

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

**STANOVENÍ MYORELAXANCIÍ ROKURONIA,
VEKURONIA A PANKURONIA METODOU
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S BEZKONTAKTNÍ
VODIVOSTNÍ DETEKČÍ**

Diplomová práce

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

Lenka Böhmová

Děkuji panu doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc., za vedení diplomové práce a poskytnuté cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat také Mgr. Kláře Petrů a PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D., za jejich ochotu a pomoc a ostatním pracovníkům katedry analytické chemie za vstřícný přístup.

Abstrakt

Byla vyvinuta nová metoda kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu. Separace probíhala v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 75 cm a efektivní délce 45 cm. Optimální základní elektrolyt byl 30mM acetátový pufr o pH 5,75 s přidavkem hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu o koncentraci 20 mg/ml. Jako vnitřní standard byl použit fenyltrimethylamonium jodid. Separace probíhala při teplotě 25°C, vkládané napětí bylo 20 kV. Bylo použito hydrodynamické dávkování vzorku při tlaku 50 mbar po dobu 6 s. Za těchto optimálních podmínek byl celkový čas analýzy kratší než 4 minuty. Kalibrační závislost byla pro všechny analyty lineární v rozsahu 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$, korelační koeficienty byly v rozmezí 0,9954 – 0,9983. Limit detekce pro pankuronium bromid byl 13,2 $\mu\text{g/ml}$, pro vekuronium bromid 11,1 $\mu\text{g/ml}$ a pro rokuronium bromid 11,3 $\mu\text{g/ml}$. Správnost byla ověřena metodou standardního přídávku na třech koncentračních hladinách a vyjádřena jako výtěžnost (recovery). Hodnoty výtěžnosti byly v rozmezí 97,21 – 103,52% s RSD = 0,88 – 3,78%. Metoda byla úspěšně aplikována pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu ve farmaceutických přípravcích Pavulon, Norcuron a Esmeron.

Abstract

A new method of capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection for the determination of pancuronium bromide, vecuronium bromide and rocuronium bromide was developed. The separation was carried out in fused-silica capillary with internal diameter 50 μm , total length 75 cm and effective length 45 cm. Optimal background electrolyte was 30mM acetate buffer of pH 5,75 containing 20 mg/ml of hydroxypropyl- γ -cyclodextrin. Phenyltrimethylammonium iodide was used as internal standard. The separation was performed at 25°C, the applied voltage was 20 kV. The samples were injected hydrodynamically at 50 mbar for 6 s. Under such optimal conditions the separation took less than 4 min. Calibration curves were linear for all analytes in the range 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$, the coefficients of correlation were in the range 0,9954 – 0,9983. The limits of detection were 13,2 $\mu\text{g/ml}$, 11,1 $\mu\text{g/ml}$ and 11,3 $\mu\text{g/ml}$ for pancuronium bromide, vecuronium bromide and rocuronium bromide, respectively. The accuracy was tested with the standard addition of known amount of an analyte at three concentration levels and expressed as the recovery. The values of the recovery were in the range 97,21 – 103,52% with RSD = 0,88 – 3,78%. The method was successfully applied to the assay of pancuronium bromide, vecuronium bromide and rocuronium bromide in pharmaceutical preparations Pavulon, Norcuron and Esmeron.

Obsah

OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	9
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
1. ÚVOD	13
2. CÍL PRÁCE	15
3. TEORETICKÁ ČÁST	17
3.1 Kapilární elektroforéza	18
3.1.1 Elektroosmotický tok	18
3.1.2 Elektroforetická pohyblivost (mobilita)	19
3.1.3 Parametry separace	21
3.1.3.2 Účinnost	22
3.1.3.3 Selektivita	22
3.1.3.4 Rozlišení	22
3.1.4 Zařízení pro kapilární elektroforézu – Instrumentální uspořádání	23
3.1.4.1 Separační kapilára	23
3.1.4.2 Zdroj napětí	24
3.1.4.3 Dávkování vzorku	24
3.1.4.4 Detektor	25
3.1.5 Typy kapilární elektroforézy	28
3.1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	28
3.1.5.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)	28
3.1.5.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	29
3.1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)	29
3.1.5.5 Kapilární izotachoforéza (CITP)	29
3.2 Cyklodextriny	30
3.3 Pankuronium, vekuronium a rokuronium	32
3.3.1 Myorelaxancia – mechanismus účinku a použití	32
3.3.2 Struktura analytů	32
3.3.3 Metody stanovení myorelaxancií	34

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1 Používané přístroje	37
4.2 Použité chemikálie	37
4.3 Příprava roztoků	38
4.3.1 Příprava roztoku základního elektrolytu	38
4.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů	38
4.3.3 Příprava zásobních roztoků vnitřních standardů	38
4.3.4 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci	38
4.3.5 Příprava zásobních roztoků přípravků Pavulon, Norcuron a Esmeron	39
4.3.6 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení přesnosti	40
4.3.7 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení správnosti	41
4.4 Optimalizace metody	42
4.1.1 Druh elektrolytového systému	43
4.1.2 Vliv pH	43
4.1.3 Vliv koncentrace HP- γ -CD	43
4.1.4 Výběr vnitřního standardu	44
4.1.5 Vliv koncentrace kyseliny octové	44
4.1.6 Vliv přídavku methanolu	44
4.1.7 Vliv vloženého napětí	45
4.1.8 Vliv pracovní teploty	45
4.5 Postup analýzy	46
4.6 Výpočetní postupy	46
4.6.1 Způsobnost systému	46
4.6.1.1 Počet teoretických pater	47
4.6.1.2 Asymetrie	47
4.6.1.3 Rozlišení	47
4.6.1.4 Opakovatelnost	47
4.6.2 Validace metody	48
4.6.2.1 Kalibrace, stanovení linearit a rozsahu metody	48
4.6.2.2 Stanovení LOD a LOQ	49
4.6.2.3 Mezidenní přesnost	49
4.6.2.4 Správnost	50
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	51
5.1 Optimalizace metody	52
5.1.1 Druh elektrolytového systému	52
5.1.2 Vliv pH	52
5.1.3 Vliv koncentrace HP- γ -CD	53

5.1.4 Výběr vnitřního standardu	54
5.1.5 Vliv koncentrace kyseliny octové	54
5.1.6 Vliv přídavku methanolu	55
5.1.7 Vliv vloženého napětí	56
5.1.8 Vliv pracovní teploty	57
5.1.9 Optimalizace promývání kapiláry	58
5.1.10 Optimální podmínky analýzy	59
5.2 Způsobnost systému	60
5.2.1 Účinnost separace	60
5.2.2 Asymetrie	60
5.2.3 Rozlišení	60
5.2.4 Opakovatelnost	61
5.3 Validace metody	62
5.3.1 Linearita	62
5.3.2 Limit detekce a limit kvantifikace	64
5.3.3 Mezidenní přesnost	65
5.3.4 Správnost	66
5.4 Porovnání s dalšími metodami stanovení myorelaxancí	67
6. ZÁVĚR	68
7. POUŽITÁ LITERATURA	71

Seznam zkratek

BGE	základní elektrolyt
CAD	detekce pomocí nabitého aerosolu
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce
CE	kapilární elektroforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DP	diplomová práce
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ostřelování rychlými atomy
FSCE	kapilární elektroforéza prostého roztoku
GC	plynová chromatografie
HP- γ -CD	hydroxypropyl- γ -cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
IS	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie

PAN	pankuronium bromid
R	zkoumadlo
ROC	rokuronium bromid
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialové a viditelné záření
VEC	vecuronium bromid
VS	odměrný roztok
ZR	zásobní roztok

Seznam tabulek

Tabulka 3. 1 - Porovnání vybraných detekčních metod	26
Tabulka 3. 2 - Srovnání vybraných metod stanovení myorelaxancií	35
Tabulka 4. 1 - Příprava roztoků pro kalibraci.....	39
Tabulka 4. 2 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Pavulon.....	41
Tabulka 4. 3 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Norcuron	42
Tabulka 4. 4 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Esmeron	42
Tabulka 5. 1 – Závislost migračních časů na pH elektrolytu.....	52
Tabulka 5. 2 - Závislost migračních časů na koncentraci HP- γ -CD	53
Tabulka 5. 3 - Závislost migračních časů na koncentraci kyseliny octové	55
Tabulka 5. 4 - Závislost migračních časů na koncentraci methanolu	56
Tabulka 5. 5 - Závislost migračních časů na vloženém napětí.....	57
Tabulka 5. 6 - Závislost migračních časů na pracovní teplotě	58
Tabulka 5. 7 - Hodnoty počtu teoretických pater	60
Tabulka 5. 8 - Hodnoty asymetrie jednotlivých píků.....	60
Tabulka 5. 9 - Rozlišení mezi sousedními píky.....	61
Tabulka 5. 10 - Opakovatelnost migračních časů (n=6)	61
Tabulka 5. 11 - Opakovatelnost poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu (n=6)	61
Tabulka 5. 12 - Opakovatelnost migračních časů (n=18)	62
Tabulka 5. 13 - Opakovatelnost poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu (n=18) ..	62
Tabulka 5. 14 - Limity detekce a kvantifikace jednotlivých analytů	64
Tabulka 5. 15 - Stanovení obsahu pankuronium bromidu v přípravku Pavulon	65
Tabulka 5. 16 - Stanovení obsahu vekuronium bromidu v přípravku Norcuron.....	65
Tabulka 5. 17 - Stanovení obsahu rokuronium bromidu v přípravku Esmeron	65
Tabulka 5. 18 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Pavulon	66
Tabulka 5. 19 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Norcuron	66
Tabulka 5. 20 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Esmeron	66

Seznam obrázků

Obrázek 3. 1 - Difúzní dvojrstva kationtů a vznik elektroosmotického toku.....	19
Obrázek 3. 2 - Pořadí migrace látek při elektroforéze a průtokové rychlosti	21
Obrázek 3. 3 - Schematické znázornění zařízení pro kapilární elektroforézu	23
Obrázek 3. 4 - Uspořádání bubble cell (a) a Z-cell (b)	26
Obrázek 3. 5 - Struktura α -, β - a γ -cyklodextrinu	31
Obrázek 3. 6 - Schematické znázornění funkce sugammadexu	31
Obrázek 3. 7 - Struktura pankuronium bromidu	33
Obrázek 3. 8 - Struktura vekuronium bromidu	33
Obrázek 3. 9 - Struktura rokuronium bromidu	34
Obrázek 5. 1 - Graf závislosti migračních časů na pH elektrolytu	53
Obrázek 5. 2 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci HP- γ -CD	54
Obrázek 5. 3 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci kyseliny octové.....	55
Obrázek 5. 4 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci methanolu	56
Obrázek 5. 5 - Graf závislosti migračních časů na vloženém napětí.....	57
Obrázek 5. 6 - Graf závislosti migračních časů na pracovní teplotě.....	58
Obrázek 5. 7 - Elektroforeogram směsi pankuronium bromidu (1), vekuronium bromidu (2) a rokuronium bromidu (3) s vnitřním standardem (IS) za optimálních podmínek	59
Obrázek 5. 8 - Kalibrační závislost pankuronium bromidu.....	63
Obrázek 5. 9 - Kalibrační závislost vekuronium bromidu	63
Obrázek 5. 10 - Kalibrační závislost rokuronium bromidu	64

1. Úvod

Úvod

Rozvoj farmaceutického průmyslu a neustálý nárůst množství nových léčivých látek s sebou přináší nutnost tyto látky analyzovat. Navíc v poslední době jsou kladeny stále větší požadavky na jakost a bezpečnost léčiv, a proto je třeba mít k dispozici takové analytické metody, které by umožnily přesné stanovení nejen samotných léčivých látek, ale také látek příbuzných, které se mohou v přípravcích vyskytovat jako nečistoty.

Kapilární elektroforéza je jednou z takových moderních separačních metod, které umožňují rozlišení a přesné stanovení i velmi podobných látek. Existuje řada metod kapilární elektroforézy založených na různých mechanismech separace a s tím souvisí velmi široké možnosti jejího využití. Kapilární elektroforéza je použitelná pro separaci aminokyselin, chirálních látek, vitamínů, pesticidů, anorganických iontů, organických kyselin, barviv, surfaktantů, peptidů a proteinů, oligonukleotidů a fragmentů DNA a dokonce celých buněk a virových částic. Kromě toho výhodou kapilární elektroforézy je i potřeba minimálního množství vzorku pro analýzu a malé množství produkovaných organických odpadů. [1]

2. Cíl práce

Cíl práce

Tato práce navazuje na DP z roku 2011, ve které byla vyvinuta metoda CZE s bezkontaktní vodivostní detekcí pro separaci a stanovení pankuronium bromidu a vekuronium bromidu. [2] Cílem práce bylo vyvinout metodu kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí, která by umožnila separaci a stanovení nejen pankuronium bromidu a vekuronium bromidu, ale i rokuronium bromidu, a po optimalizaci a validaci ji použít pro stanovení obsahu těchto analytů v injekčních přípravcích Pavulon, Norcuron a Esmeron.

3. Teoretická část

3.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je fyzikální analytická metoda založená na migraci elektricky nabitých stanovovaných látek rozpuštěných v roztoku elektrolytu kapilárou vlivem stejnosměrného elektrického pole. [3]

Základními principy elektromigračních metod jsou elektroforéza, pohyb nabitých částic v roztoku pod vlivem elektrického pole směrem k opačně nabitým elektrodám, a elektroosmóza, pohyb celého objemu pufru působením elektrického pole směrem k negativní elektrodě. [4]

Kapilární elektroforéza je univerzální metodou zahrnující několik různých technik separace, které se navzájem doplňují:

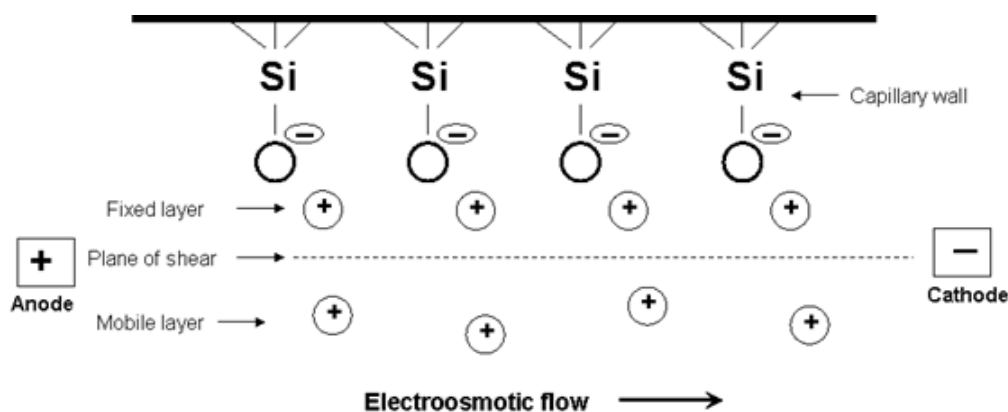
- Kapilární zónová elektroforéza
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
- Kapilární gelová elektroforéza
- Kapilární izoelektrická fokusace
- Kapilární izotachoforéza

3.1.1 Elektroosmotický tok

Při elektroforéze se kapilárou obvykle nepohybují pouze rozpuštěné látky, ale celý objem pufru. To je způsobeno jevem, který se nazývá elektroosmotický tok.

Po naplnění pufru do křemenné kapiláry dochází k ionizaci povrchových silanolových skupin z SiOH na SiO^- , takže povrch kapiláry získává záporný náboj. Ionizace povrchu kapiláry může být zesílena prvním promytím kapiláry bazickým roztokem, čehož se využívá při kondicionaci kapilár roztokem KOH nebo NaOH . Negativně nabitě skupiny na stěně kapiláry přitahují kationty z roztoku, které vytvářejí tzv. vnitřní fixní vrstvu. Kationty ve vnitřní vrstvě ovšem nestačí neutralizovat veškerý negativní náboj, a proto se vytváří ještě druhá, mobilní vrstva kationtů, která už ale kvůli své větší vzdálenosti od stěny není pevně držena. Fixní a mobilní vrstva dohromady vytváří difúzní dvojvrstvu kationtů.

Aplikujeme-li elektrické pole, mobilní vrstva kationtů se začne pohybovat směrem ke katodě a zároveň s ní i celý objem pufru.



Obrázek 3. 1 - Difúzní dvojvrstva kationtů a vznik elektroosmotického toku [4]

Mezi dvěma vrstvami vzniká rozdíl potenciálů, tzv. zéta potenciál, ζ . Elektroosmotický tok je úměrný zéta potenciálu a jeho průtoková rychlost v_{EOF} je dána jako

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

kde ε je dielektrická konstanta pufru, ζ je zéta potenciál, E je aplikované elektrické pole a η je viskozita pufru.

