated with respect to specificity, linearity, LOD, LOQ, repeatability, intermediate precision, and accuracy (for conditions and results see Tables 2–4).

The specificity issue was examined for Ca^{2+} and Mg^{2+} as potential interferences, even though Mg stearate or Ca phosphate present in minute amounts in the dosage forms as excipients are practically insoluble in water. Electropherogram (not shown here) of a standard mixture containing GlAm, IS, K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} (for concentrations see Section 2.5) revealed that Mg^{2+} migrates faster than the IS and the resolution between these peaks is 1.42; Ca^{2+} migrates even faster than Mg under the optimal conditions and exhibits very low CCD signal. Hence there is no risk of interference from magnesium or calcium with the assay of GlAm or K^+ in such preparations.

The calibration curves were characterized by equations: $y = 0.016x - 0.025$ ($r^2 = 0.997$) and $y = 0.036x - 0.002$ ($r^2 = 0.997$) for GlAm and K^+ , respectively, where x stands for the concentration of the analyte ($\mu\text{g/mL}$). The linearity was proved for 100–300 $\mu\text{g/mL}$ of GlAm and 15–75 $\mu\text{g/mL}$ of K^+ . For GlAm the LOD was 9.3 $\mu\text{g/mL}$ (50 μM GlAm) and for K^+ 2.9 $\mu\text{g/mL}$ (70 μM K^+). The LOQs were 30.9 $\mu\text{g/mL}$ of GlAm and 9.6 $\mu\text{g/mL}$ of K^+ . The sensitivity of the method is adequate for the determination of GlAm as the main component in formulations while being slightly better than in previous HPLC or CE assays using spectrophotometric detection [5,16]. Nevertheless, it is not usable for the assay of GlAm in biological fluids where high-sensitivity MS, fluorescence, or LIF detection after derivatization (with typical LODs around 5–35 ng/mL of GlAm) is required [7,10,11,13,14].

The results of run-to-run repeatability of migration times and peak area ratios for two concentration levels of GlAm and K^+ in standard solutions are shown in Table 2. The repeatability of migration times is excellent as documented by their RSD values not exceeding 0.74% ($n = 6$; single day). The repeatability of corrected peak area ratios is characterized by RSD values of $\leq 3.1\%$ ($n = 6$; single day) for GlAm and $\leq 2.0\%$ ($n = 6$; single day) for K^+ , which is acceptable for quantitative CE analysis.

The results of the evaluation of the intermediate precision are summarized in Table 3. This validation parameter was assessed only for sample B (lot 07007). The experiment was run in three days; each day five independent determinations of the same sample were performed by the proposed CE method. It can be clearly seen that the method gives practically the same results within moderate time span.

For the estimation of the accuracy of the proposed CE method a reference HPLC assay was adopted from [16] and revalidated by us; it was characterized by the mean retention time of GlAm of 4.1 min (RSD 0.76%; $n = 10$) and the repeatability of the peak areas was 0.14% (RSD; $n = 10$). The average tailing factor (peak symmetry) was 1.29 and the efficiency (number of theoretical plates) was 286 as determined in accordance with the European Pharmacopoeia [2]. The HPLC calibration curve (see Section 2.8) exhibited excellent linearity ($r = 0.9997$). Three independent HPLC assays of GlAm in formulation B (lot 07007) gave mean content 98.94% of labeled GlAm (RSD 0.73%); the recovery

Table 2. Run-to-run repeatability of migration times and peak areas of GIAm and K⁺ as measured with standard solutions

| Analyte | Day 1 (<i>n</i> = 6) | | Day 1+2 (<i>n</i> = 12) | | Day 1+2+3 (<i>n</i> = 18) | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | T _m (RSD) | AR (RSD) | T _m (RSD) | AR (RSD) | T _m (RSD) | AR (RSD) |
| K ⁺ (15 µg/mL) | 1.03 (0.25) | 0.568 (1.97) | 1.05 (1.55) | 0.545 (4.89) | 1.06 (1.84) | 0.571 (7.77) |
| GIAm (100 µg/mL) | 1.81 (0.74) | 1.668 (3.11) | 1.87 (3.22) | 1.603 (5.15) | 1.89 (3.23) | 1.583 (4.64) |
| K ⁺ (45 µg/mL) | 1.05 (0.12) | 1.657 (1.64) | 1.06 (0.87) | 1.655 (3.04) | 1.06 (1.28) | 1.650 (2.82) |
| GIAm (200 µg/mL) | 1.84 (0.08) | 3.147 (2.64) | 1.87 (1.44) | 3.163 (2.17) | 1.89 (1.86) | 3.147 (1.98) |

Note: *T_m* is the mean of migration time (min); *AR* is a mean value of the peak area ratio of *A_x*/*A_{IS}* (*A_x* is the peak area of the analyte and *A_{IS}* is the peak area of the IS); RSD is the relative standard deviation (%).

