

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**STANOVENÍ PERORÁLNÍCH ANTIDIABETIK KAPILÁRNÍ
ELEKTROFORÉZOU**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Petr Cimbál

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za trpělivost, čas, ochotu a odborné rady, které mi věnoval po celou dobu vypracovávání mé bakalářské práce.

1. Úvod

Dnes žijeme v uspěchané době, ve které společnost dostatečně nebere ohledy na dobrou životosprávu. Do této oblasti spadá vyvážená strava, dostatečné množství pohybu, snižování nebo vyhýbáním se stresovým situacím a další faktory patřící do správného životního stylu. Důsledkem toho se zněkolikanásobil výskyt civilizačních onemocnění jako kardiovaskulární komplikace, diabetes mellitus 2, onemocnění pohybového aparátu atd.

V mé práci bych se chtěl zaměřit na léčiva diabetes mellitus 2, neboli cukrovku druhého typu, a to perorálními antidiabetiky, které se chci naučit dokazovat pomocí standartu na kapilární elektroforéze s detekční technikou UV-VIS absorbance. Tato metoda je velmi rychlá, má malou spotřebu vzorku a rozpouštědla, což umožňuje nízké provozní náklady.

1.1 Introduction

Today we live in hectic times, in which society doesn't care enough for a healthy diet. This includes a balanced diet, adequate amount of movement, reducing or avoiding stressful situations and other factors belonging to a healthy lifestyle. As a consequence of this lifestyle civilization diseases, such as cardiovascular complications, 2 diabetes mellitus, musculoskeletal diseases, etc. have multiplied their occurrence.

In my work I would like to focus on drugs used for healing diabetes mellitus 2, and the detection of agents, which I want to learn to prove by standard capillary electrophoresis with UV detection technique.

This method is very fast and has low consumption of sample and solvent, which allows lower operating costs.

2. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je nemoc, při které tělo ztratilo schopnost správného hospodaření s cukrem. Jako hlavní následek je zvýšená hladina krevní glukózy. První dokumentované případy pochází z dob antiky, kde se jako hlavní důkaz považoval sladká chuť moči. Diabetes mellitus znamená v překladu: medově sladký průtok.

V současné době je diabetes mellitus nejrozšířenější metabolickou chorobou. V roce 2000 se počet evidovaných diabetiků v České republice pohyboval u 648 000, dnešní odhady hovoří o jednom milionu. Z těch 648 000 nemocných mělo přibližně 55 000 diagnózu diabetes mellitus 1. typu. U této varianty cukrovky se již ve slinivce břišní neprodukuje inzulin a přežití nemocného je nerozlučně spjata s celoživotní léčbou inzulinem.

Zbýlých 593 000 nemocných mělo diabetes mellitus 2. typu, u kterého vznikají dvě poruchy. První je snížená produkce inzulinu a druhá ztráta citlivosti tkání na inzulin. Zastoupení těchto dvou poruch u nemocného může být případ od případu rozdílný¹.

Vedle rozpoznaných případů onemocnění diabetes mellitus 2. typu zůstává v naší populaci velký počet případů, kdy nemoc kvůli chybějícím vnějším příznakům není objevena. Tento stav je pro nemocné značně nebezpečný. 75 % nemocných na diabetes mellitus 2. typu umírá kvůli kardiovaskulárním komplikacím².

Tabulka č.I: Hodnoty stanovené pro snížení rizika kardiovaskulárních komplikací².

	Výborná	uspokojivá	Neuspokojivá
glykémie nalačno (mmol/l)	4.0 – 6.0	6.0 – 7.0	nad 7.0
glykémie po jídle (mmol/l)	5.0 – 7.5	7.5 – 9.0	nad 9.0

Léčba diabetes mellitus 2. typu je založená na změně životního stylu nemocného. Jako hlavní prvek se považuje celoživotní individuální dieta přizpůsobena na pacienta s vhodným druhem fyzického pohybu. Jestli po této životní změně zůstane hladina glykémie příliš vysoká podávají se perorální antidiabetika. Jako poslední řešení je možno ještě podávat inzulin.

Diabetes mellitus je neléčitelnou nemocí, jediné co můžeme udělat je zmírnit až odstranit příznaky.

3. Perorální antidiabetika

Jako počátkem perorálních antidiabetik se považuje diguanidinový preparát, který byl na světový trh zaveden v roce 1926. Zasloužil se o to A. F. Frank, M. Nothmann a A. Wagner pod jménem Symthalin A. Poté následoval objev dalších látek snižujících hladinu glukózy v krvi. Jako příklady uvádím: karbutamid 1955, tolbutamid 1956 a biguanid 1957².

Od svého objevení prošla perorální antidiabetika dlouhým vývojem, ve kterém bylo podstatně zredukováno množství efektivní látky, za zachování stejných kladných vlastností. Dále potom zrychlen nástup účinků a zmírněny souvisejícími vedlejšími komplikacemi.

Léčba nemocného diabetes mellitus 2. typu je složitá. Jedním z rozhodujících faktorů je právě dobrá volba použití či kombinace perorálního antidiabetika. Jednotlivé typy se společně kombinují se snahou snížit rizika. Jako jsou: hypoglikemie, laktátové acidózy, nevolnost, ospalost atd. Zajímavá je kombinace metforminu a glitazonu. Obě látky ovlivňují inzulinorezistenci. Na první pohled tedy neúčelná kombinace se ukazuje jako výhodná u osob s významně vyjádřeným syndromem inzulinové rezistence. To proto, že účinky látek se sčítají, neboť ovlivňují inzulinorezistenci každá jiným mechanismem. Další výhodou kombinovaných preparátů je velmi zjednodušeně, pokrytí obou základních poruch u diabetu spolu se zlepšením přehledu pro nemocných, protože tito berou méně tablet³.