Lze vyjádřit také elektroosmotickou mobilitu pufru, μ_{EOF} , která je dána jako

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

Elektroosmotická mobilita, na rozdíl od průtokové rychlosti elektroosmotického toku, nezávisí na aplikovaném elektrickém poli, ale pouze na charakteristikách pufru. [4]

3.1.2 Elektroforetická pohyblivost (mobilita)

V elektrickém poli se každá volná částice s elektrickým nábojem pohybuje ve směru, který závisí na znaménku jejího náboje a na orientaci elektrického pole. Rychlost tohoto pohybu, tzv. elektroforetickou průtokovou rychlost v_{EP} , lze vyjádřit jako

$$v_{\text{EP}} = \mu_{\text{EP}} E$$

kde μ_{EP} je elektroforetická mobilita a E je aplikované elektrické pole.

Elektroforetická pohyblivost je analogická k elektroosmotické pohyblivosti a lze ji vyjádřit jako

$$\mu_{\text{EP}} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

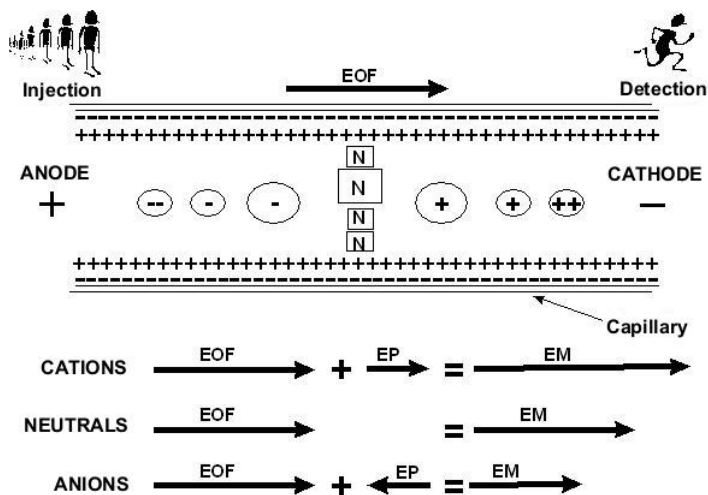
kde q je náboj ionizované rozpuštěné látky, η je viskozita pufru a r je poloměr částic rozpuštěné látky. Elektroforetická pohyblivost závisí i na tvaru iontu, ale ten lze zanedbat a předpokládat, že mají ionty sférický tvar.

Elektroforetická pohyblivost je tedy tím vyšší, čím vyšší je poměr náboje k velikosti daného iontu. Z toho tedy vyplývá, že nejrychleji se v elektrickém poli pohybují malé, vysoce nabitě částice, naopak pomaleji se pohybují částice velké a s nižším nábojem. Neutrální molekuly bez náboje mají elektroforetickou pohyblivost nulovou.

Pokud by se tedy látky během elektroforézy pohybovaly pouze vlivem své elektroforetické pohyblivosti, při tradičním uspořádání (tj. detektor na straně katody) by kapilárou procházely pouze kationty, kdežto neutrální látky by zůstávaly v bodě injekce a anionty by migrovaly zpět do zdrojové vialky. Při provedení kapilární elektroforézy ovšem kapilárou migrují všechny částice, kationty, anionty i neutrální molekuly. To je způsobeno tím, že na pohybu částic kapilárou se podílí jak jejich vlastní elektroforetická mobilita, tak i elektroosmotická mobilita pufru. Pozorovaná průtoková rychlost, v , je součtem průtokové rychlosti elektroosmotického toku a vlastní elektroforetické průtokové rychlosti částice.

$$v = v_{\text{EOF}} + v_{\text{EP}}$$

To znamená, že při klasické kapilární elektroforéze, kdy je detektor na katodové straně kapiláry a elektroosmotický tok má směr od anody ke katodě, budou pozorované průtokové rychlosti aniontů menší než elektroosmotická průtoková rychlost, protože anionty migrují proti elektroosmotickému toku směrem k anodě, průtoková rychlost neutrálních látek bude rovna rychlosti elektroosmotického toku a pozorované průtokové rychlosti kationtů budou vyšší než elektroosmotická průtoková rychlost, protože kationty se pohybují stejným směrem jako elektroosmotický tok. Protože elektroforetické rychlosti částic jsou obvykle menší než rychlost elektroosmotického toku, pohybují se všechny částice včetně aniontů kapilárou směrem ke katodě. Výsledné pořadí migrace je tedy kationty, neutrální látky, anionty. Přitom jako první migrují malé, vysoce nabitě kationty, poté větší kationty s nižším nábojem, následují nerozdělené neutrální látky spolu s elektroosmotickým tokem, po nich větší, méně nabitě anionty a jako poslední prochází kapilárou malé anionty s vysokým nábojem. [4]



Obrázek 3. 2 - Pořadí migrace látek při elektroforéze a průtokové rychlosti [5]

3.1.3 Parametry separace

Mezi parametry elektroforetické separace patří čas, účinnost (efektivita), selektivita a rozlišení. [4]

3.1.3.1 Čas

Migrační čas analytu, t_m , je čas potřebný k průchodu efektivní délkou kapiláry l a lze jej vyjádřit jako $t_m = l/v$, kde v je průtoková rychlost daného analytu. Postupným dosazením můžeme závislost pro migrační čas vyjádřit ve tvaru

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{EP} + \mu_{EOF})V}$$

kde l je efektivní délka kapiláry, L celková délka kapiláry, μ_{EP} je elektroforetická pohyblivost analytu, μ_{EOF} elektroosmotická pohyblivost a V aplikované napětí. Z tohoto vztahu vyplývá, že při použití kratších kapilár, vložení vyššího napětí a při vyšším elektroosmotickém toku budou kratší migrační časy jednotlivých analytů a tím i kratší celkový čas analýzy. [4]

3.1.3.2 Účinnost

Účinnost separace je vyjádřena jako počet teoretických pater N pomocí migračního času t_m a šířky píku:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

Šířku píku lze měřit u jeho základny (w) nebo v polovině výšky píku ($w_{1/2}$). Lékopisné je vyjádření účinnosti pomocí $w_{1/2}$. Z rovnice je vidět, že čím užší je pík a čím delší je jeho migrační čas, tím vyšší je účinnost separace. Účinnost také stoupá s rostoucím elektroosmotickým tokem a napětím. Na rozdíl od chromatografie je účinnost nezávislá na délce kapiláry. [3, 4]

3.1.3.3 Selektivita

Selektivita souvisí se vzdáleností sousedních analytů při průchodu detektorem, tj. vzdáleností mezi vrcholy sousedních píků na elektroforeogramu. Selektivita α je dána jako

$$\alpha = \frac{t_2 - t_{nm}}{t_1 - t_{nm}}$$

kde t_1 a t_2 jsou migrační časy sousedních píků a t_{nm} je migrační čas neutrálního markeru. Selektivitu lze také vyjádřit pomocí pohyblivostí sousedních analytů ve tvaru

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} * \text{konst.}$$

Z této rovnice je patrné, že selektivita závisí na rozdílech v elektroforetické pohyblivosti analytů. Selektivitu lze nejlépe zvýšit optimalizací složení a pH pufru. [4]

3.1.3.4 Rozlišení

Hlavním parametrem separace je rozlišení, které udává, jak dobře jsou jednotlivé analyty separované. Rozlišení R lze vypočítat podle vztahu

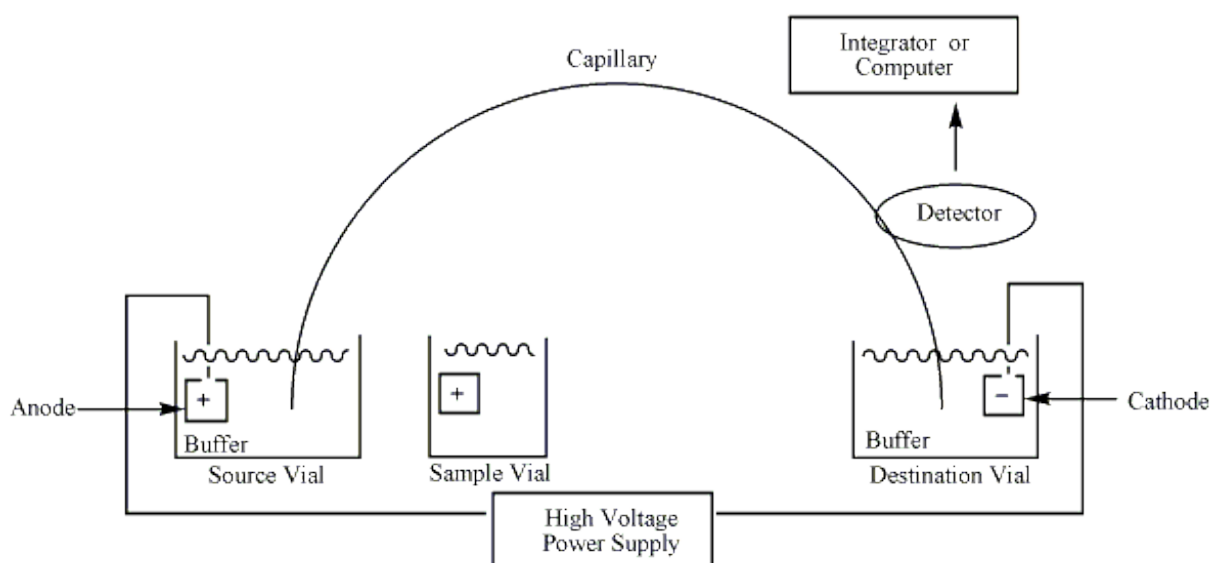
$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{(w_{1/2})_1 + (w_{1/2})_2}$$

kde t_1 a t_2 jsou migrační časy dvou po sobě následujících píků, w_1 a w_2 jsou jejich šířky při základní linii a $(w_{1/2})_1$ a $(w_{1/2})_2$ šířky v polovině výšky. Lékopisné je vyjádření rozlišení pomocí

$w_{1/2}$. Rozlišení se zvyšuje s růstem aplikovaného napětí, rostoucí délkou kapiláry a optimalizací složení a pH pufru. [3, 4]

3.1.4 Zařízení pro kapilární elektroforézu – Instrumentální uspořádání

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá z těchto základních částí: separační kapilára, počáteční a cílová vialka, vialka se vzorkem, zdroj vysokého napětí, detektor a zařízení pro záznam signálu a manipulaci (počítač). Při elektroforéze je počáteční vialka, kapilára i cílová vialka naplněna základním elektrolytem, poté je na počátek kapiláry nadávkován vzorek, vstupní otvor kapiláry je umístěn zpět do zdrojové vialky a mezi oba konce kapiláry je aplikováno elektrické pole. Pod jeho vlivem migrují látky kapilárou a jsou zaznamenány detektorem. Data z detektoru jsou poté zpracována počítačem, který slouží zároveň k ovládní celého elektroforetického systému. [4]



Obrázek 3. 3 - Schematické znázornění zařízení pro kapilární elektroforézu [6]

3.1.4.1 Separační kapilára

Pro kapilární elektroforézu se nejčastěji používají křemenné kapiláry, ale mohou být použity i kapiláry z jiných materiálů, např. teflonové nebo skleněné. Při použití teflonové kapiláry se na rozdíl od kapiláry křemenné při separaci neuplatňuje elektroosmotický tok. Vnitřní průměr bývá obvykle v rozmezí 50 – 75 μm , typický vnější průměr je 375 μm , celková délka kapiláry se většinou pohybuje mezi 30 – 100 cm, efektivní délka je vždy o něco kratší. Z důvodu lepší

mechanické odolnosti a tím snadnější manipulace se kapiláry potahují ochranným pláštěm z polyimidu. Křemenné kapiláry jsou transparentní pro UV záření, proto může být kapilára přímo použita k UV-detekci. Před zavedením kapiláry do detektoru je ovšem třeba odstranit ochrannou polyimidovou vrstvu, např. vypálením. Kapiláry mohou být chlazené, aby rychleji odváděly teplo. Konce kapiláry jsou umístěny do dvou vialek, které jsou naplněny stejným pufrem jako kapilára. [4, 7]

3.1.4.2 Zdroj napětí

Zdroj napětí slouží k vytvoření elektrického pole napříč kapilárou. Používají se vysokonapěťové zdroje o rozsahu 0 – 30 kV a 0 – 300 mA. Zdroje mohou poskytovat konstantní napětí nebo konstantní proud v závislosti na používané metodě, nejčastější je použití konstantního napětí.

Ve většině případů se anoda nachází u vstupu do kapiláry a katoda u výstupu a analyty migrují směrem ke katodě. Pokud je obrácený směr migrace, je třeba změnit i polaritu elektrického pole, aby se analyty nevracely zpět do vstupní vialky a procházely kapilárou. V takovém případě je u vstupu do kapiláry umístěna katoda a u výstupu anoda. [4, 7]

3.1.4.3 Dávkování vzorku

V kapilární elektroforéze se obvykle dávkuje velmi malá množství vzorku, řádově několik nanolitrů. Dávkování se provádí umístěním vstupního otvoru kapiláry do vialky se vzorkem. Existuje několik různých technik dávkování vzorku, nejběžnější je dávkování hydrodynamické nebo elektrokinetické. Pro dávkování se dnes již v naprosté většině přístrojů používají autosamplery, v nichž je umístěno větší množství vialek a vzorky jsou z nich dávkovány automaticky. [4]

Hydrodynamické dávkování

Hydrodynamické dávkování vzorku je nejrozšířenější metodou. Může být provedeno několika různými způsoby. Nejjednodušší je dávkování s využitím sifonového efektu, který spočívá v prostém zvednutí vialky se vzorkem, ve které je ponořen počátek kapiláry, takže dojde k nasátí vzorku do kapiláry. Tato metoda ovšem nemá příliš dobrou reprodukovatelnost, proto je její použití méně časté. Obvyklejší je dávkování pomocí vytvoření tlakového gradientu, toho lze dosáhnout buď aplikací tlaku na vstupu do kapiláry, nebo naopak aplikací vakua na jejím výstupu. Typické je použití tlaků v rozmezí 25 – 100 mbar po dobu 0,5 – 5 s. Reprodukovatelnost nadávkovaného objemu je zde lepší než 1%. Tento objem V_{inj} závisí na rozměrech kapiláry,

viskozitě pufru, aplikovaném tlaku a čase a lze jej vypočítat s použitím Hagen-Poiseuilleovy rovnice:

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta l}$$

kde ΔP je tlakový gradient na kapiláře, d je vnitřní průměr kapiláry, t_{inj} je doba nástřiku, η je viskozita pufru a l je celková délka kapiláry. [1, 7]

Elektrokinetické dávkování

Elektrokinetické (nebo také elektromigrační) dávkování vzorku se provádí ponořením počátku kapiláry do vialky se vzorkem a aplikací napětí. Obvykle se používají hodnoty napětí cca 3 – 5krát nižší než pracovní napětí po dobu 10 – 30 s. Jednotlivé složky vzorku v tomto případě migrují do kapiláry na základě elektroosmotického toku i svých vlastních elektroforetických pohyblivostí, proto se jejich koncentrace v kapiláře mohou lišit od koncentrací v původním vzorku. Tento způsob dávkování je využíván zejména pro kapilární gelovou elektroforézu, kde je hydrodynamické dávkování nevhodné. [4]

3.1.4.4 Detektor

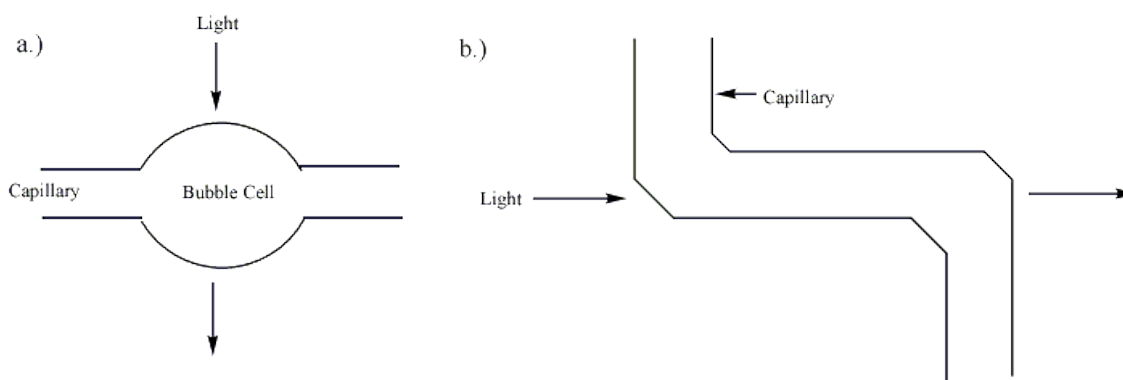
Při kapilární elektroforéze je obvyklé použití tzv. on line detekce, kdy je analyt detekován přímo v kapiláře. Méně častá je derivatizace vzorku po průchodu kapilárou a jeho následná detekce. Vzhledem k malým rozměrům kapiláry je detekce důležitým bodem analýzy, který velmi významně ovlivňuje získané výsledky. Pro detekci v kapilární elektroforéze se používá řada různých metod, z nichž nejběžnější je UV-VIS detekce. Dalšími metodami jsou např. fluorescence, laserem indukovaná fluorescence, amperometrie, konduktometrie, hmotnostní spektrometrie nebo metody nepřímé detekce. Citlivost vybraných detekčních metod, jejich výhody a nevýhody jsou porovnány v tabulce 3.1. [1, 7]