Table 3. Evaluation of intermediate precision and accuracy of the assay of GIAm in dosage form B (lot 07007)

| Day | Sample | Theoretical amount ^{a)} | Found by CE (%) ^{b)} | RSD (<i>n</i> = 3) ^{c)} | Found by HPLC (%) ^{b)} | RSD (<i>n</i> = 3) ^{c)} | <i>t</i> -Test |
|------------------------|--------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1 | 1 | 151.3 | 100.7 | 2.07 | 99.40 | 0.14 | 1.997 ^{g)} |
| | 2 | 151.5 | 100.1 | 1.12 | 99.28 | 1.89 | |
| | 3 | 152.0 | 100.5 | 2.62 | 98.11 | 1.76 | |
| | 4 | 152.9 | 100.4 | 0.95 | | | |
| | 5 | 152.8 | 99.0 | 1.99 | | | |
| | — | — | 100.14 ^{d)} | 0.67 ^{e)} | 98.94 ^{d)} | 0.73 ^{f)} | |
| 2 | 1 | 152.3 | 101.0 | 0.3 | | | |
| | 2 | 152.1 | 99.2 | 2.40 | | | |
| | 3 | 151.6 | 101.6 | 1.52 | | | |
| | 4 | 153.7 | 101.1 | 1.04 | | | |
| | 5 | 152.4 | 101.1 | 2.68 | | | |
| 3 | 1 | 151.7 | 91.9 | 2.19 | | | |
| | 2 | 152.2 | 99.6 | 1.56 | | | |
| | 3 | 154.5 | 101.0 | 0.69 | | | |
| | 4 | 153.7 | 98.3 | 2.41 | | | |
| | 5 | 152.2 | 99.5 | 0.28 | | | |
| Mean | — | 99.7 | — | | | | |
| RSD % (<i>n</i> = 15) | — | 2.35 | — | | | | |

a) µg/mL of GIAm in injected test solution as calculated from the labeled amount.

b) Percent of labeled amount.

c) RSD values calculated from three injections of test solution.

d) Mean Day 1

e) RSD Day 1 (*n_a* = 5).

f) RSD Day 1 (*n_b* = 3)

g) At 95% confidence level; *n_a* = 5; *n_b* = 3; *t_{critical}* = 2.447.

(found/added) was 99.7% (RSD 3.12%; *n* = 3). The Student's unpaired *t*-test [30] was performed to statistically evaluate the accuracy of the CE method devised. For the results of the assays see Table 3, Day 1 (the number of determinations *n_a* = 5 for the CE and *n_b* = 3 for the HPLC method). The *t*-test did not reveal any statistically significant difference between the results.

The results of the determination of GIAm in four different samples of real dosage forms by the devised CE method are summarized together with the recovery data in Table 4.

The recovery data of 100 ± 5% of added amount were found in all cases with RSD ≤ 3.14%, thus confirming acceptable accuracy of the proposed method.

The mean content of GIAm found in samples A, B, and C meets the requirements of USP 30 [3], *i.e.* it falls within ± 10% of the labeled value. The content of GIAm found in formulation D is slightly below the acceptance limit. The RSD values of peak area ratios were ≤ 4.16 % for the GIAm assay. See Table 4 for details.

The dosage forms were not analyzed for K⁺ (formulated in the tablets and capsules as excipient) since this is not required by the USP 30 [3]. Nevertheless, practically the content of K⁺ can be determined in the formulations by the devised CE method if needed. Electropherograms of formulations B, C, and D are depicted in Fig. 2.

Table 4. Assay of GIAm in pharmaceutical preparations A, B (lot 07001) and C, and in nutraceutical D

| Dosage form | Sample | Theoretical ^{a)} amount | Found ^{b)} (%) (RSD; <i>n</i> = 3) | Added ^{c)} | Found ^{d)} (RSD; <i>n</i> = 3) | Recovery (%) |
|---------------|--------|-------------------------------------|--|---------------------|--|----------------|
| A | 1 | 149.2 | 92.9 (1.90) | 77.6 | 78.6 (0.57) | 101.3 |
| | 2 | 150.2 | 96.8 (1.17) | 77.6 | 79.9 (2.59) | 103.0 |
| | 3 | 148.5 | 95.8 (1.47) | 77.6 | 74.95 (0.50) | 96.6 |
| Mean (RSD) | — | — | 95.2 (2.1) | — | — | 100.3 (3.3) |
| B | 1 | 151.3 | 92.3 (2.01) | 77.6 | 74.26 (0.73) | 95.7 |
| | 2 | 149.6 | 92.4 (2.10) | 77.6 | 74.07 (1.21) | 95.5 |
| | 3 | 148.1 | 89.7 (1.97) | 77.6 | 73.3 (1.78) | 94.6 |
| Mean (RSD) | — | — | 91.5 (1.7) | — | — | 95.3 (0.7) |
| C | 1 | 146.1 | 90.6 (0.89) | 77.6 | 78.68 (1.55) | 101.5 |
| | 2 | 146.3 | 91.3 (1.65) | 77.6 | 78.61 (3.14) | 101.4 |
| | 3 | 147.2 | 91.6 (2.55) | 77.6 | 80.14 (2.37) | 103.3 |
| Mean (RSD) | — | — | 91.2 (0.6) | — | — | 102.0 (1.1) |
| D | 1 | 154.6 | 90.4 (1.05) | 75.5 | 75.8 (1.13) | 100.4 |
| | 2 | 157.6 | 88.6 (2.30) | 74.4 | 76.1 (0.82) | 102.3 |
| | 3 | 153.2 | 89.9 (4.16) | 73.4 | 69.9 (2.22) | 95.3 |
| Mean (RSD) | — | — | 89.6 (1.0) | — | — | 99.3 (3.7) |

a) $\mu\text{g/mL}$ of GIAm in injected test solution as calculated from the labeled amount.