Tabulka 3. 1 - Porovnání vybraných detekčních metod [1]

Metoda	LOD (mol/l)	Min. detekovatelné množství (mol)	Výhody a nevýhody
UV-VIS spektrofotometrie	$10^{-5} - 10^{-7}$	$10^{-12} - 10^{-15}$	Univerzální, informace o spektru
Fluorescence	$10^{-7} - 10^{-9}$	$10^{-15} - 10^{-17}$	Citlivá, většinou nutná derivatizace
Laserem indukovaná fluorescence (LIF)	$10^{-9} - 10^{-12}$	$10^{-18} - 10^{-20}$	Velmi citlivá, většinou nutná derivatizace, drahá
Amperometrie	$10^{-10} - 10^{-11}$	$10^{-18} - 10^{-19}$	Citlivá, selektivní, pouze pro elektricky aktivní analyty
Konduktometrie	$10^{-6} - 10^{-7}$	$10^{-15} - 10^{-16}$	Univerzální
Hmotnostní spektrometrie (MS)	$10^{-8} - 10^{-9}$	$10^{-16} - 10^{-17}$	Citlivá, informace o struktuře, komplikované spojení CE a MS
Nepřímé metody	10 – 100krát nižší než přímé metody	–	Univerzální, nižší citlivost než přímé metody

UV-VIS spektrofotometrie

Velké množství analytů charakteristicky absorbuje záření v UV oblasti, proto je tato metoda nejrozšířenějším typem detekce. Je použitelná pro kvantitativní i kvalitativní analýzu, protože při použití detektoru s diodovým polem lze pro každý pík získat zároveň jeho absorpční spektrum. Vzhledem k malému průměru kapiláry, který je při kapilární elektroforéze žádoucí z důvodu vyšší účinnosti separace, je UV detekce méně citlivá. Zvýšení citlivosti detekce lze dosáhnout prodloužením dráhy průchodu UV záření kapilárou při použití modifikovaných detekčních cel, tzv. „bubble cell“ nebo „Z-cell“. V případě „bubble cell“ je kapilára v místě detekčního okna několikanásobně rozšířena, čímž se prodlouží optická dráha a zvýší citlivost. Princip „Z-cell“ spočívá v ohnutí kapiláry v místě detekčního okna do tvaru písmene Z tak, že záření neprochází kapilárou kolmo, ale podélně. Tím lze dosáhnout ještě výraznějšího prodloužení optické dráhy a zvýšení citlivosti detekce. [1, 7]



Obrázek 3. 4 - Uspořádání bubble cell (a) a Z-cell (b) [6]

Pro látky, které nevykazují absorpci v UV oblasti, lze použít nepřímou UV detekci, kdy pracovní elektrolyt obsahuje ion absorbující UV záření (např. kreatinin, salicylát). Při průchodu neabsorbujícího analytu detekční celou dochází k poklesu absorpce a na elektroforeogramu se objeví negativní pík. [7]

Laserem indukovaná fluorescence (LIF)

Jedná se o nejcitlivější detekční metodu. Jen málo látek má v molekule vlastní fluorofor, proto je často před vlastní analýzou nutná derivatizace pomocí fluorescenčních činidel, např. dansylchloridu, fluoresceinisothiokyanátu nebo fluoreskaminu. Je možná také nepřímá fluorescenční detekce, kdy je v základním elektrolytu přidán fluoreskující ion, např. salicylát nebo chinin, průchod zóny analytu detektorem se pak projeví poklesem fluorescence a negativním píkem. [7]

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Výhodou této detekční metody je skutečnost, že umožňuje získat pro každý pík jeho hmotnostní spektrum, což napomáhá jeho identifikaci. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie je založena na migraci iontů ve vakuu. MS detektor může být s kapilární elektroforézou spojen různými způsoby, např. pomocí ionizace elektrosprejem (ESI) nebo pomocí ostřelování rychlými atomy (FAB). [7]

Bezkontaktní vodivostní detekce (CCD)

Bezkontaktní vodivostní detekce je univerzální detekční metodou použitelnou pro všechny typy analytů. Vhodná je zejména pro látky, které se obtížně detekují jinými metodami, např. malé anorganické kationty a anionty, ale i další analyty neabsorbující UV záření. Bezkontaktní vodivostní detektor je tvořen dvěma trubicovitými elektrodami z nerezové oceli, které jsou umístěny za sebou okolo kapiláry, mezi nimi je malá štěrbinu, která funguje jako rezistor. Při průchodu zóny analytu touto štěrbinou dochází ke změně vodivosti (převrácená hodnota odporu), která je registrována jako analytický signál. [1]

3.1.5 Typy kapilární elektroforézy

3.1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je také označována jako kapilární elektroforéza prostého roztoku (FSCE). Jedná se o základní, nejčastěji používanou elektroforetickou metodu. Je pro ni charakteristické použití jediného pracovního elektrolytu, jímž je naplněna celá kapilára i počáteční a koncová vialka. V celé separační kapiláře je konstantní elektrické pole. Při separaci pomocí CZE je vzorek injikován do kapiláry naplněné pufrům a po aplikaci napětí jednotlivé látky migrují kapilárou jako zóny. Při klasickém uspořádání unáší elektroosmotický tok rozpuštěné látky směrem od anody ke katodě. Při kapilární zónové elektroforéze je možná separace různě nabitých látek v průběhu jedné analýzy na základě jejich elektroforetických pohyblivostí. V jednom kroku lze od sebe oddělit různé kationty i anionty v závislosti na poměru jejich náboje k velikosti. Neutrální látky zůstávají při kapilární zónové elektroforéze nerozděleny. [4, 7]

3.1.5.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie je elektroforetickou technikou, která může být na rozdíl od ostatních použita i pro separace neutrálních látek. Provedením se neliší od klasické kapilární zónové elektroforézy, rozdíl spočívá v přidavku povrchově aktivní látky do základního elektrolytu. Surfactant musí být v pufru přítomen alespoň v kritické micelární koncentraci, aby docházelo k samovolné tvorbě micel. Micely mají sférický tvar, na jejich povrchu jsou orientovány polární hydrofilní konce molekul tenzidu, hydrofobní konce míří směrem do vnitřku micely. Molekuly analytu vstupují do micel v množství, které lze vyjádřit pomocí rozdělovacího koeficientu K . Pokud analyt do micel vůbec nevstupuje, je $K = 0$, pokud je přítomen pouze v micelách, $K = \infty$. Separace analytů závisí na jejich rozdělení mezi mobilní a pseudostacionární fázi (micely). Jako surfaktant se v MEKC používá nejčastěji anionaktivní docecylsírán sodný (SDS), dalšími používanými anionaktivními tenzidy jsou žlučové kyseliny. Z kationaktivních tenzidů lze použít např. cetyltrimethylamonium bromid, dodecyltrimethylamonium bromid nebo karbethodecinium bromid (Septonex). Je-li třeba snížit migrační rychlost micel, lze použít i neionogenní tenzidy. [1, 7]

3.1.5.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Kapilární gelová elektroforéza funguje na stejném principu jako klasická gelová elektroforéza. Tato metoda se používá pro separace makromolekul, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. Nabité látky migrují pod vlivem elektrického pole kapilárou skrz síť tvořenou polymerem a jsou zadržovány, přičemž nejvíce jsou brzděny největší molekuly. To způsobí, že se molekuly separují podle své velikosti. Kapilární formát má proti klasické elektroforéze určité výhody, např. možnost použití mnohonásobně vyšších hodnot napětí, aniž by docházelo k nadměrnému zahřívání vlivem Jouleho tepla, protože vznikající teplo může být v kapiláře efektivněji odváděno. Další velkou výhodou je možnost automatické detekce v kapiláře. V kapilární gelové elektroforéze se používají různé typy gelů, nejčastěji polyakrylamidový nebo agarózový, ale použít lze i roztoky jiných polymerů – např. hydroxyalkylcelulózy, polyvinylalkoholu nebo dextranu. [1]

3.1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Kapilární izoelektrická fokusace je separační metoda vhodná pro analýzu směsí amfolytů (nejčastěji proteinů nebo peptidů) na základě jejich rozdílného izoelektrického bodu, pI. Analýza probíhá v kapiláře, kde je vytvořen gradient pH. Po aplikaci elektrického pole napříč kapilárou migrují jednotlivé amfolyty mezi katodou a anodou do místa svého pI a tak vytvoří pH gradient. V tomto gradientu analyty doputují do svého izoelektrického bodu, kde se jejich kladný a záporný náboj vyrovnají a zůstanou navenek bez náboje. Proto je zde jejich elektroforetická pohyblivost nulová, a tak se již dále nepohybují a zakoncentrovávají se v úzké zóně. Když jsou analyty rozděleny, přestává procházet elektrický proud. Poté je třeba separované proteiny mobilizovat. To může být provedeno např. pomocí hydrodynamického tlaku nebo přidáním soli do jedné z vlněk. [1, 7]

3.1.5.5 Kapilární izotachoforéza (CITP)

Touto metodou lze během jedné analýzy separovat buď pouze kationty, nebo pouze anionty. Při kapilární izotachoforéze se na rozdíl od ostatních metod používají dva elektrolyty – vedoucí a koncový. Vedoucí elektrolyt obsahuje ion, jehož efektivní pohyblivost je větší než pohyblivost všech analytů, koncový elektrolyt naopak obsahuje ion s nejnižší pohyblivostí. Vzorek se dává na rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu. Po aplikaci elektrického pole se začíná zóna vzorku pohybovat a mezi vedoucím a koncovým elektrolytem se vytvářejí zóny jednotlivých analytů v pořadí podle jejich pohyblivosti. Všemi zónami prochází stejný proud, a proto směrem od vedoucího iontu ke koncovému vzrůstá elektrické pole. S tím souvisí tzv.

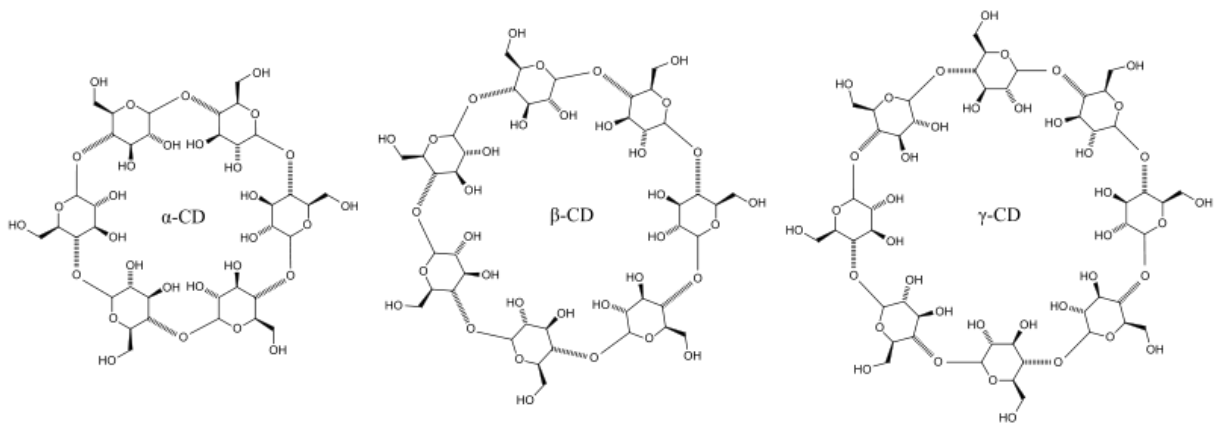
samozaostřující efekt, což znamená, že vstoupí-li ion vlivem difúze do sousední zóny, následkem rozdílné intenzity elektrického pole se změní jeho migrační rychlost a ion se opět vrací do „své“ zóny. V ustáleném stavu se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí. Při izotachofóze nezávisí koncentrace analytů v jednotlivých zónách na jejich původní koncentraci ve vzorku, ale pouze na koncentraci vedoucího iontu ve vedoucí zóně a na pohyblivostech jednotlivých iontů. Proto je izotachofóza často využívána pro zakoncentrování vzorků před analýzou pomocí jiných typů kapilární elektroforézy. [1, 7]

3.2 Cyklodextriny

Široké uplatnění v separačních metodách nacházejí v poslední době cyklodextriny. Tyto látky byly poprvé izolovány roku 1891, jejich cyklická struktura byla ovšem objasněna až o 45 let později. Jedná se o cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek spojených vazbami typu α -1,4. Vznikají enzymatickou degradací škrobu bakteriálními glukosyltransferázami druhu *Bacillus macerans*. [7, 8]

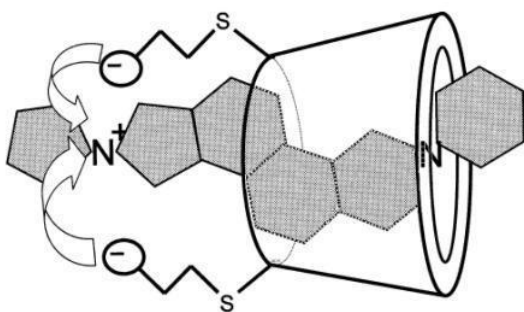
Makrocykly cyklodextrinů mají tvar dutého kornoutu, na jehož vnějšku jsou orientovány hydroxylové skupiny a dovnitř dutiny kyslíkové atomy etherových skupin a atomy vodíku. Z tohoto důvodu je vnějšek molekuly hydrofilní a vnitřek kavity má lipofilní charakter. S tím souvisí také schopnost cyklodextrinů tvořit inkluzní komplexy. Do kavity cyklodextrinu (hostitel) mohou být inkludovány organické i anorganické molekuly (host). Tvorba komplexů se úspěšně využívá v řadě oborů, kromě již zmíněného použití v separačních metodách, kde mají cyklodextriny uplatnění jako chirální fáze pro plynovou a kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu, je lze použít také ve farmaceutickém průmyslu pro zvýšení biodostupnosti léčiv, v potravinářství pro stabilizaci chuťových a vonných přísad nebo v kosmetickém průmyslu. Důležitou roli zde hraje také fakt, že jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů (škrub), jejich toxicita je nízká a jsou biologicky degradabilní. [8]

Hlavními zástupci nativních cyklodextrinů jsou α -cyklodextrin (6 glukózových jednotek), β -cyklodextrin (7 glukózových jednotek) a γ -cyklodextrin (8 glukózových jednotek), ale používají se i další, chemicky modifikované cyklodextriny. Chemickou modifikací je možné cíleně měnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, zejména rozpustnost a komplexační vlastnosti. Tak např. per(6-deoxy-per-6-karboxyethylsulfanyl)- γ -cyklodextrin tvoří s rokuronium bromidem vůbec nejstabilnější známý inkluzní komplex. [8]



Obrázek 3. 5 - Struktura α -, β - a γ -cyklodextrinu [9]

Příkladem praktického využití cyklodextrinů je sugammadex, účinná látka obsažená v léčivém přípravku Bridion. Jedná se o modifikovaný γ -cyklodextrin, jehož efekt spočívá v selektivní tvorbě pevných komplexů se steroidními myorelaxancii. Nejsilnější komplexační účinek má sugammadex na rokuronium, slabší na vekuronium a nejslabší na pankuronium. Jeho terapeutickou indikací je zrušení neuromuskulární blokády způsobené rokuroniem nebo vekuroniem. Během této blokády vede intravenózní aplikace sugammadexu k rychlému odstranění molekul myorelaxancia z plazmy a následně také k jejich difúzi z nervosvalové ploténky do plazmy ve směru koncentračního gradientu, kde jsou enkapsulovány volnými molekulami sugammadexu. Kromě toho některé molekuly sugammadexu vstupují i do tkání a vytváří komplex přímo tam. To vše vede k rychlému ukončení neuromuskulární blokády. Navíc sugammadex působí pouze jako vazebná látka, je biologicky inaktivní a ukázal se jako bezpečné a dobře tolerované léčivo. Klinické studie ukazují, že přispěje ke zvýšení bezpečnosti a ke snížení výskytu reziduální blokády při užití steroidních myorelaxancií. [10]



Obrázek 3. 6 - Schematické znázornění funkce sugammadexu [11]

3.3 Pankuronium, vekuronium a rokuronium

Pankuronium, vekuronium a rokuronium patří mezi periferní nedepolarizující (kompetitivní) myorelaxancia. Jedná se o látky se steroidní strukturou, které ve své molekule obsahují androstanový skelet. Tyto látky mají strukturu podobnou acetylcholinu, jsou to kvartérní amoniové sloučeniny, které velmi špatně procházejí membránami a musí být proto podávány intravenózně. [12]

3.3.1 Myorelaxancia – mechanismus účinku a použití

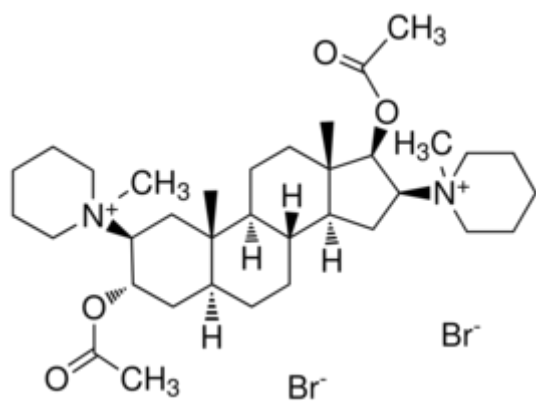
Mechanismus účinku nedepolarizujících periferních myorelaxancií spočívá v obsazení nikotinových N_M receptorů v nervosvalové štěrbině, kde působí jako kompetitivní antagonisté acetylcholinu. Je-li takto obsazeno alespoň 70 – 80% N_M receptorů, dochází k nervosvalové blokádě a je znemožněno vyvolání svalové kontrakce uvolněním acetylcholinu do nervosvalové štěrbiny. Účinek těchto látek může být zmírněn podáním inhibitorů acetylcholinesterázy (např. neostigmin, pyridostigmin). Jejich působením dochází k nahromadění endogenního acetylcholinu na nervosvalové ploténce, ten poté kompetuje s nedepolarizujícím myorelaxanciem o N_M receptory a vytěsňuje ho. Inhibitory acetylcholinesterázy tedy působí jako antidota při předávkování nedepolarizujícími myorelaxancii. [12]

Léčivé přípravky Pavulon (účinná látka pankuronium bromid), Norcuron (účinná látka vekuronium bromid) a Esmeron (účinná látka rokuronium bromid) se používají jako pomocná léčiva při celkové anestezii k usnadnění tracheální intubace a k zajištění relaxace kosterního svalstva v průběhu chirurgických zákroků, přípravek Esmeron také k usnadnění intubace a umělé plicní ventilace na jednotkách intenzivní péče. [13, 14, 15]

3.3.2 Struktura analytů

Pankuronium bromid

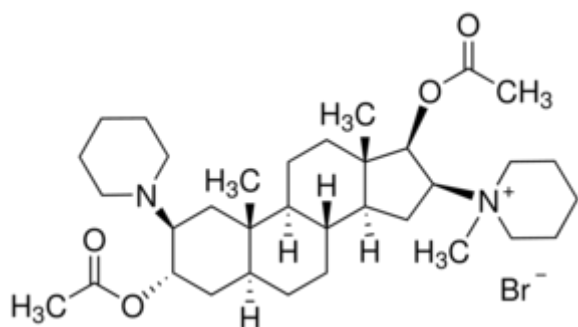
Chemicky se jedná o 1,1'-[3 α ,17 β -bis(acetyloxy)-5 α -androstan-2 β ,16 β -diyl]bis(1-methylpiperidin-1-ium)-dibromid. Sumární vzorec je $C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$, relativní molekulová hmotnost $M_r = 732,68$. [3]



Obrázek 3. 7 - Struktura pankuronium bromidu

Vekuronium bromid

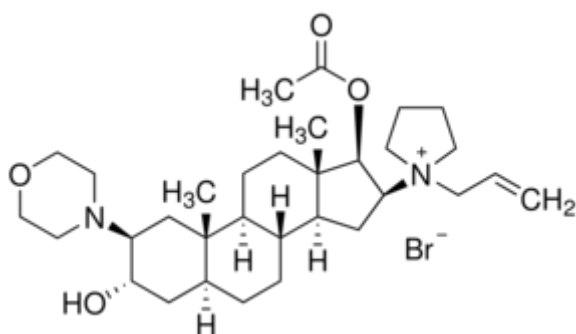
Chemicky se jedná o 1-[3 α ,17 β -diacetoxy-2 β (piperidin-1-yl)-5 α -androstan-16 β -yl]-1-methylpiperidin-1-ium-bromid. Sumární vzorec je $C_{34}H_{57}BrN_2O_4$, relativní molekulová hmotnost $M_r = 637,74$. [3]



Obrázek 3. 8 - Struktura vekuronium bromidu

Rokuronium bromid

Chemicky se jedná o 1-allyl-1-(17 β -acetoxy-3 α -hydroxy-2 β -morfolino-5 α -androstan-16 β -yl)pyrrolidin-1-ium-bromid. Sumární vzorec je $C_{32}H_{53}BrN_2O_4$, relativní molekulová hmotnost $M_r = 609,69$. [3]



Obrázek 3. 9 - Struktura rokuronium bromidu

3.3.3 Metody stanovení myorelaxancií

Český lékopis 2009 uvádí pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu metodu nevodné acidimetrické titrace s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence. Jako odměrné činidlo se zde používá kyselina chloristá 0,1 mol/l VS, analyty se rozpouští v acetanhydridu R (pankuronium bromid), případně v kyselině octové ledové R (vekuronium bromid a rokuronium bromid). [3]

Stanovují se nejen vlastní analyty, ale také příbuzné látky, které se mohou vyskytovat jako nečistoty. Pro toto stanovení uvádí ČL 2009 metody tenkovrstvé chromatografie (pankuronium bromid, vekuronium bromid) nebo kapalinové chromatografie (vekuronium bromid, rokuronium bromid). [3]

Pro stanovení pankuronium bromidu a vekuronium bromidu v léčivých přípravcích Pavulon a Norcuron byla publikována metoda kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí, která je zároveň separační metodou pro tyto dva analyty. [16]

Další metodou pro stanovení myorelaxancií ve farmaceutických přípravcích je metoda HPLC s amperometrickou detekcí, která byla úspěšně aplikována pro stanovení rokuronium bromidu a jeho osmi nečistot v přípravku Esmeron. [17]

Pro stanovení pankuronium bromidu a jeho nečistot (dakuronia a vekuronia) v přípravcích byla vyvinuta také metoda kapalinové chromatografie s detekcí pomocí nabitého aerosolu (LC-CAD). [18]

Pro stanovení vekuronium bromidu ve farmaceutických přípravcích byly vyvinuty metody HPLC s UV-VIS spektrofotometrickou detekcí a CZE s nepřímou UV-VIS spektrofotometrickou detekcí. Obě použité metody stanovení byly vzájemně porovnány a nebyly mezi nimi pozorovány významné rozdíly. [19]

Dále existují také metody, které byly vyvinuty pro stanovení myorelaxancií v biologických materiálech, zejména v plazmě. Tyto metody byly často použity pro studium farmakokinetiky

analyzovaných látek. Pro rokuronium a jeho metabolity bylo publikováno několik metod, např. HPLC s fluorimetrickou detekcí, která byla použita nejen pro stanovení v plazmě, ale také v moči, žluči a tkáňových homogenizátech [20], dále metody plynové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie nebo detektoru senzitivního pro sloučeniny obsahující dusíkový atom. [21, 22] Zajímavá je spektrofotometrická kinetická metoda stanovení pankuronium bromidu v séru a moči, založená na inhibici enzymu cholinesterázy pankuronium bromidem. [23]

Tabulka 3. 2 - Srovnání vybraných metod stanovení myorelaxancií (LP... léčivý přípravek; B... biologický materiál; t_A ... čas analýzy)

Metoda	Detekce	Analyt	Vz.	LOD	LOQ	t_A / [ref]
CZE	CCD	PAN, VEC	LP	7 $\mu\text{g/ml}$ (PAN) 6 $\mu\text{g/ml}$ (VEC)	21 $\mu\text{g/ml}$ (PAN) 18 $\mu\text{g/ml}$ (VEC)	< 4 min [16]
HPLC	Amperometrie	ROC + nečistoty	LP	15 ng/ml (ROC)	45 ng/ml (ROC)	< 10 min [17]
LC	CAD	PAN + nečistoty	LP	0,55 $\mu\text{g/ml}$ (PAN)	1,82 $\mu\text{g/ml}$ (PAN)	< 12 min [18]
HPLC	UV-VIS spektrofotometrie	VEC	LP	-	2,3 $\mu\text{g/ml}$ (VEC)	< 10 min [19]
CZE	Nepřímá UV-VIS spektrofotometrie	VEC	LP	-	15,1 $\mu\text{g/ml}$ (VEC)	< 5 min [19]
HPLC	Fluorimetrie	ROC + metabolity	B	3 ng/ml (ROC)	10 ng/ml (ROC)	< 30 min [20]
GC	MS	ROC + metabolity	B	-	26 ng/ml (ROC)	< 18 min [21]
GC	Detektor senzitivní pro dusík	ROC + metabolity	B	10 ng/ml (ROC)	50 ng/ml (ROC)	< 12 min [22]
Inhibice cholinesterázy	Kinetická spektrofotometrie	PAN	B	1,47 ng/ml (PAN)	4,89 ng/ml (PAN)	< 7 min [23]

4. Experimentální část

4.1 Používané přístroje

Analýzy byly prováděny na elektroforetickém systému PrinCE 650 (PrinCE Technologies B. V., Nizozemí), který byl vybaven bezkontaktním vodivostním detektorem TraceDec® (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Rakousko). Analyzátor byl ovládán pomocí programu WinPrinCE, který byl integrován v systému DAX (software pro získávání a analýzu dat). Hodnoty pH elektrolytů byly měřeny na pH metru PHM 220 (Radiometer, Francie) s kombinovanou skleněnou elektrodou PHC 2401-8, která byla kalibrována na standardní pufrů. Roztoky byly odplyněny pomocí ultrazvukové lázně Sonorex Digitec (Bandelin, Německo).

4.2 Použité chemikálie

- Kyselina octová, ≥99.0%, Fluka
- Kyselina mravenčí bezvodá, 98%, Fluka
- Kyselina citronová monohydrát, p. a., min. 99,8%, Penta
- Kyselina fosforečná, min. 85%, Merck
- Rokuronium bromid, ≥98.0%, Sigma-Aldrich
- Pankuronium bromid, p. a., Lunarsun
- Vekuronium bromid, p. a., Lunarsun
- γ-cyklodextrin, min. 99%, Sigma-Aldrich
- Hydroxypropyl-γ-cyklodextrin, p. a., Fluka
- Amoniak vodný roztok, 25-27%, Penta
- Tetraethylamonium jodid, 98%, Sigma-Aldrich
- Tetramethylamonium jodid, 99%, Sigma-Aldrich
- Tetrabutylamonium bromid, >99%, Fluka
- Fenytrimethylamonium jodid, min. 99%, Lachema
- Esmeron, N. V. Organon, Oss, Nizozemí, č. š. 682575
- Norcuron, N. V. Organon, Oss, Nizozemí, č. š. 5900511
- Pavulon, N. V. Organon, Oss, Nizozemí, č. š. 6700145
- ultračistá voda produkovaná přístrojem Milli-Q-System, Millipore, Bedford, MA, USA

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava roztoku základního elektrolytu

Vypočítaný objem 99% kyseliny octové byl v kádince zředěn vodou a následně bylo upraveno pH na potřebnou hodnotu roztokem amoniaku o koncentraci 1 mol/l. Roztok z kádinky byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Do jiné odměrné baňky bylo naváženo potřebné množství hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu, rozpuštěno v připraveném roztoku octanu amonného a doplněno tímto roztokem po rysku.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Potřebné množství daného standardu bylo naváženo do odměrné baňky, rozpuštěno v roztoku octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 4,75 a doplněno tímto roztokem po rysku. Tímto postupem byly připraveny zásobní roztoky standardů pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu o koncentraci 1 mg/ml.

4.3.3 Příprava zásobních roztoků vnitřních standardů

Jako vnitřní standard byly testovány tetraethylamonium jodid, tetramethylamonium jodid, tetrabutylamonium bromid a fenyltrimethylamonium jodid. Potřebné množství daného vnitřního standardu bylo naváženo do odměrné baňky, rozpuštěno ve vodě a doplněno po rysku. Zásobní roztoky vnitřních standardů byly připravovány o koncentraci 2 mg/ml.

4.3.4 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pro kalibraci byly připraveny vzorky obsahující všechny tři stanovované analyty na 5 koncentračních hladinách. Vzorky byly připravovány ze zásobních roztoků standardů pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu a zásobního roztoku vnitřního standardu – fenyltrimethylamonium jodidu. Dané objemy všech zásobních roztoků byly pipetovány do 5ml odměrných baněk a doplněny vodou po rysku.

Výsledné koncentrace všech analytů ve vzorku a pipetované objemy zásobních roztoků jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 4. 1 - Příprava roztoků pro kalibraci

Kalibrační hladina	V(ZR _{PAN}) [ml]	V(ZR _{VEC}) [ml]	V(ZR _{ROC}) [ml]	V(ZR _{IS}) [ml]	c(PAN) [μg/ml]	c(VEC) [μg/ml]	c(ROC) [μg/ml]	c(IS) [μg/ml]
1	0,25	0,25	0,25	0,75	50	50	50	300
2	0,50	0,50	0,50	0,75	100	100	100	300
3	0,75	0,75	0,75	0,75	150	150	150	300
4	1,00	1,00	1,00	0,75	200	200	200	300
5	1,25	1,25	1,25	0,75	250	250	250	300

4.3.5 Příprava zásobních roztoků přípravků Pavulon, Norcuron a Esmeron

Léčivý přípravek Pavulon je vyráběn ve formě injekčního roztoku o koncentraci 2 mg pankuronium bromidu v 1 ml roztoku. Jedna ampulka obsahuje 2 ml injekčního roztoku. [13] Zásobní roztok přípravku Pavulon byl připravován smísením obsahu dvou ampulí přípravku dohromady. Výsledná koncentrace pankuronium bromidu v připraveném zásobním roztoku byla 2 mg/ml.

Léčivý přípravek Norcuron je vyráběn ve formě prášku pro přípravu injekčního roztoku a dodáván společně s rozpouštědlem, kterým je voda na injekci. Jedna ampulka přípravku Norcuron obsahuje 4 mg vekuronium bromidu. [14] Zásobní roztok přípravku Norcuron byl připraven následujícím způsobem: obsah ampulky byl rozpuštěn v 1 ml vody, roztok byl pomocí injekční stříkačky převeden do kádinky a poté byla ampulka ještě jednou vypláchnuta 1 ml vody, vzniklý zředěný roztok byl smísen s prvním roztokem. Zásobní roztok byl získán rozpuštěním a smísením obsahu 2 ampulek. Výsledná koncentrace vekuronium bromidu v připraveném zásobním roztoku byla 2 mg/ml.

Léčivý přípravek Esmeron je vyráběn ve formě injekčního roztoku o koncentraci 10 mg rokuronium bromidu v 1 ml roztoku. [15] Z tohoto roztoku byl zásobní roztok připraven napipetováním 0,5 ml do 5ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku. Výsledná koncentrace rokuronium bromidu v připraveném zásobním roztoku byla 1 mg/ml.

Zásobní roztoky léčivých přípravků Pavulon, Norcuron i Esmeron byly připravovány čerstvé každý den.

4.3.6 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení přesnosti

Pro hodnocení přesnosti metody byly použity následující pracovní roztoky:

Pavulon

Pracovní roztok přípravku Pavulon byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,50 ml zásobního roztoku přípravku Pavulon a 0,75 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace pankuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 200 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok standardu pankuronium bromidu byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 1,00 ml zásobního roztoku pankuronium bromidu a 0,75 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace pankuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 200 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok přípravku byl připraven šestkrát, pracovní roztok standardu dvakrát.

Norcuron

Pracovní roztok přípravku Norcuron byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,50 ml zásobního roztoku přípravku Norcuron a 0,75 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace vekuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 200 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok standardu vekuronium bromidu byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 1,00 ml zásobního roztoku vekuronium bromidu a 0,75 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace vekuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 200 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok přípravku byl připraven šestkrát, pracovní roztok standardu dvakrát.

Esmeron

Pracovní roztok přípravku Esmeron byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,75 ml zásobního roztoku přípravku Esmeron a 0,75 ml

zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace rokuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 150 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok standardu rokuronium bromidu byl připraven následujícím postupem: do 5ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,75 ml zásobního roztoku rokuronium bromidu a 0,75 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a doplněno vodou po rysku. Výsledná koncentrace rokuronium bromidu v připraveném pracovním roztoku byla 150 µg/ml, koncentrace vnitřního standardu 300 µg/ml.

Pracovní roztok přípravku byl připraven šestkrát, pracovní roztok standardu dvakrát.

4.3.7 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení správnosti

Pro hodnocení správnosti metody byly použity následující pracovní roztoky:

Pavulon

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku standardu pankuronium bromidu, zásobního roztoku přípravku Pavulon a zásobního roztoku vnitřního standardu napipetováním objemů uvedených v tabulce do 5 ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku. Celková koncentrace pankuronium bromidu v daném pracovním roztoku je uvedena v tabulce, koncentrace vnitřního standardu byla vždy 300 µg/ml.

Pracovní roztoky A a B byly připraveny dvakrát, pracovní roztoky C, D a E třikrát.