b) Percent of labeled amount (RSD values calculated from three injections of test solution).

c) $\mu\text{g/mL}$ of GIAm added to the injected test solution.

d) Found of added ($\mu\text{g/mL}$ of GIAm; RSD values were calculated from three injections of test solution).

4 Concluding remark

This communication demonstrates the feasibility of using CE with CCD for the assay of GIAm in pharmaceuticals or nutraceuticals, without the need of the derivatization of the analyte. Since the GIAm is separated from K^+ that gives a well-developed peak in the electropherogram, simultaneous determination of GIAm and K^+ is possible. In comparison with other methods published earlier, the proposed CE/CCD method is faster (a single separation taking less than 3 min) and its sensitivity is fully sufficient for the purpose of dosage form quality testing. The results of real sample analyses compared with those of reference HPLC assay and

the added/found recoveries indicate that the CE/CCD method is accurate. In addition to the fact that the CCD has been scarcely used in the CE analysis of pharmaceuticals so far, this is the first application of CE/CCD where the GIAm is separated and determined in the form of cation to best of our knowledge.

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (Project NR8964-3/2006) and by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822.

The authors have declared no conflict of interest.

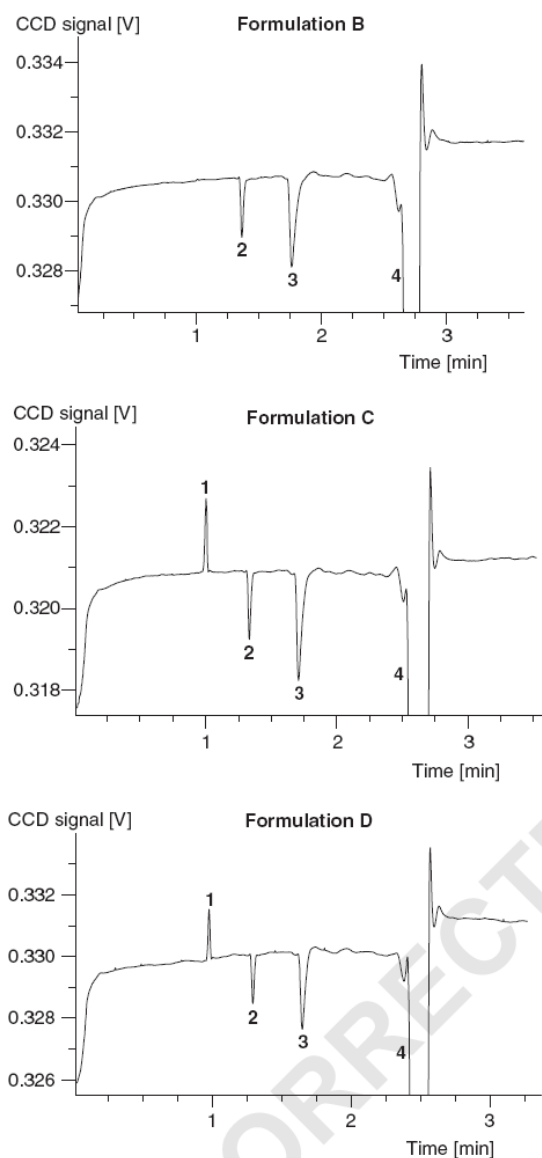


Figure 2. Electropherograms of formulations B, C, and D. For peak identification and experimental conditions, see legend of Figure 1.

5 References

- [1] Noyszewski, E. A., Wroblewski, K., Dodge, G. R., Kudchodkar, S., et al., *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 1089–1095.
 [2] *European Pharmacopoeia*, 6th Edn, Council of Europe, Strasbourg, France 2007.