Tabulka 4. 2 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Pavulon

Pracovní roztok	V (ZR PAN) [ml]	V (ZR Pavulon) [ml]	V (ZR IS) [ml]	c [µg/ml]
A	0,5	-	0,75	100
B	-	0,25	0,75	100
C	0,125	0,25	0,75	125
D	0,25	0,25	0,75	150
E	0,5	0,25	0,75	200

Norcuron

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku standardu vekuronium bromidu, zásobního roztoku přípravku Norcuron a zásobního roztoku vnitřního standardu napipetováním

objemů uvedených v tabulce do 5 ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku. Celková koncentrace vekuronium bromidu v daném pracovním roztoku je uvedena v tabulce, koncentrace vnitřního standardu byla vždy 300 µg/ml.

Pracovní roztoky A a B byly připraveny dvakrát, pracovní roztoky C, D a E třikrát.

Tabulka 4. 3 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Norcuron

Pracovní roztok	V (ZR VEC) [ml]	V (ZR Norcuron) [ml]	V (ZR IS) [ml]	c [µg/ml]
A	0,5	-	0,75	100
B	-	0,25	0,75	100
C	0,125	0,25	0,75	125
D	0,25	0,25	0,75	150
E	0,5	0,25	0,75	200

Esmeron

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku standardu rokuronium bromidu, zásobního roztoku přípravku Esmeron a zásobního roztoku vnitřního standardu napipetováním objemů uvedených v tabulce do 5 ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku. Celková koncentrace rokuronium bromidu v daném pracovním roztoku je uvedena v tabulce, koncentrace vnitřního standardu byla vždy 300 µg/ml.

Pracovní roztoky A a B byly připraveny dvakrát, pracovní roztoky C, D a E třikrát.

Tabulka 4. 4 - Příprava pracovních roztoků pro ověření správnosti – Esmeron

Pracovní roztok	V (ZR ROC) [ml]	V (ZR Esmeron) [ml]	V (ZR IS) [ml]	c [µg/ml]
A	0,5	-	0,75	100
B	-	0,5	0,75	100
C	0,125	0,5	0,75	125
D	0,25	0,5	0,75	150
E	0,5	0,5	0,75	200

4.4 Optimalizace metody

Separaci látek metodou kapilární elektroforézy ovlivňuje mnoho faktorů. Velmi výrazný vliv má složení základního elektrolytu (typ použitého elektrolytového systému, jeho koncentrace, pH, přidaná aditiva, jako např. organická rozpouštědla nebo látky tvořící komplexy). Důležitými

parametry jsou také typ, délka a vnitřní průměr použité kapiláry, vložené napětí, pracovní teplota a způsob dávkování vzorku.

V průběhu této práce byly testovány následující parametry: druh použitého elektrolytu, jeho koncentrace a pH, koncentrace přidaného cyklodextrinu a methanolu, použité napětí a pracovní teplota.

4.1.1 Druh elektrolytového systému

Protože analyty nejsou stabilní v bazickém prostředí, byly jako BGE testovány pufrы kyselé oblasti pH – formiátový (pH = 3,75), acetátový (pH = 4,75), citrátový (pH = 3,10), fosfátový (pH = 3,00) a kombinovaný citrát-fosfátový (pH = 4,00) pufr. U formiátu a acetátu byly pro úpravu pH zkoušeny roztoky NaOH a NH₃, u ostatních pufrů pouze NaOH.

4.1.2 Vliv pH

S ohledem na pufrační oblast acetátového pufru byly testovány tyto hodnoty pH: 3,75; 4,25; 4,75; 5,25 a 5,75. Při každé hodnotě pH byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- koncentrace kyseliny octové 30 mmol/l
- koncentrace HP-γ-CD 10 mmol/l (15,8 mg/ml)
- vložené napětí 25 kV
- pracovní teplota 25°C

4.1.3 Vliv koncentrace HP-γ-CD

Vliv koncentrace hydroxypropyl-γ-cyklodextrinu byl testován pro hodnoty 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml a 25 mg/ml. Při každé koncentraci byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- koncentrace kyseliny octové 30 mmol/l
- pH 5,75
- vložené napětí 25 kV
- pracovní teplota 25°C

4.1.4 Výběr vnitřního standardu

Při hledání vhodného vnitřního standardu byly testovány tyto kvartérní aminy: tetraethylamonium jodid, tetramethylamonium jodid, tetrabutylamonium bromid a fenyltrimethylamonium jodid. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml, testované vnitřní standardy byly do vzorku přidávány vždy v koncentraci 500 µg/ml.

4.1.5 Vliv koncentrace kyseliny octové

Vliv koncentrace kyseliny octové byl testován pro hodnoty 10 mmol/l, 20 mmol/l, 30 mmol/l, 40 mmol/l a 50 mmol/l. Při každé koncentraci byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml a vnitřní standard (fenyltrimethylamonium jodid) v koncentraci 300 mg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- pH 5,75
- koncentrace hydroxypropyl-γ-cyklodextrinu 20 mg/ml
- vložené napětí 25 kV
- pracovní teplota 25°C

4.1.6 Vliv přídavku methanolu

Přídavek organického rozpouštědla do BGE byl testován z důvodů možného snížení šumu základní linie. Vliv obsahu přidaného methanolu byl testován pro hodnoty 0%, 5%, 10%, 15% a 20%. Při každé koncentraci byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující

pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml a vnitřní standard (fenyltrimethylamonium jodid) v koncentraci 300 mg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- koncentrace kyseliny octové 30 mmol/l
- pH 5,75
- koncentrace hydroxypropyl-γ-cyklodextrinu 20 mg/ml
- vložené napětí 25 kV
- pracovní teplota 25°C

4.1.7 Vliv vloženého napětí

Byly testovány hodnoty vloženého napětí 15 kV, 20 kV, 25 kV a 30 kV. Pro každou hodnotu napětí byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml a vnitřní standard (fenyltrimethylamonium jodid) v koncentraci 300 mg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- koncentrace kyseliny octové 30 mmol/l
- pH 5,75
- koncentrace hydroxypropyl-γ-cyklodextrinu 20 mg/ml
- pracovní teplota 25°C

4.1.8 Vliv pracovní teploty

Byly testovány hodnoty pracovní teploty 15°C, 20°C, 25°C a 30°C. Pro každou hodnotu teploty byla provedena 2 měření. Jako vzorek byl použit roztok obsahující pankuronium bromid, vekuronium bromid a rokuronium bromid v koncentraci 200 µg/ml a vnitřní standard (fenyltrimethylamonium jodid) v koncentraci 300 mg/ml.

Analýzy byly provedeny za těchto konstantních podmínek:

- koncentrace k. octové 30 mmol/l
- pH 5,75
- koncentrace hydroxypropyl-γ-cyklodextrinu 20 mg/ml
- vložené napětí 20 kV

4.5 Postup analýzy

Pro analýzu byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 75 cm a efektivní délce 45 cm. Kapilára byla temperována vzduchem na $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Před prvním použitím byla kapilára kondicionována promytím 10 minut methanolem, 20 minut 1M roztokem NaOH a 10 minut vodou, vše při tlaku 1000 mbar.

Denně byla kapilára ráno před první analýzou a po ukončení měření promývána 10 minut 0,5M roztokem NaOH a 10 minut vodou při tlaku 1000 mbar.

Na počátku každé analýzy byla kapilára promývána 2 minuty 0,5M roztokem NaOH, 2 minuty vodou a 2 minuty pracovním elektrolytem, vše při tlaku 1000 mbar. Pro analýzu byly použity vždy 3 vialky s BGE – jedna sloužila k promývání kapiláry, další dvě byly použity jako vstupní a výstupní zásobník pro vlastní analýzu. Jedna sada zásobníků BGE byla použita vždy maximálně pro 6 analýz.

Bylo použito hydrodynamické dávkování vzorku, nástřik do kapiláry probíhal po dobu 6 sekund tlakem 50 mbar.

Nastavení CCD detektoru bylo následující: Gain 50%, Voltage – 18 dB, Offset 0.

4.6 Výpočetní postupy

4.6.1 Způsobnost systému

Byly hodnoceny následující parametry způsobnosti systému: počet teoretických pater (N), asymetrie píku (A), rozlišení mezi sousedními píky (R), opakovatelnost migračních časů a ploch píků. Byly vypočítány průměrné hodnoty ze šesti měření pracovního roztoku standardů za optimálních podmínek analýzy.

4.6.1.1 Počet teoretických pater

Počet teoretických pater byl vypočítán programem DAX dle vztahu [24]:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

t_m – migrační čas daného analytu

$w_{1/2}$ – šířka píku v polovině jeho výšky

4.6.1.2 Asymetrie

Asymetrie píku A byla určena programem DAX jako poměr šířky pravé strany píku k jeho levé straně v jedné desetinně výšky píku. [24]

4.6.1.3 Rozlišení

Rozlišení mezi sousedními píky bylo spočítáno programem DAX dle vztahu [3]:

$$R = \frac{1,18(t_{m_2} - t_{m_1})}{(w_{1/2})_1 + (w_{1/2})_2}$$

t_{m_1}, t_{m_2} – migrační časy analytů

$(w_{1/2})_1, (w_{1/2})_2$ – šířky píků v polovině výšky

4.6.1.4 Opakovatelnost

Bylo provedeno šest měření vzorku pracovního roztoku standardů a pomocí programu DAX byly získány hodnoty migračních časů a ploch píků standardů všech tří analytů i vnitřního standardu. Korekce ploch všech sledovaných píků byla provedena vydělením jejich migračním časem. Byl určen průměr hodnot, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka podle následujících vzorců.

Průměr hodnot \bar{X} :

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Směrodatná odchylka s [3]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Relativní směrodatná odchylka RSD [3]:

$$RSD = 100 \frac{s}{\bar{X}}$$

n – počet jednotlivých měření

x_i – hodnota jednotlivého měření

4.6.2 Validace metody

4.6.2.1 Kalibrace, stanovení linearit a rozsahu metody

Ověření linearit bylo provedeno měřením kalibrační křivky na pěti koncentračních úrovních každého z analytů v rozsahu 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$ s obsahem 300 $\mu\text{g/ml}$ vnitřního standardu. Na každé koncentrační úrovni byla provedena tři měření.

Plochy analytů byly korigovány migračním časem a byl určen poměr korigovaných ploch daného analytu a vnitřního standardu podle následujícího vzorce:

$$A = \frac{\frac{A_x}{t_{m_x}}}{\frac{A_{IS}}{t_{m_{IS}}}}$$

A – výsledný poměr korigovaných ploch

A_x, A_{IS} – plochy píků analytů a vnitřního standardu

$t_{m_x}, t_{m_{IS}}$ – migrační časy analytů a vnitřního standardu

Výsledky byly zpracovány metodou lineární regrese, hodnocena byla závislost poměru korigovaných ploch na koncentraci daného analytu ve vzorku.

4.6.2.2 Stanovení LOD a LOQ

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly stanoveny na základě poměru signálu k šumu (S/N), který byl vypočítán podle následujícího vztahu [3]:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

H – výška píku daného analytu na elektroforeogramu

h – rozsah šumu na elektroforeogramu při slepé zkoušce ve vzdálenosti dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se pík nacházel

Pro LOD bylo S/N = 3 a pro LOQ S/N = 10.

4.6.2.3 Mezidenní přesnost

Během tří dnů bylo prováděno stanovení obsahu analytu v daném HVLP. Každý den byly provedeny analýzy vždy dvou pracovních roztoků standardu analytu a šesti pracovních roztoků léčivého přípravku s obsahem téhož analytu, byly provedeny vždy tři analýzy každého pracovního roztoku.

Byla určena koncentrace analytu v pracovních roztocích HVLP podle vztahu:

$$c_{VZ} = \frac{A_{VZ} \cdot c_{ST}}{A_{ST}}$$

c_{VZ} – koncentrace ve vzorku

c_{ST} – koncentrace v pracovním roztoku standardu

A_{VZ} – poměr korigovaných ploch píků analytu a vnitřního standardu ve vzorku

A_{ST} – poměr korigovaných ploch píků analytu a vnitřního standardu v pracovním roztoku standardu

Stanovený obsah analytu byl vyjádřen v procentech z deklarovaného obsahu v přípravku, byl vyhodnocen průměrný obsah, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka stanovení v průběhu jednoho dne i dohromady během všech tří dnů.

4.6.2.4 Správnost

Správnost byla určena metodou standardního přídatku. Roztoky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.3.7, každý připravený pracovní roztok byl měřen třikrát. Byly určeny koncentrace analytů v pracovních roztocích. Hodnocena byla nalezená koncentrace přidaného standardu analytu, která byla určena jako rozdíl mezi celkovou stanovenou koncentrací a koncentrací analytu v HVLP. Výtěžnost (recovery) byla určena porovnáním koncentrace nalezené a vložené dle vztahu [25]:

$$R = \frac{\textit{nalezená hodnota}}{\textit{vložená hodnota}} \cdot 100 [\%]$$

5. Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace metody

5.1.1 Druh elektrolytového systému

S ohledem na dobré rozlišení mezi píky jednotlivých analytů, symetrický tvar píků a kratší celkovou dobu analýzy byl jako optimální zvolen acetátový pufr, jehož pH bylo upraveno pomocí roztoku NH_3 .

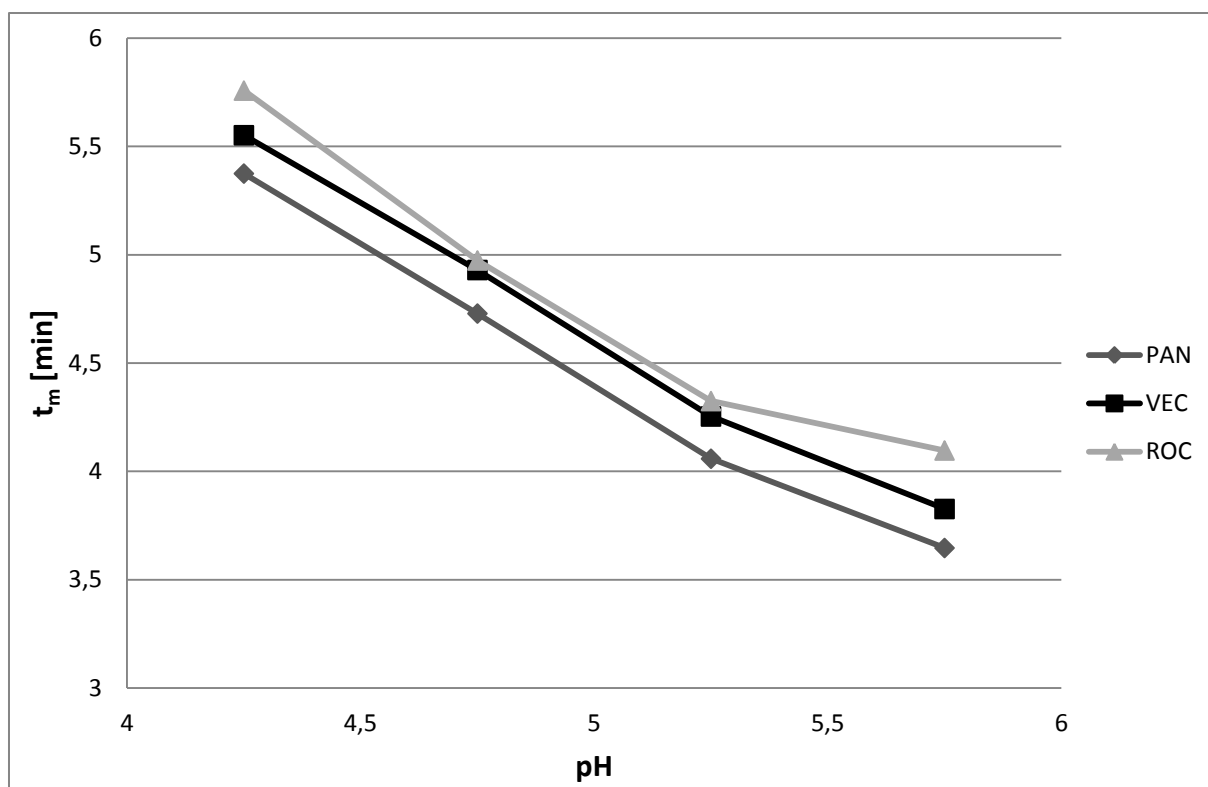
Pořadí migrace analytů v tomto pufru bylo pankuronium – vekuronium – rokuronium. Toto pořadí bylo zjištěno metodou přidavku standardu jednotlivých látek do analyzovaného vzorku.

5.1.2 Vliv pH

S rostoucím pH se zkracoval čas analýzy a zlepšovalo se rozlišení mezi píky jednotlivých analytů (viz obr. 5.1), proto byla jako optimální zvolena hodnota $\text{pH} = 5,75$. Při tomto pH byly nejkratší migrační časy analytů a nejlepší rozlišení (pankuronium – vekuronium 1,39; vekuronium – rokuronium 1,73). Naproti tomu při $\text{pH} = 3,75$ nebyly jednotlivé píky rozlišeny vůbec, splývaly v jediný neostrý pík, migrační časy byly zhruba v rozmezí 6 – 7 minut, ale nebylo možno je přesně určit. Proto nejsou hodnoty migračních časů při $\text{pH} 3,75$ v grafu zobrazeny.

Tabulka 5. 1 – Závislost migračních časů na pH elektrolytu

pH	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
4,25	5,38	5,55	5,76
4,75	4,72	4,93	4,97
5,25	4,06	4,25	4,33
5,75	3,65	3,83	4,10



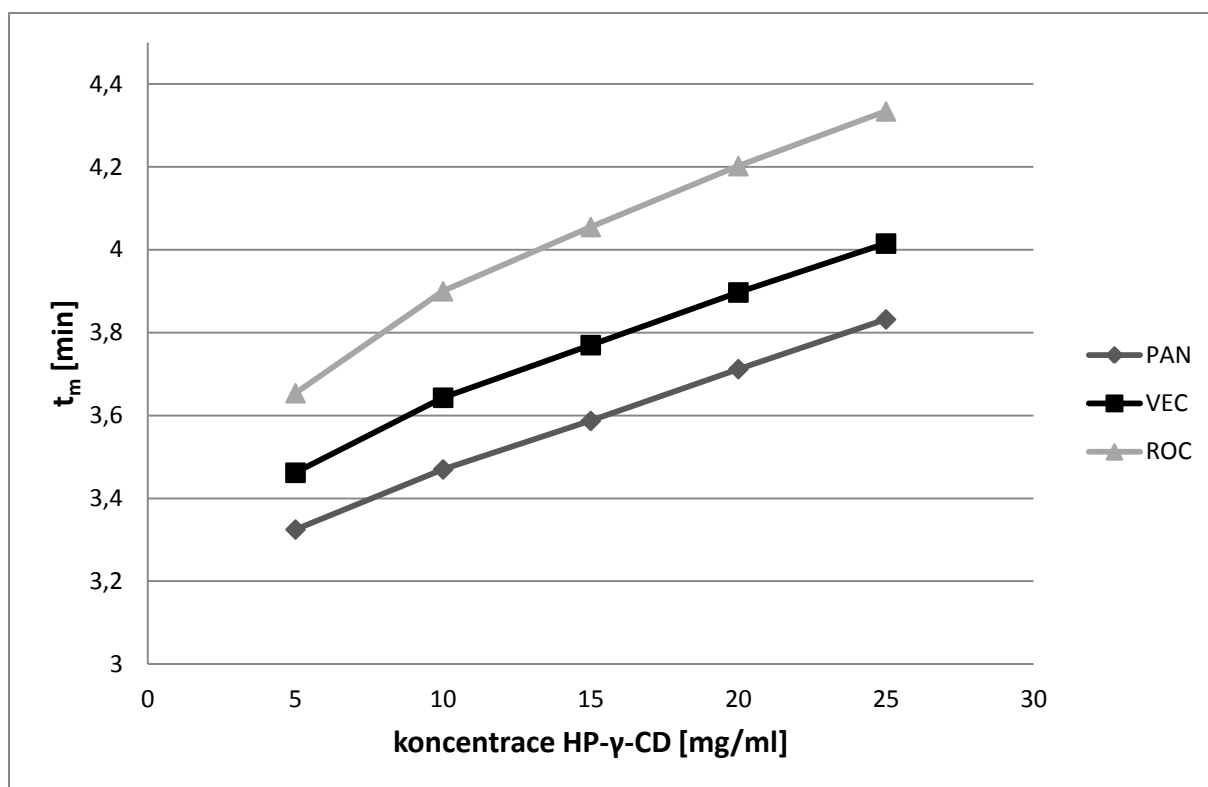
Obrázek 5. 1 - Graf závislosti migračních časů na pH elektrolytu

5.1.3 Vliv koncentrace HP- γ -CD

S rostoucí koncentrací hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu v roztoku BGE se zlepšovalo rozlišení mezi píky jednotlivých analytů, zároveň se ale prodlužovaly jejich migrační časy (viz obr. 5.2). Proto byla jako nejvhodnější vybrána koncentrace 20 mg/ml HP- γ -CD, kdy již bylo relativně dobré rozlišení (pankuronium – vekuronium 1,22; vekuronium – rokuronium 1,91), aby se zbytečně neprodlužoval čas analýzy.

Tabulka 5. 2 - Závislost migračních časů na koncentraci HP- γ -CD

Koncentrace HP- γ -CD [mg/ml]	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
5	3,33	3,46	3,65
10	3,47	3,64	3,90
15	3,59	3,77	4,06
20	3,71	3,90	4,20
25	3,83	4,02	4,33



Obrázek 5. 2 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci HP- γ -CD

5.1.4 Výběr vnitřního standardu

Vnitřní standard byl vybírán z těchto látek: tetraethylamonium jodid, tetramethylamonium jodid, tetrabutylamonium bromid a fenyltrimethylamonium jodid. Pík tetrabutylamonium bromidu splýval s píky pankuronia a vekuronia, u píku tetramethylamonium jodidu docházelo k interferenci se systémovým píkem. U píků tetraethylamonium jodidu i fenyltrimethylamonium jodidu bylo dobré rozlišení od píků analytů i od systémového píku. Vzhledem k lepšímu tvaru píku byl pro další analýzy jako vnitřní standard zvolen fenyltrimethylamonium jodid.

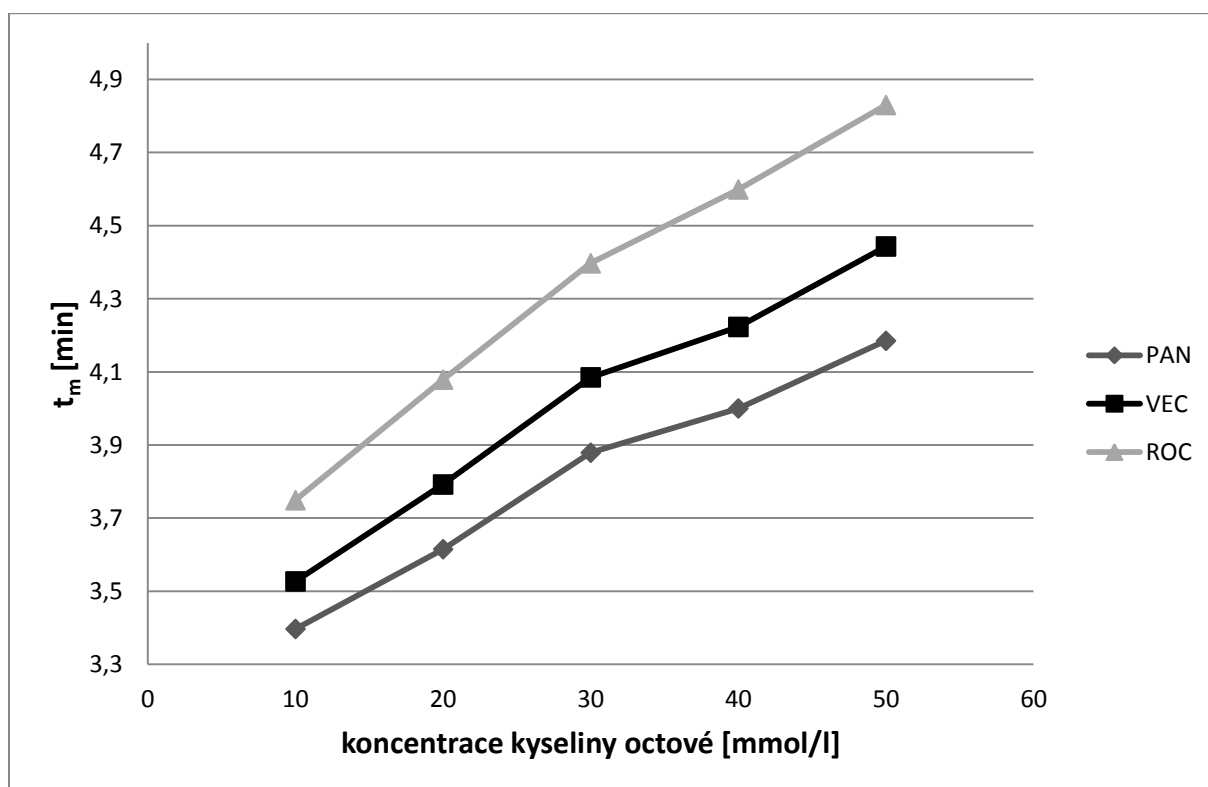
5.1.5 Vliv koncentrace kyseliny octové

S rostoucí koncentrací kyseliny octové se zlepšovalo rozlišení mezi píky jednotlivých analytů i jejich tvar, ale zároveň se prodlužovaly migrační časy (viz obr. 5.3) a docházelo k většímu šumu základní linie. Proto byla pro další optimalizaci metody vybrána jako optimální hodnota koncentrace 30 mmol/l. Při této hodnotě bylo již dostatečné rozlišení píků

(pankuronium – vekuronium 1,19; vekuronium – rokuronium 1,55) a píky byly ostré, zároveň byl ještě přijatelný šum základní linie a migrační časy analytů.

Tabulka 5. 3 - Závislost migračních časů na koncentraci kyseliny octové

Koncentrace kyseliny octové [mmol/l]	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
10	3,40	3,53	3,75
20	3,62	3,79	4,08
30	3,88	4,09	4,40
40	4,00	4,22	4,60
50	4,19	4,44	4,83



Obrázek 5. 3 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci kyseliny octové

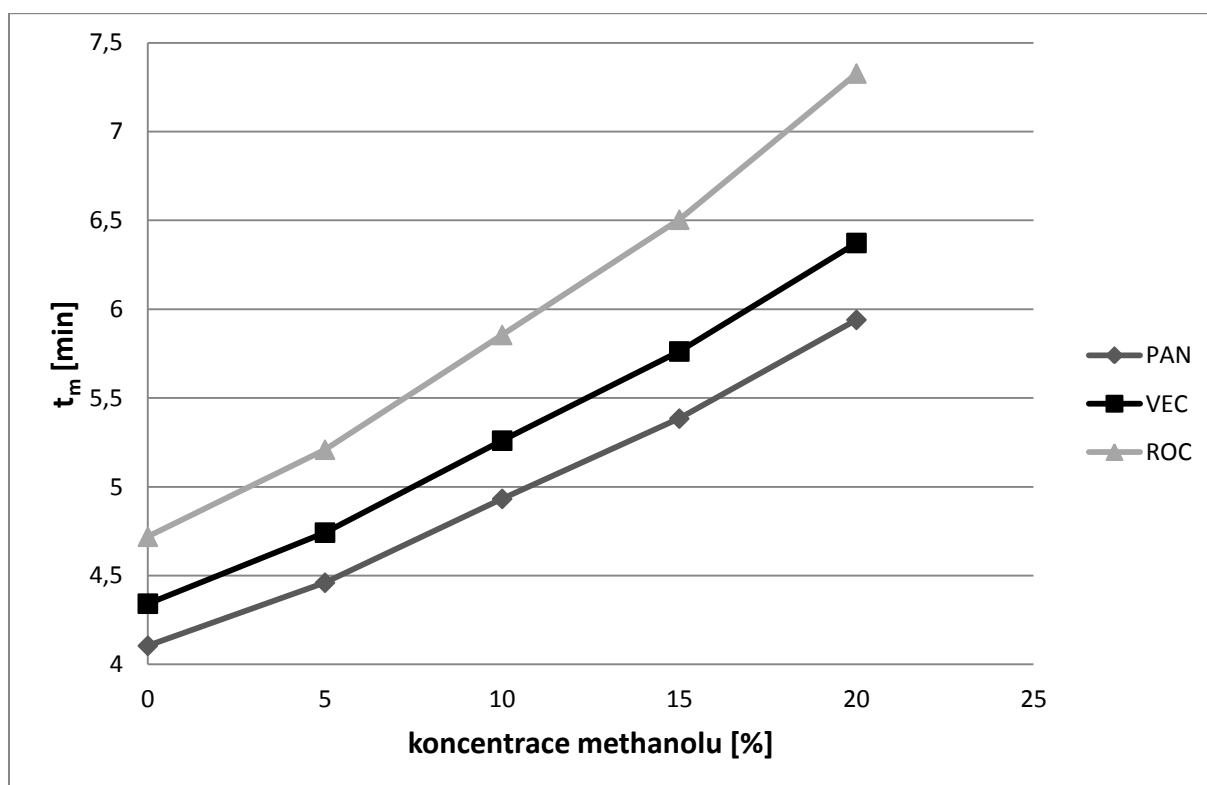
5.1.6 Vliv přídavku methanolu

S rostoucím obsahem methanolu v BGE docházelo k výraznému prodloužení migračních časů analytů (viz obr. 5.4). Šum základní linie nebyl přídavkem methanolu nijak ovlivněn. Proto

byl pro další analýzy použit BGE bez přídavku organického rozpouštědla. Navíc použití vodných pufrů je ekologičtější a patří mezi výhody kapilární elektroforézy oproti HPLC.

Tabulka 5. 4 - Závislost migračních časů na koncentraci methanolu

Koncentrace methanolu [%]	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
0	4,11	4,34	4,72
5	4,46	4,74	5,21
10	4,93	5,26	5,86
15	5,38	5,76	6,50
20	5,94	6,37	7,33



Obrázek 5. 4 - Graf závislosti migračních časů na koncentraci methanolu

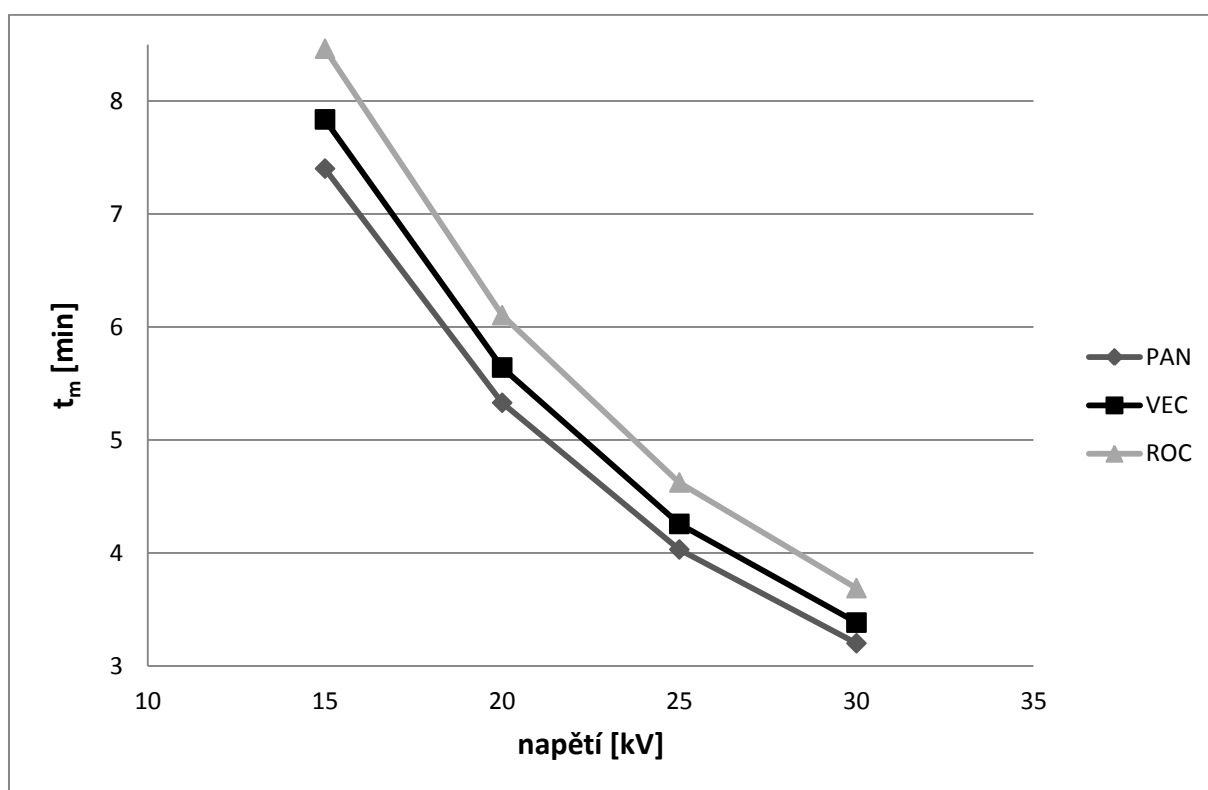
5.1.7 Vliv vloženého napětí

S klesající hodnotou vloženého napětí docházelo k redukci šumu základní linie, zároveň se ale výrazně prodlužovaly migrační časy analytů (viz obr. 5.5) a jednotlivé píky byly méně ostré.

Proto byla jako kompromis zvolena jako nejlepší hodnota vloženého napětí 20 kV, která byla poté použita pro další optimalizaci.