- [3] *The United States Pharmacopeia*, vol. 30, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD 2007.
 [4] Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1541–1547.
 [5] Chen, J.-J., Lee, Y. C., Cheng, T. J., Hsiao, H. Y., Chen, R. L. C., *J. Food Drug Anal.* 2006, 14, 203–206.
 [6] Skelley, A. M., Mathies, R. A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1132, 304–309.
 [7] Zhang, Y., Arriaga, E., Diedrich, P., Hindsgaul, O., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 221–229.
 [8] Soga, T., Heiger, D. N., *Anal. Biochem.* 1998, 261, 73–78.
 [9] Zhong, S., Zhong, D., Chen, X., *J. Chromatogr. B*, 2007, 854, 291–298.
 [10] Roda, A., Sabatini, L., Barbieri, A., Guardigli, M. et al., *J. Chromatogr. B*, 2006, 844, 119–126.
 [11] Huang, T. M., Cai, L., Yang, B., Zhou, M. X. et al., *Chromatogr.*, 2006, 20, 251–256.
 [12] Campo, G. M., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Vinci, R., Calatroni, A., *J. Chromatogr. B* 2001, 765, 151–160.
 [13] Huang, T. M., Deng, C. H., Chen, N. Z., Liu, Z., Duan, G. L., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2296–2302.
 [14] Zhang, L. J., Huang, T. M., Fang, X. L., Li, X. N. et al., *J. Chromatogr. B*, 2006, 842, 8–12.
 [15] El-Saharty, Y. S., Bary, A. A., *Anal. Chim. Acta*, 2002, 462, 125–131.
 [16] Shao, Y., Alluri, R., Mummert, M., Koetter, U., Lech, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 35, 625–631.
 [17] Esters, V., Angenot, L., Brandt, V., Frédérick, M. et al., *J. Chromatogr. A* 2006, 1112, 156–164.
 [18] Sullivan, C., Sherma, J., *Acta Chromatogr.* 2005, 15, 119–130.
 [19] Wu, Y., Hussain, M., Fassih, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38, 263–269.
 [20] Gaš, B., Demjanenko, M., Vacik, J., *J. Chromatogr.* 1980, 192, 253–257.
 [21] Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K., *Anal. Chem.* 1998, 70, 563–567.
 [22] Zemann, A. J., *Trends Anal. Chem.* 2001, 20, 346–354.
 [23] Šolínová, V., Kašička, V., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1743–1762.
 [24] Carvalho, A. Z., da Silva, J. A. F., do Lago, C. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 2138–2143.
 [25] Jaroš, M., Soga, T., Goor, T., Gaš, B., *Electrophoresis* 2005, 26, 1948–1953.
 [26] Tanyanyiwa, J., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3010–3016.
 [27] Felix, F. S., Quintino, M. S. M., Carvalho, A. Z., Coelho, L. H. G. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 40, 1288–1292.
 [28] Park, J. W., Choi, K.-H., Park, K. K., *Bull. Korean Chem. Soc.* 1983, 4, 68–72.
 [29] Smith, R. M., Martell, A. E., *Critical Stability Constants Vol. 2: Amines*, Plenum Press, New York 1975, p. 15.
 [30] Eckschlager, K., Horsak, I., Kodejs, Z., *Vyhodnocovani Analytickych Vysledku a Metod (Evaluation of Analytical Results and Methods)*, SNTL, Prague 1980, p. 34.

5.2 Abstrakty uvedené ve sbornících

5.2.1 Příloha 5: Jáč, P., Polášek M., Pospíšilová, M., Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods, 11th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Rimini, 25. - 28. 9. 2005.

NP-P6

RECENT TRENDS IN THE DETERMINATION OF POLYPHENOLS BY ELECTROMIGRATION METHODS

Pavel Jáč, Miroslav Polášek, Marie Pospíšilová
Charles Department of Analytical Chemistry, 05 Hradec Králové, Czech Republic

In the last decade naturally occurring antioxidants such as polyphenols (flavonoids and polyphenolic acids) have attracted attention of many research groups. These compounds, together with ascorbic acid, vitamin E and carotenoids, are the most important reducing agents occurring in human diet; they are believed to protect living body tissues against the oxidative stress. The number of papers concerning the determination of polyphenols in various analytical matrices is constantly increasing in accordance with their intensive pharmacological and biological investigation. Due to relatively complex nature of plant materials, efficient separation methods play the most important role in their analysis. In addition to chromatographic methods (HPLC and GC) that have occupied the leading position in the pharmaceutical and phytochemical analysis, numerous papers dealing with the determination of polyphenols by means of electromigration methods have been reported.

An overview mapping recent trends in the determination of polyphenols of natural origin by electromigration methods (covering the period of last five years) is presented. The overview involves different techniques such as capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with various detection techniques, as well as on-line integration of pre-separation methods with capillary electrophoresis, namely ITP-CZE as investigated in our laboratory [1-3] and flow-injection – CZE.

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency of Charles University No. 296/2005/BCH, Internal grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic No. NL/7689-3 and by the MSM Project 0021620822 of the Czech Ministry of Education.

M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, *Electrophoresis* 23 (2002) 1045-1052.

M. Urbánek, L. Blechtová, M. Pospíšilová, M. Polášek, J. *Chromatogr. A* 958 (2002) 261-271.

R. Hamoudová, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, J. *Chromatogr. A* 1032 (2004) 281-287.

5.2.2 Příloha 6: Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I., Kaderová L., Comparative study of borate and tungstate as complex-forming reagents for the separation of selected polyphenols by capillary electrophoresis, 15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Paříž, 28. - 30. 8. 2006.