Tabulka 5. 5 - Závislost migračních časů na vloženém napětí

Vložené napětí [kV]	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
15	7,40	7,84	8,46
20	5,33	5,64	6,11
25	4,03	4,26	4,63
30	3,20	3,39	3,69



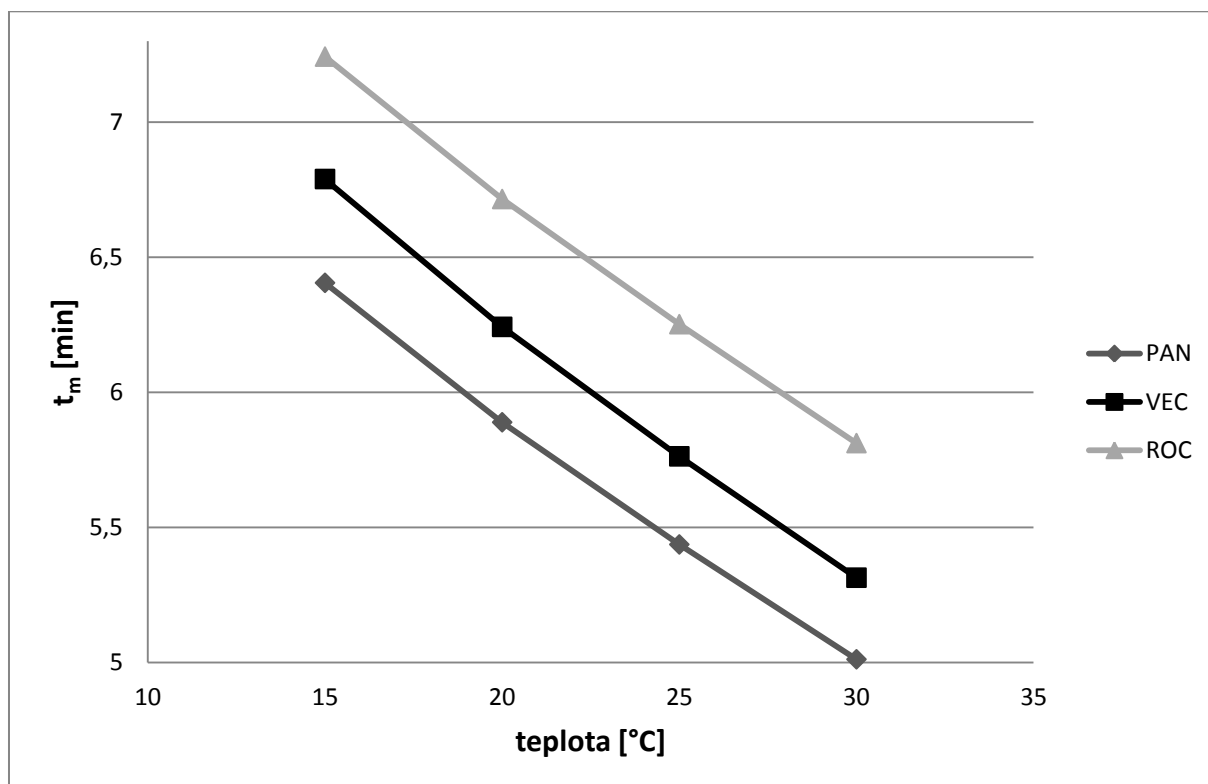
Obrázek 5. 5 - Graf závislosti migračních časů na vloženém napětí

5.1.8 Vliv pracovní teploty

S rostoucí teplotou docházelo ke zkracování migračních časů jednotlivých analytů (viz obr. 5.6), proto byla vyšší pracovní teplota výhodnější. Z důvodu rychlejší temperace přístroje byla jako nejlepší vybrána teplota 25°C.

Tabulka 5. 6 - Závislost migračních časů na pracovní teplotě

Pracovní teplota [°C]	t_m [min]		
	PAN	VEC	ROC
15	6,41	6,79	7,24
20	5,89	6,24	6,72
25	5,44	5,76	6,25
30	5,01	5,31	5,81



Obrázek 5. 6 - Graf závislosti migračních časů na pracovní teplotě

5.1.9 Optimalizace promývání kapiláry

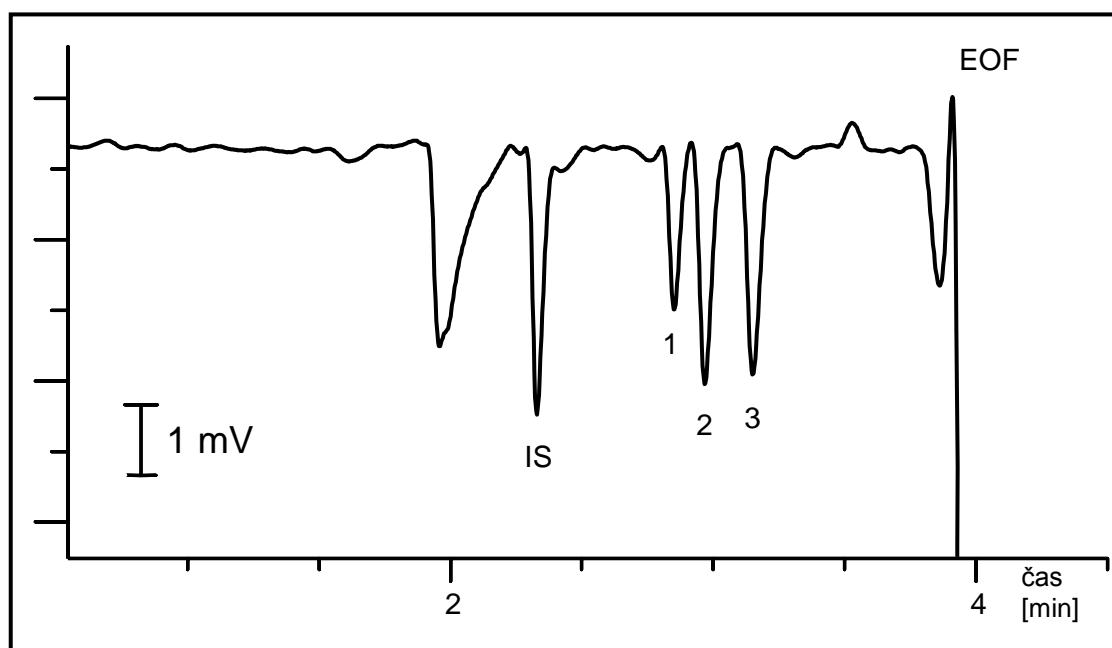
K promývání kapiláry ráno před první analýzou, večer po poslední analýze a před každým nástřikem vzorku byl při optimalizaci metody a kalibraci používán 0,1M roztok NaOH. Při analýze jednotlivých léčivých přípravků bylo zjištěno, že se migrační časy analytů postupně prodlužují. Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno promývání kapiláry 0,5M roztokem NaOH. Po této změně došlo ke zkrácení celkového času analýzy a ke stabilizaci migračních časů jednotlivých analytů, které již zůstávaly konstantní. Proto byl pro další analýzy (ověření správnosti metody a stanovení obsahu pro jednotlivé léčivé přípravky) použit k promývání kapiláry 0,5M roztok NaOH.

5.1.10 Optimální podmínky analýzy

Pro analýzu přípravků byly jako optimální zvoleny následující podmínky:

- Složení BGE: acetátový pufr o hodnotě pH = 5,75 (upraveno pomocí 1M NH₃), koncentrace kyseliny octové 30 mmol/l, přídavek 20 mg/ml hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu
- Vnitřní standard: fenyltrimethylamonium jodid
- Vložené napětí: 20 kV
- Pracovní teplota: 25°C
- Promývání kapiláry 0,5M roztokem NaOH

Elektroforeogram směsi standardů pankuronium bromidu (200 μ g/ml), vekuronium bromidu (200 μ g/ml) a rokuronium bromidu (200 μ g/ml) spolu s vnitřním standardem (300 μ g/ml) za uvedených optimálních podmínek je znázorněn na obrázku 5.7. Na záznamu je kromě píků analytů, vnitřního standardu a EOF ještě systémový pík s migračním časem cca 2 min (před píkem vnitřního standardu).



Obrázek 5. 7 - Elektroforeogram směsi pankuronium bromidu (1), vekuronium bromidu (2) a rokuronium bromidu (3) s vnitřním standardem (IS) za optimálních podmínek

5.2 Způsobilost systému

5.2.1 Účinnost separace

Účinnost separace analytů byla vyjádřena jako zdánlivý počet teoretických pater N . Vypočítané průměrné hodnoty N pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 5. 7 - Hodnoty počtu teoretických pater

Analyt	Počet teoretických pater
Pankuronium bromid	32980
Vekuronium bromid	27756
Rokuronium bromid	24788

5.2.2 Asymetrie

Asymetrie píku vyjadřuje jeho tvar a je v ideálním případě rovna jedné. Získané průměrné hodnoty asymetrie jednotlivých píků jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 5. 8 - Hodnoty asymetrie jednotlivých píků

Analyt	Asymetrie
Pankuronium bromid	1,87
Vekuronium bromid	2,02
Rokuronium bromid	2,26

5.2.3 Rozlišení

Rozlišení mezi píky vyjadřuje, jak dobře jsou od sebe analyty separované. Pro chromatografické metody se v ČL 2009 udává, že rozdělení píků na základní linii odpovídá minimální rozlišení 1,5. Hodnoty rozlišení mezi jednotlivými píky jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 5. 9 - Rozlišení mezi sousedními píky

Dvojice píků	Rozlišení
Systémový pík – vnitřní standard	4,25
Vnitřní standard – pankuronium bromid	10,10
Pankuronium bromid – vekuronium bromid	2,58
Vekuronium bromid – rokuronium bromid	3,22
Rokuronium bromid – EOF	4,06

Bylo dosaženo průměrných hodnot rozlišení v rozmezí 2,58 – 10,10; všechny píky jsou rozděleny na základní linii.

5.2.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost migračních časů a poměrů korigovaných ploch byla hodnocena měřením pracovního roztoku standardů pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu. Bylo provedeno šest nástřiků daného pracovního roztoku a určen průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka ze šesti získaných hodnot.

Tabulka 5. 10 - Opakovatelnost migračních časů (n=6)

Analyt	Průměr t_m [min]	Směrodatná odchylka	RSD [%]
Pankuronium bromid	5,7028	0,0408	0,72
Vekuronium bromid	6,0523	0,0466	0,77
Rokuronium bromid	6,5550	0,0550	0,84

Tabulka 5. 11 - Opakovatelnost poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu (n=6)

Analyt	Průměr A	Směrodatná odchylka	RSD [%]
Pankuronium bromid	0,5163	0,0089	1,73
Vekuronium bromid	0,6898	0,0119	1,73
Rokuronium bromid	0,7202	0,0085	1,18

Dále byla hodnocena opakovatelnost migračních časů a poměrů korigovaných ploch při měření pracovních roztoků jednotlivých léčivých přípravků. V tomto případě bylo připraveno vždy šest pracovních roztoků daného léčivého přípravku a každý roztok byl analyzován třikrát, celkem tedy bylo hodnoceno vždy 18 hodnot t_m a A.

Tabulka 5. 12 - Opakovatelnost migračních časů (n=18)

Analyt	Průměr t_m [min]	Směrodatná odchylka	RSD [%]
Pankuronium bromid	2,7152	0,0058	0,22
Vekuronium bromid	2,8394	0,0066	0,23
Rokuronium bromid	3,0128	0,0061	0,20

Tabulka 5. 13 - Opakovatelnost poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu (n=18)

Analyt	Průměr A	Směrodatná odchylka	RSD [%]
Pankuronium bromid	0,7238	0,0163	2,26
Vekuronium bromid	1,1728	0,0159	1,36
Rokuronium bromid	1,0018	0,0208	2,07

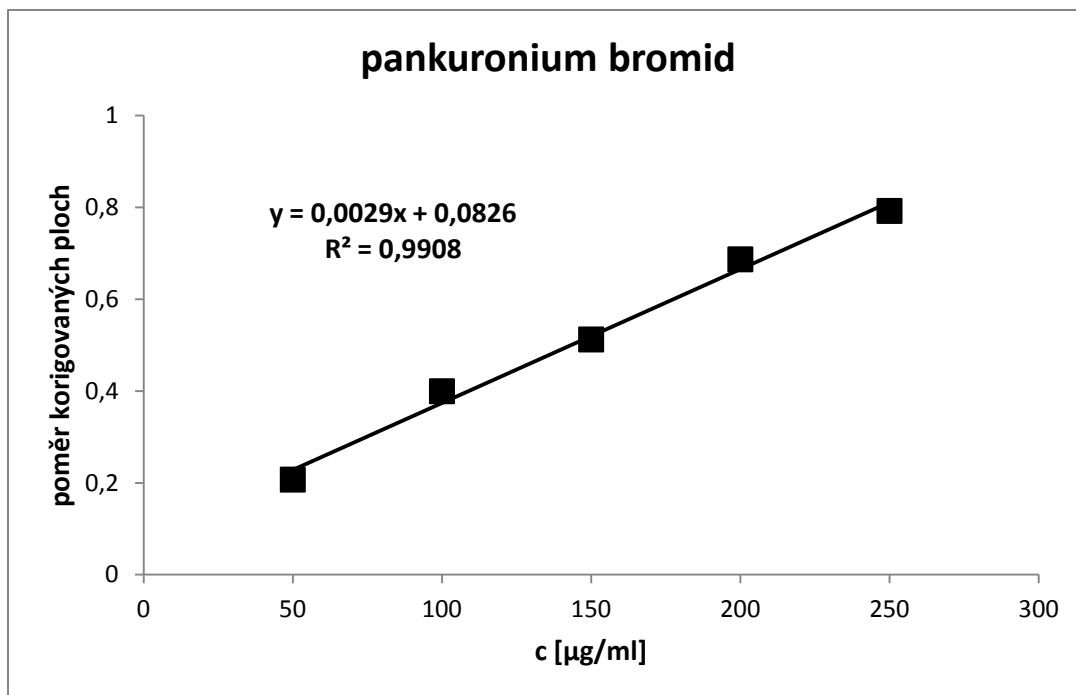
Relativní směrodatné odchylky migračních časů jsou menší než 1%, RSD poměrů korigovaných ploch se pohybuje v rozmezí 1,18 – 2,26%. Na RSD migračních časů je vidět zlepšení opakovatelnosti analýzy změnou promývání z 0,1M NaOH na 0,5M NaOH. Před touto změnou bylo RSD migračních časů jednotlivých analytů v rozmezí 0,72 – 0,84%, po změně promývání došlo k několikanásobnému snížení RSD na 0,20 – 0,23%.

5.3 Validace metody

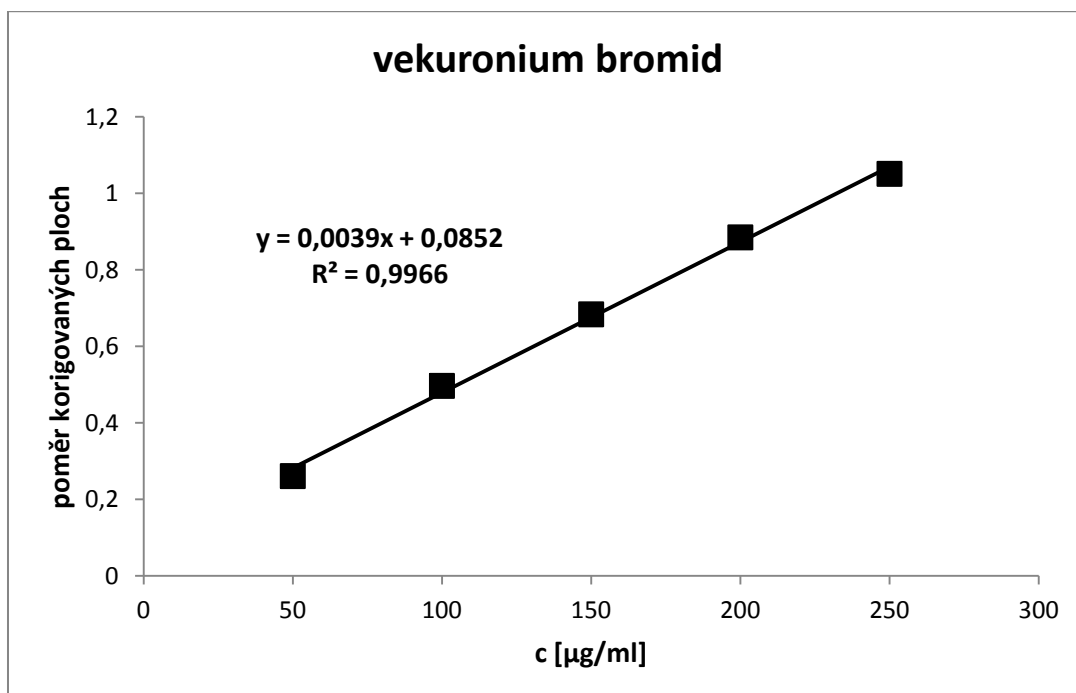
5.3.1 Linearita

Linearita metody byla stanovena pro pankuronium bromid, vekuronium bromid i rokuronium bromid v rozsahu koncentrací 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$. Pro stanovení linearitě metody a určení kalibrační závislosti byly použity roztoky připravené postupem popsaným v kapitole 4.3.4.