P 52

COMPARATIVE STUDY OF BORATE AND TUNGSTATE AS COMPLEX-FORMING REAGENTS FOR THE SEPARATION OF SELECTED POLYPHENOLS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

P. Jáč, M. Polášek, A. I. Vaz Batista, L. Kaderová
Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, CZ-500 05, Czech Republic. jacp@faf.cuni.cz

Two capillary electrophoretic (CE) systems using tungstate or borate as different complex-forming selectors for the separation of polyphenols (apigenin, luteolin, hyperoside, quercetin, rutin, chlorogenic acid and p-coumaric acid) were developed and compared in terms of resolution and sensitivity. Similar to molybdate-containing background electrolyte (BGE) examined earlier (1), tungstate-based BGE of pH 7.4 (adjusted with TRIS) containing 50 mM HEPES, 2.2 mM sodium tungstate and 25% (v/v) of MeOH allowed baseline separation of all the analytes within 13 min. The separation was performed in 75 cm (effective length 42 cm) x 75 μ m fused silica capillaries at 30 kV with UV detection at 275 nm; cinnamic acid was used as internal standard. Quantitative assay (except of chlorogenic acid that exhibited poor calibration parameters) was possible. The CE separation with optimized 20 mM sodium tetraborate BGE of pH 9.0 (adjusted with boric acid) showed better linearity and sensitivity compared to that using the tungstate BGE but in the borate system p-coumaric acid and apigenin could not be separated. Relatively high pH of the borate BGE is a drawback since the polyphenols may be oxidized by the air oxygen more readily than at neutral pH. Our findings suggest that the novel tungstate-based BGE represents a good alternative to the routinely applied borate system when analyzing mixtures of polyphenols by CE.

(1) M. Polášek, I. Petříška, M. Pospíšilová, L. Jahodář, *Talanta*, 69 (2006) 192

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency of the Charles University (Project 296/2005), by the Czech Ministry of Education, Research Project MSM 0021620822, and by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (Project NR8964-3/2006).

5.2.3 Příloha 7: Jáč, P., Polášek M., Vaz Batista A. I., Utilization of tungstate-based electrolyte for the determination of polyphenols in natural products by capillary electrophoresis, 12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Elba, 23. - 26. 9. 2007.

UTILIZATION OF TUNGSTATE-BASED ELECTROLYTE FOR THE DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN NATURAL PRODUCTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

P. Jáč, M. Polášek, A.I. Vaz Batista
Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, CZ-500 05, Czech Republic

New kind of background electrolyte (BGE) utilizing millimolar amounts of sodium tungstate as complex-forming reagent is introduced. Addition of tungstate into the BGE affects significantly electrophoretic migration of compounds with vicinal -OH groups due to the formation of negatively charged complexes involving W(VI) as central ion. The mobility of monohydroxy compounds is not influenced. The separation selectivity was demonstrated on model mixtures of flavonoids (apigenin, luteolin, hyperoside, quercetin and rutin) and phenolic acids (chlorogenic acid and p-coumaric acid).

With optimized BGE, i.e., 50 mM HEPES, 2.2 mM sodium tungstate, pH 7.4 (adjusted by TRIS) and 25 % (v/v) of MeOH the base-line separation of all analytes was achieved within 13 minutes. The separation was performed in 75 cm (effective length 42 cm) x 75 µm fused silica capillary at 30 kV with UV detection at 275 nm.

The calibration curves were rectilinear ($r^2 \geq 0.9933$) for the concentration ranges 25-175 µg/ml for all analytes when using cinnamic acid as the internal standard (IS). The LOD values ranged from 1.8 to 6 µg/ml for all analytes except of chlorogenic acid. Intra-day precision (n=6) of migration times (RSD ≤1.2%) and peak area ratios (analyte/IS) (RSD ≤5.6%) was determined.

The method was applied to the determination of rutin and hyperoside content in *Hypericum perforatum* extract. Furthermore the potential of this electrophoretic method was demonstrated by the assay of polyphenols in a propolis tincture available on the local market. Our findings suggest that this tungstate-containing BGE can be alternatively utilized for the determination of the content of polyphenols in natural products by CE at considerably lower pH compared to conventional borate-based BGEs.

Acknowledgment: This work was supported by Research Project MSM 0021620822, by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (Project NR8964-3/2006) and by Zentiva.

6 Závěr

Tato dizertační práce je zaměřena na využití kapilárních elektromigračních metod pro analýzu biologicky aktivních sloučenin.

První tematický okruh zkoumaný v této práci byl zaměřen na analýzu polyfenolických sloučenin v rostlinném materiálu. V rámci tohoto tematického okruhu byla zpracována rešerše, která shrnuje poznatky v oblasti analýzy polyfenolických sloučenin v letech 1999-2005. Výsledky zpracované v této rešerši jasně dokladují praktickou využitelnost kapilárních elektromigračních metod v analýze polyfenolických sloučenin přítomných v rostlinném materiálu. Během studia literatury vyplynulo, že drtivá většina elektrolytových systémů je založená na alkalickém borátovém pufru, u kterého hrozí nebezpečí oxidativní degradace tak silných antioxidantů jako jsou polyfenoly. Zejména vzhledem k tomuto zjištění byl zkoumán vliv přídavku wolframanu sodného k základnímu elektrolytu. Tato oxosloučenina wolframu tvoří již v mírně kyselé či neutrální oblasti aniontové komplexy s polyfenolickými sloučeninami, které mohou být elektroforeticky separovány. Výsledky jasně demonstrují vliv přídavku wolframanu sodného k BGE na selektivitu separačního procesu. Dosažené výsledky byly porovnány s paralelně vyvinutým borátovým elektrolytem s následujícími závěry:

- Elektrolyt s přídavkem wolframanu sodného měl vyšší vliv na selektivitu separačního procesu pro použitou modelovou směs.
- Elektrolyt obsahující borát jako základní elektrolyt umožňoval rychlejší analýzy s vyšší citlivostí.
- Účinnost separačního procesu byla vyšší v případě borátového elektrolytu.
- Opakovatelnost v rámci jednoho dne byla lepší pro elektrolyt založený na wolframátu, zatímco mezidenní opakovatelnost vykazovala podobné výsledky pro obě metody.

Analýzou lyofylizovaného extraktu třezalky tečkované bylo demonstrováno praktické využití nově vyvinuté metody založené na BGE obsahujícím Na_2WO_4 . Zde se ukázalo, že citlivost je stinnou stránkou této metody. Některé polyfenoly totiž nebylo možné kvantifikovat, protože jejich signál byl nižší než LOQ.

Další okruh disertační práce je zaměřen na vývoj, optimalizaci a validaci elektromigračních metod pro kontrolu jakosti léčivých přípravků a/nebo potravinových doplňků.

První práce tohoto tematického okruhu představuje původní metodu pro kontrolu čistoty escitalopramu. Jako nečistoty byly sledovány druhý enantiomer (*R*)-citalopram a syntetický prekurzor (*R,S*)-citadiol, který byl v předkládané práci poprvé analyzován jako nečistota v lékových formách. Metoda byla validována dle doporučení ICH (Q2R1) a praktická využitelnost metody byla demonstrována na analýze tablet escitalopramu, substancí escitalopramu a tabletách obsahujících racemický citalopram. Dosažené výsledky dokladují využitelnost kapilární elektroforézy pro kontrolu jakosti ve farmaceutickém průmyslu včetně analýz příbuzných látek.

Další část dizertační práce je zaměřena na vývoj, optimalizaci a validaci CZE metody pro analýzu glukosaminu s využitím bezkontaktní vodivostní detekce. Tato metoda jako jediná z doposud uveřejněných metod umožňuje současné stanovení glukosaminu vedle K^+ , které jsou velmi často součástí perorálních glukosaminových přípravků. Optimalizovaná metoda byla validována a dosažené výsledky demonstrují využitelnost této CZE/CCD metody pro rutinní analýzy. V rámci testování správnosti metody byla tato metoda porovnána s již zavedenou HPLC metodou a nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi výsledky obou metod. Metoda byla aplikována pro stanovení glukosaminu ve třech léčivých přípravcích a jednom potravinovém doplňku.

7 Shrnutí

Předkládaná dizertační práce se zabývá využitím kapilárních elektromigračních metod pro analýzu biologicky aktivních sloučenin.

Teoretická část této dizertační práce se stručně zabývá historickým vývojem, instrumentálním zázemím a separačními mechanismy různých typů elektromigračních metod. Kromě těchto témat byl podán stručný přehled o možnostech chirálních separací pomocí CE a tvorbě komplexů za účelem ovlivnění selektivity. Poslední dvě kapitoly teoretické části stručně pojednávají o optimalizaci a validaci elektromigračních metod.

Výsledková část je tvořena komentářem k publikovaným pracím, které jsou v plném znění uvedeny v přílohách. Tematicky lze výsledky prezentované v této dizertační práci rozdělit do dvou hlavních celků. Prvním okruhem je využití elektromigračních metod v analýze polyfenolů v rostlinném materiálu a druhým tematickým celkem je vývoj, optimalizace a validace elektromigračních metod pro kontrolu jakosti léčivých přípravků a/ nebo potravinových doplňků.

V rámci prvního okruhu byla vypracována rešeršní práce shrnující trendy v analýze polyfenolů pomocí CE za období 1999-2005. Další publikací zabývající se analýzou polyfenolů je již původní práce zaměřená na využití komplexačního činidla – wolframany sodného – jako aditiva v BGE pro analýzu polyfenolů v rostlinném materiálu.

Druhý tematický okruh je zastoupen také dvěma publikacemi. První z nich byla vypracována ve spolupráci s pracovní skupinou prof. Gerharda Scriby a představila původní CZE metodu pro stanovení nečistot escitalopramu včetně jeho (*R*)-enantiomeru. Další práce se zabývá vývojem nové CZE/CCD metody pro stanovení glukosaminu v léčivech či potravinových doplňcích.

8 Summary

This thesis deals with the utilization of capillary electromigration methods for the analysis of biologically active substances.

In the Theoretical part historical progress, instrumentation and separation mechanisms of different electromigration methods are discussed. In addition brief overviews mapping chiral separation by means of CE and complex-formation for the separation selectivity enhancement are also included. Two final sections of Theoretical part are focused on specific features of method optimization and method validation in CE.