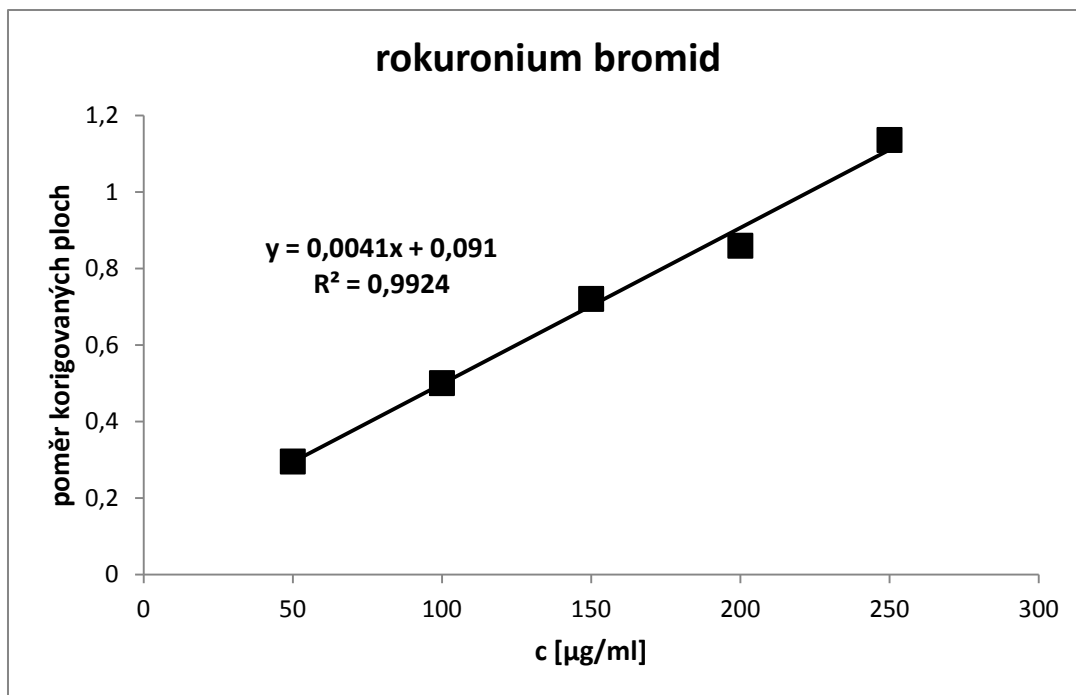
Výsledky byly zpracovány metodou lineární regrese a výsledná závislost byla zobrazena graficky.



Obrázek 5. 8 - Kalibrační závislost pankuronium bromidu



Obrázek 5. 9 - Kalibrační závislost vekuronium bromidu



Obrázek 5. 10 - Kalibrační závislost rokuronium bromidu

Závislost je ve sledovaném rozsahu lineární pro všechny analyty. Korelační koeficienty R jsou 0,9954 pro pankuronium bromid, 0,9983 pro vekuronium bromid a 0,9962 pro rokuronium bromid.

5.3.2 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce a limit kvantifikace byly určeny na základě poměru signálu k šumu výpočtem dle kapitoly 4.5.2.2. Hodnoty LOD a LOQ získané výpočtem byly ověřeny experimentálně.

Tabulka 5. 14 - Limity detekce a kvantifikace jednotlivých analytů

Analyt	LOD		LOQ	
	[$\mu\text{g/ml}$]	[mol/l]	[$\mu\text{g/ml}$]	[mol/l]
Pankuronium bromid	13,2	$1,80 \cdot 10^{-5}$	44,1	$6,02 \cdot 10^{-5}$
Vekuronium bromid	11,1	$1,74 \cdot 10^{-5}$	37,1	$5,82 \cdot 10^{-5}$
Rokuronium bromid	11,3	$1,85 \cdot 10^{-5}$	37,8	$6,20 \cdot 10^{-5}$

Limit detekce pro jednotlivé analyty byl v rozmezí 11,1 – 13,2 $\mu\text{g/ml}$ a limit kvantifikace v rozmezí 37,1 – 44,1 $\mu\text{g/ml}$.

5.3.3 Mezidenní přesnost

Obsah jednotlivých analytů v léčivých přípravcích byl stanovován vždy během tří dnů. Pro měření byly použity roztoky připravené dle postupu popsaného v kapitole 4.3.6. Byly vypočítány průměrné hodnoty obsahu určené během jednotlivých dnů i celkově během tří dnů. Stanovený obsah analytů v přípravcích a relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách.

Tabulka 5. 15 - Stanovení obsahu pankuronium bromidu v přípravku Pavulon

Pavulon (2 mg/ml)				
Den	Deklarovaný obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [%]	RSD [%]
1.	2,00	2,02	100,92	3,23
2.	2,00	2,03	101,65	1,89
3.	2,00	2,01	100,71	1,61
průměr	2,00	2,02	101,09	2,25

Tabulka 5. 16 - Stanovení obsahu vekuronium bromidu v přípravku Norcuron

Norcuron (4 mg/ml)				
Den	Deklarovaný obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [%]	RSD [%]
1.	4,00	3,96	99,04	0,80
2.	4,00	4,00	100,00	1,86
3.	4,00	3,98	99,38	1,70
průměr	4,00	3,98	99,47	1,50

Tabulka 5. 17 - Stanovení obsahu rokuronium bromidu v přípravku Esmeron

Esmeron (10 mg/ml)				
Den	Deklarovaný obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [mg/ml]	Nalezený obsah [%]	RSD [%]
1.	10,00	9,97	99,74	1,92
2.	10,00	10,00	100,01	2,87
3.	10,00	10,12	101,18	2,16
průměr	10,00	10,03	100,31	2,30

Zjištěný obsah účinných látek v jednotlivých přípravcích odpovídal deklarovanému obsahu.

5.3.4 Správnost

Správnost metody byla testována pomocí přidavku známého množství standardu k léčivému přípravku s obsahem daného analytu. Hodnocena byla výtěžnost stanovení (recovery). Pro každý přípravek probíhalo měření na třech různých koncentračních hladinách. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách.

Tabulka 5. 18 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Pavulon

Pavulon (pankuronium bromid)			
Koncentrace vložená [µg/ml]	Koncentrace nalezená [µg/ml]	Recovery [%]	RSD [%]
24,75	25,07	101,31	1,99
49,50	51,24	103,52	0,88
99,00	101,23	102,26	1,52

Tabulka 5. 19 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Norcuron

Norcuron (vekuronium bromid)			
Koncentrace vložená [µg/ml]	Koncentrace nalezená [µg/ml]	Recovery [%]	RSD [%]
24,51	24,96	101,86	1,92
49,02	49,28	100,54	3,04
98,04	97,36	99,31	2,81

Tabulka 5. 20 - Hodnoty výtěžnosti zjištěné přidavkem standardu pro přípravek Esmeron

Esmeron (rokuronium bromid)			
Koncentrace vložená [µg/ml]	Koncentrace nalezená [µg/ml]	Recovery [%]	RSD [%]
24,95	24,97	100,07	1,57
49,90	48,51	97,21	3,28
99,80	100,08	100,28	3,78

Dosažené výsledky potvrzují správnost vyvinuté metody, hodnoty recovery se pohybují v rozmezí 97,21 - 103,52%. Tuto metodu lze použít pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu v léčivých přípravcích Pavulon, Norcuron a Esmeron.

5. 4 Porovnání s dalšími metodami stanovení myorelaxancií

Pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu, případně i jejich nečistot nebo metabolitů, byly publikovány různé metody, nejčastěji chromatografické (viz kapitola 3.3.3; tabulka 3.2).

Porovnávány byly dosažené limity detekce a kvantifikace a čas analýzy.

V této metodě bylo dosaženo LOD 13,2 µg/ml pro pankuronium bromid, 11,1 µg/ml pro vekuronium bromid a 11,3 µg/ml pro rokuronium bromid; LOQ 44,1 µg/ml pro pankuronium bromid, 37,1 µg/ml pro vekuronium bromid a 37,8 µg/ml pro rokuronium bromid. Potřebný čas analýzy byl kratší než 4 minuty.

Dosažené limity detekce a kvantifikace jsou vyšší než LOD a LOQ chromatografických metod, které se pohybují nejčastěji v řádu ng/ml, srovnatelné jsou s porovnávanými metodami kapilární elektroforézy. Vzhledem k tomu, že vypracovaná metoda byla určena pro stanovení účinných látek v léčivých přípravcích, kde je jejich koncentrace v řádu mg/ml, jsou dosažené limity detekce a kvantifikace dostačující. Na rozdíl od metod určených také pro stanovení nečistot daných analytů nebo jejich metabolitů v biologických vzorcích, kde jsou jejich koncentrace nižší, není zde nutná tak vysoká citlivost.

Výhodou této metody byl dosažený nízký čas analýzy. Obecně lze dle porovnávaných metod konstatovat, že časy potřebné pro analýzu jsou u metod kapilární elektroforézy kratší než u chromatografických metod.

Další nezanedbatelnou výhodou proti chromatografickým metodám je spotřeba pouze vodných roztoků, při analýze nejsou používána organická rozpouštědla a je tedy šetrnější k životnímu prostředí.

Při porovnání metod CZE má tato metoda nejvyšší LOD a LOQ, rozdíl zde již ale není tak výrazný jako ve srovnání s chromatografickými metodami. Čas analýzy je prakticky totožný s porovnávanou metodou CZE-CCD [16]. Výhodou vyvinuté metody je možnost separace také rokuronium bromidu, což dříve publikovaná metoda neumožňovala, rokuronium bromid a vekuronium bromid zde nebyly dostatečně rozlišeny. Hlavní rozdíl mezi těmito metodami spočívá v použitém BGE, v metodě [16] byl použit borátový pufr o pH 9,5, zatímco ve vyvinuté metodě probíhá separace v kyselém prostředí acetátového pufru o pH 5,75, kde jsou analyty na rozdíl od zásaditého prostředí stabilní.

6. Závěr

Z výsledků této diplomové práce vyplývají následující závěry:

- Byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu v léčivých přípravcích Pavulon, Norcuron a Esmeron.
- Separace probíhala v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 75 cm a efektivní délce 45 cm.
- Jako optimální základní elektrolyt byl použit acetátový pufr o hodnotě $\text{pH} = 5,75$, které bylo upravováno pomocí 1M roztoku NH_3 , koncentrace kyseliny octové byla 30 mmol/l, základní elektrolyt obsahoval přídavek hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu o koncentraci 20 mg/ml.
- Vkládané napětí bylo 20 kV, analýza probíhala při teplotě 25°C.
- Jako vhodný vnitřní standard byl zvolen fenyltrimethylamonium jodid.
- Při použití optimálních podmínek analýzy byly následující migrační časy: IS 2,3 min; PAN 2,7 min; VEC 2,9 min; ROC 3,2 min.
- Kalibrační závislosti byly testovány pro rozsah koncentrací 50 – 250 $\mu\text{g/ml}$ pro všechny tři analyty; korelační koeficienty byly 0,9954 pro pankuronium bromid, 0,9983 pro vekuronium bromid a 0,9962 pro rokuronium bromid.
- Hodnoty parametrů způsobilosti systému byly následující: asymetrie 1,87 – 2,26; rozlišení mezi sousedními píky 2,58 – 10,10; počet teoretických pater 24788 – 32980.
- Opakovatelnost metody byla hodnocena určením relativní směrodatné odchylky migračních časů a poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu; pro 6 měření jednoho vzorku bylo RSD migračních časů 0,72 – 0,84% a RSD poměru korigovaných ploch 1,18 – 1,73%; při hodnocení opakovatelnosti ze šesti vzorků měřených vždy třikrát (celkem 18 analýz) bylo dosaženo RSD migračních časů 0,20 – 0,23%, RSD poměru korigovaných ploch 1,36 – 2,26%.
- Dosažené limity detekce byly 13,2 $\mu\text{g/ml}$ pro pankuronium bromid, 11,1 $\mu\text{g/ml}$ pro vekuronium bromid a 11,3 $\mu\text{g/ml}$ pro rokuronium bromid; limity kvantifikace 44,1 $\mu\text{g/ml}$ pro pankuronium bromid, 37,1 $\mu\text{g/ml}$ pro vekuronium bromid a 37,8 $\mu\text{g/ml}$ pro rokuronium bromid.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení pankuronium bromidu, vekuronium bromidu a rokuronium bromidu ve farmaceutických přípravcích Pavulon, Norcuron a Esmeron. Zjištěný obsah byl pro přípravek Pavulon 101,09%, pro přípravek Norcuron 99,47% a pro přípravek Esmeron 100,31% obsahu deklarovaného výrobcem. V průběhu tří dnů byla stanovena mezidenní přesnost u každého přípravku, RSD stanoveného obsahu byla pro přípravek Pavulon 2,25%, pro přípravek Norcuron 1,50% a pro přípravek Esmeron 2,30%.

- Správnost byla ověřena metodou standardního přídávku na třech koncentračních hladinách a vyjádřena jako výtěžnost (recovery). Hodnoty recovery byly v rozmezí 101,31 – 103,52% pro přípravek Pavulon, 99,31 – 101,86% pro přípravek Norcuron a 97,21 – 100,28% pro přípravek Esmeron.

7. Použitá literatura

1. LAUER, H. H. a ROZING, G. P. *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. 2. přeprac. vyd. Agilent Technologies, 2010, 172 s.
2. LUŽOVÁ, V. *Elektroforetické stanovení vybraných myorelaxancií s využitím bezkontaktní vodivostní detekce*. Diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2011, 68 s.
3. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 3968 s.
4. BAKER, D. R. *Capillary electrophoresis: Theory and Practice*. 2. vyd. New York: John Wiley and Sons, 1995, 244 s.
5. <http://www.doping.chuv.ch/en/lad-ec-zone-eng.jpg>, [vid. 24. 3. 2012]
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis, [vid. 24. 3. 2012]
7. DOLNÍK, V. *Úvod do kapilární elektroforézy*. 1. vyd. Brno: ÚACH AV ČR a Chromspec, 1994, 67 s.
8. KRAUS, T. *Cyklodextriny* [online]. Praha: ÚOCHB AV ČR [vid. 24. 3. 2012]. Dostupné z: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin>, [vid. 24. 3. 2012]
10. HESS, L. Sugammadex – nová koncepce antagonistování steroidních svalových relaxancií. *Remedia*. 2008, 454 – 456
11. <http://en.wikipedia.org/wiki/Sugammadex>, [vid. 24. 3. 2012]
12. LINCOVÁ, D. a FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, 672 s.
13. *SPC přípravku Pavulon* [online]. [vid. 24. 3. 2012]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC100007.doc>
14. *SPC přípravku Norcuron* [online]. [vid. 24. 3. 2012]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC26321.pdf>
15. *SPC přípravku Esmeron* [online]. [vid. 24. 3. 2012]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC112281.doc>
16. PETRŮ, K., JÁČ, P., LUŽOVÁ, V., KUNEŠ, J. a POLÁŠEK, M. Determination of muscle relaxants pancuronium and vecuronium bromide by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. 2011, 32, 890 – 895
17. BŁAŻEWICZ, A., FIJAŁEK, Z., WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ, M. a BORUTA, M. Simultaneous determination of rocuronium and its eight impurities in pharmaceutical preparation using high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1149, 66 – 72
18. BŁAŻEWICZ, A., FIJAŁEK, Z., SARNA, K. a WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ, M. Determination of pancuronium and its impurities in pharmaceutical preparation by LC with charged aerosol detection. *Chromatographia*. 2010, 72, 183 – 186
19. GARCÍA, P. L., GOMES, F. P., SANTORO, M. I. R. M., KEDOR-HACKMANN, É. R. M., QUERO, J. L. V., MONTÓN, A. N., MONTOYA, G. C. a CABRERA, M. A. Determination of vecuronium bromide in pharmaceuticals: development, validation and comparative study of HPLC and CZE analytical methods. *Chromatographia*. 2011, 73, 799 – 805

20. KLEEF, U. W., PROOST, J. H., ROGGEVELD, J. a WIERDA, J. M. K. H. Determination of rocuronium and its putative metabolites in body fluids and tissue homogenates. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 1993, 621, 65 – 76
21. GAO, L., RAMZAN, I. a BAKER, B. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for rocuronium with potential for quantifying its metabolite, 17-desacetylorcuronium, in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2001, 757, 207 – 214
22. PROBST, R., BLOBNER, M., LUPPA, P. a NEUMEIER, D. Quantification of neuromuscular blocking agent rocuronium and its putative metabolite 17-desacetylorcuronium in heparinized plasma by capillary gas chromatography using a nitrogen sensitive detector. *Journal of Chromatography B*. 1997, 702, 111 – 117
23. STANKOV-JOVANOVIĆ, V. P., NIKOLIĆ-MANDIĆ, S. D., MANDIĆ, L. M. a MITIĆ, V. D. Cholinesterase inhibition based determination of pancuronium bromide in biological samples. *Analytical and bioanalytical Chemistry*. 2006, 385, 1462 – 1469
24. *Quick Start Guide – User's manual, Data Acquisition and analysis Software*, PP van Mierlo, 2000
25. ŠABARTOVÁ, J. Validace analytických metod v kontrole léčiv. *Věstník SÚKL 1/1994*. 1993, 6 – 8