Practical part is presented by comments on published papers, which were attached in full text version to Addendum. The results presented in this thesis cover two areas. First area is focused on the utilization of electromigration methods for the analysis of polyphenols in plant materials while second area is dealing with the development, optimization and validation of CE methods for quality control of pharmaceuticals and/or nutraceuticals.

The first area of the practical part overviews new trends (papers published between 1999-2005) in the analysis of polyphenols by CE. The second paper focused on the analysis of polyphenols is an original investigation of new kind of BGE based on complex-forming reagent – sodium tungstate – that was applied in the assay of polyphenols in *Hypericum perforatum* extract.

The second topic is also represented by two publications. The first study was realized in cooperation with a working group of prof. Gerhard Scriba. An original CZE method for the determination of impurities in escitalopram including (*R*)-enantiomer was devised. The last publication deals with the development of new CZE method with contactless conductivity detection for the determination of glucosamine content in pharmaceuticals and dietary supplements.

9 Literatura

- [1] Righetti P. G, J. Chromatogr. A 2005, 1079, 24-40.
- [2] Jorgenson J. W., Lukacs K. D., Anal. Chem. 1981, 53, 1298-1302.
- [3] <http://www.micronit.com/index.php?TreeID=5&>; 29. 4. 2008.
- [4] <http://www.chem.agilent.com/scripts/PDS.asp?lpage=1283>; 29. 4. 2008.
- [5] Issaq H. J., Veenstra T. D., Electrophoresis 2007, 28, 1980-1988.
- [6] Braun R. J., Kinkl N., Beer M., Ueffing M., Anal. Bioanal. Chem. 2007, 389, 1033-1045.
- [7] Polášek M., Petriška I., Pospíšilová M., Jahodář L., Talanta 2006, 69, 192-198.
- [8] <http://content.answers.com/main/content/wp/en/9/99/Capillaryelectrophoresis.gif>;
30. 4. 2008.
- [9] Marina M. L., Ríos A., Valcárcel M., Comprehensive Analytical Chemistry, Vol.:
65 – Analysis and detection by capillary electrophoresis, Elsevier B. V.,
Amsterdam, 2005.
- [10] http://www.polymicro.com/products/capillarytubing/products_capillarytubing_tsp_tsg_tsu.htm; 30. 4. 2008.
- [11] Mandrioli R., Fanali S., Pucci V., Raggi M. A., Electrophoresis 2003, 24, 2608-2616.
- [12] Mayer B. X., J. Chromatogr. A 2001, 907, 21-37.
- [13] Dolník V., Úvod do kapilární elektroforézy, Brno, 1994.
- [14] http://www.rsc.org/chemsoc/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/acrobat/complete.pdf; 31. 10. 2007.
- [15] <http://www.chem.agilent.com/temp/radD3225/00000005.PDF>; 9. 5. 2008.
- [16] Urbánek M., Křivánková L., Boček P., Electrophoresis 2003, 24, 466-485.
- [17] <http://www.chem.agilent.com/temp/radEB765/00000071.PDF>; 5. 5. 2008
- [18] <http://www.chem.agilent.com/temp/rad1C3AF/00000073.PDF>; 5. 5. 2008
- [19] Kubáň P., Karlberg B., Anal. Chem. 1998, 70, 360-365.
- [20] Pospíšilová M., Polášek M., Šafra J., Petriška I., J. Chromatogr. A 2007, 1143, 258-263.
- [21] Šolínová V., Kašička V., J. Sep. Sci. 2006, 29, 1743-1762.
- [22] Gaš B., Demjanenko M., Vacík J., J. Chromatogr. 1980, 192, 253-257.

- [23] Zemann A. J., Schnell E., Volgger D., Bonn G. K., *Anal. Chem.* 1998, 70, 563-567.
- [24] da Silva J. A. F., do Lago C. L., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4339-4343.
- [25] Carvalho A. Z., da Silva J. A. F., do Lago C. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 2138-2143.
- [26] Kubáň P., Karlberg B., Kubáň P., Kubáň V., *J. Chromatogr. A* 2002, 964, 227-241.
- [27] Tanyanyiwa J., Hauser P. C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3010-3016.
- [28] Felix F. S., Quintino M. S. M., Carvalho, A. Z., a kol., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40, 1288-1292.
- [29] Zemann A. J., *Trends Anal. Chem.* 2001, 20, 346-354.
- [30] Schmitt-Kopplin Ph., Frommberger M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837-3867.
- [31] Schmitt-Kopplin Ph., Englmann M., *Electrophoresis* 2005, 26, 1209-1220.
- [32] <http://www.chem.agilent.com/Scripts/PDS.asp?IPage=443>; 6. 5. 2008.
- [33] <http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/masspec.GIF>; 5. 5. 2008.
- [34] http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm; 6. 5. 2008.
- [35] Bruin G. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3931-3951.
- [36] Wilke R., Büttgenbach S., *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 19, 149-153.
- [37] Cazes J, *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [38] Dolník V., Liu S., Jovanovich S., *Electrophoresis* 2000, 21, 41-54.
- [39] Baker D. R., *Capillary electrophoresis*, John Wiley & Sons Inc, New York, 1995
- [40] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/gk2x20.gif>; 20. 5. 2008.
- [41] Boyce M. C., Spickett E. A., *J. Agric. Food. Chem.* 1999, 47, 1970-1975.
- [42] Marsh A., Clark B., Broderick M., a kol., *Electrophoresis* 2004, 25, 3970-3980
- [43] Xie Ch., Fu H., Hu J., Zou H., *Electrophoresis* 2004, 25, 4095-4109
- [44] Eeltink, S., Kok W. Th., *Electrophoresis* 2006, 27, 84-96.
- [45] http://www.unimicrotech.com/products_CEC_applicationnote.htm; 7. 5. 2008
- [46] Geiser L, Veuthey J-L, *Electrophoresis* 2007, 28, 45-57.
- [47] Majer J., *Analytická chémie*, Osveta, Martin, 1989.
- [48] Pospíšilová M., Kavalířová A., Polášek M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 72-76.
- [49] Scriba G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 2409-2421.

- [50] Fanali S., An introduction to chiral analysis by capillary electrophoresis, http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_1973.pdf; 6. 6. 2008.
- [51] http://www.kotonline.com/english_pages/ana_basliklar/petry.asp; 24. 5. 2008.
- [52] Stalcup A. M., Gahm K. H., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1360-1368.
- [53] Andersen S., Halvorsen T. G., Pedersen-Bjergaard S. a kol., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 263-273.
- [54] Chankvetadze B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1997.
- [55] Scriba G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 373-399.
- [56] Chiari M., *J. Chromatogr. A* 1998, 805, 1-15.
- [57] Kubáň P., Kubáň P., Kubáň V., *J. Chromatogr. A* 1999, 836, 75-80.
- [58] Chiari M., Dell'Orto N., Casella L., *J. Chromatogr. A* 1996, 745, 93-101.
- [59] Hoffstetter-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H. M., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1541-1547.
- [60] Wang S. P., Huang K. J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 273-279.
- [61] Arce L., Tena M. T., Rios Á., Valcárcel M., *Anal. Chim. Acta* 1998, 359, 27-38.
- [62] Bonoli M., Montanucci. M., Toschi T. G., Lercker G., *J. Chromatogr. A* 2003, 1011, 163-172.
- [63] Bonoli M., Pelillo M., Toshi T. G., Lercker G., *Food Chem.* 2003, 81, 631-638.
- [64] Kodama S., Yamamoto A., Matsunaga A., Yanai H., *Electrophoresis* 2004, 25, 2892-2898.
- [65] Suntornsuk L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 679-698.
- [66] Jáč P., Polášek M., Pospíšilová M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40, 805-814.
- [67] Zhu Q. Y., Zhang A., Tsang D. a kol., *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 4624-4628.
- [68] Zimeri J., Tong C. H., *J. Food Sci.* 1999, 64, 753-758.
- [69] Zenkevich I. G., Eshchenko A. Y, Makarova S. V. a kol., *Molecules* 2007, 12, 654-672.
- [70] Sillén G. L., Martell A. E., *Stability Constants of Metal-Ion Complexes Special Publication No. 17*, The Chemical Society, London, 1964.
- [71] Ramos M. L., Caldeira M. M., Gil V. M. S, *Carbohydr. Res.* 1996, 286, 1-15.
- [72] Ramos M. L., Caldeira M. M., Gil V. M. S., *Carbohydr. Res.* 2000. 329, 387-397.

- [73] Cruywagen J. J., Kruger L., Rohwer E. A., J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1991, 7, 1727-1731.
- [74] Cruywagen J. J., Kruger L., Rohwer E. A., J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1993, 1, 105-109.
- [75] Cruywagen J. J., Rohwer E. A., J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1995, 21, 3433-3438.
- [76] Amin A.S., Moustafa M. E., Dessouki H. A., Abd-Allah A., Quim. Anal. 2001, 20, 93-98.
- [77] Himeno S., Kitazumi I., Takamoto M., Nakashima Y., Talanta 2003, 61, 591-596.
- [78] Altria K., LC GC Europe 2007, April, 194-200.
- [79] Sentellas, S., Saurina J., J. Sep. Sci. 2003, 26, 875-885.
- [80] Design of experiments, Principles and Applications, Umetrics AB, 1999-2000, Umeå, Švédsko, ISBN: 91-973730-0-1.
- [81] Fúmez A. P., Multivariate curve resolution applied to sequential injection data. Analysis of amoxicilin and clavulanic acid, Rovira i Virgili University, Tarragona 2005.
- [82] Süß F., Harang V., van de Griend C., Scriba G. K. E., Electrophoresis 2004, 25, 766-777.
- [83] <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>; 27. 5. 2008.
- [84] European Pharmacopoeia, 6th edition, Council of Europe, Strasbourg, France, 2007.
- [85] The United States Pharmacopoeia 30, The United States Pharmacopoeial convention, Rockville, MD, 2007.
- [86] <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>; 27. 5. 2008.
- [87] Fabre H., Altria K. D., LC-GC Europe 2001, May, 1-5.
- [88] Český lékopis 2005, 1. Díl, Grada Publishing, Praha, 2005.