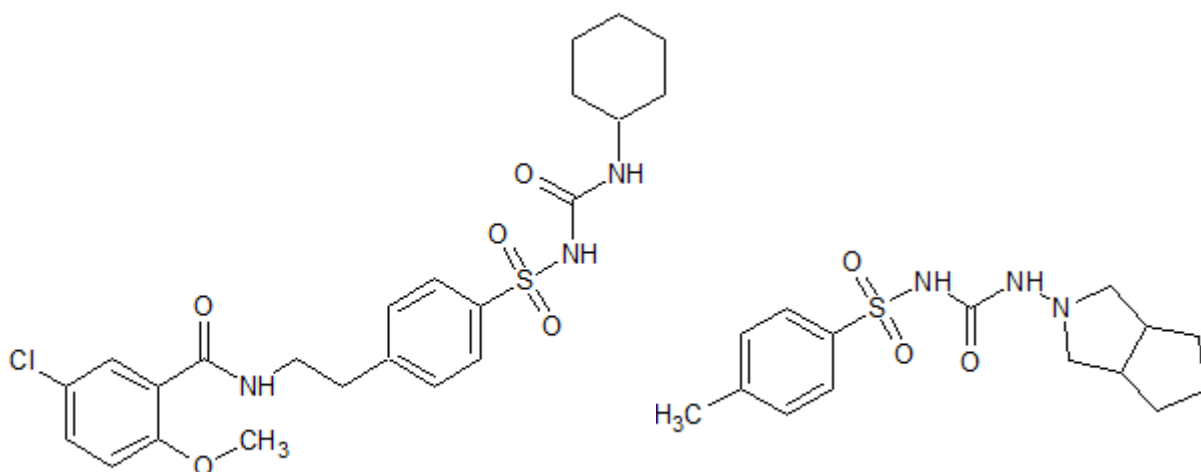
Tabulka č.II: Základní dělení perorálních antidiabetik².

Inzulinová Sekretagoga	Sulfonylmočovinová
	Nesulfonylmočovinová
Ovlivnění inzulinové Rezistence	Metformin
	Tiazolidindiony
Ovlivnění vstřebání sacharidů ze střeva	inhibitory alfa-glukosidázy

3.1 Sulfonylmočovinnové sekretagoga

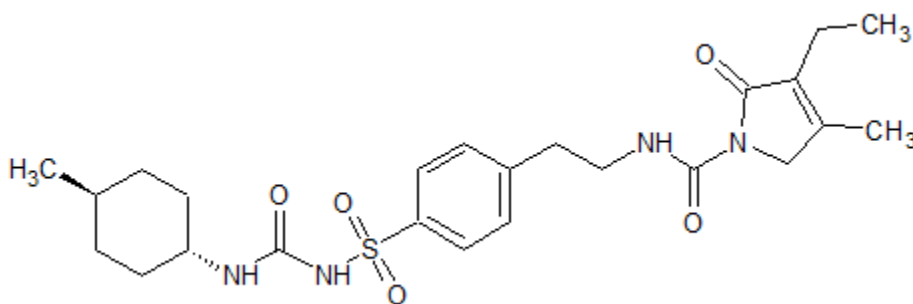
Sulfonylmočovinnové sekretagoga (obr.1) zvyšují hladinu kalcia v β -bunčkách, čímž způsobí přesun sekrečních granul s inzulinem na povrch buněk. Z čehož vyplývá, že perorální antidiabetika nezvyšují produkci inzulinu, ale jen usnadňují jeho uvolňování do krevního řečiště. Z toho je zřejmé, že tento typ antidiabetik se nedá použít při DM 1. typu s absolutním nedostatkem inzulinu, ale také DM 2. typu při vyčerpání inzulinu ze sekrečních granul.

U těchto látek neplatí pravidlo, že s rostoucí dávkou paralelně roste hypoglykémizující účinek. Dále se objevuje nepříjemný pokles citlivosti sulfonylmočovinnových receptorů při dlouhodobém užívání vysokých dávek léčiva a tím související snížení účinnosti samotného léčiva. Léčba těmito antidiabetiky může u pacientů způsobit hypoglykémii a zvýšení hmotnosti, proto je velice důležitá pečlivá volba preparátu a dávka. Nedoporučuje se kombinovat sulfonylmočovinnové PAD s barbituráty, hypnotiky a sedativy. Hrozí totiž riziko prodlouženého účinku.

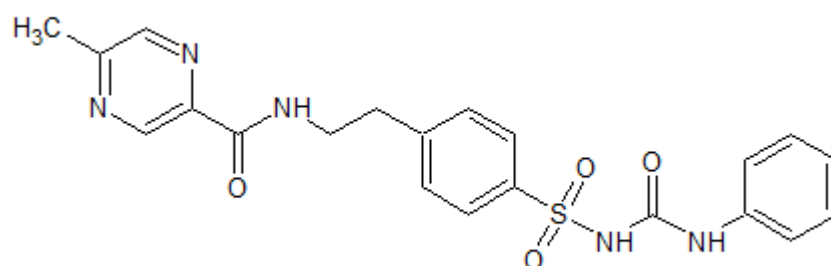


Glybeclamid

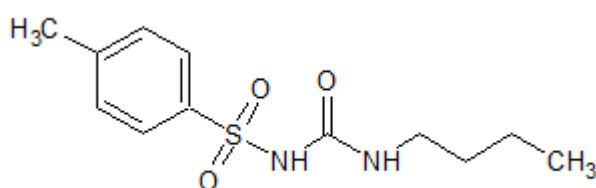
Gliclazid



Glipizid



Glimepirid

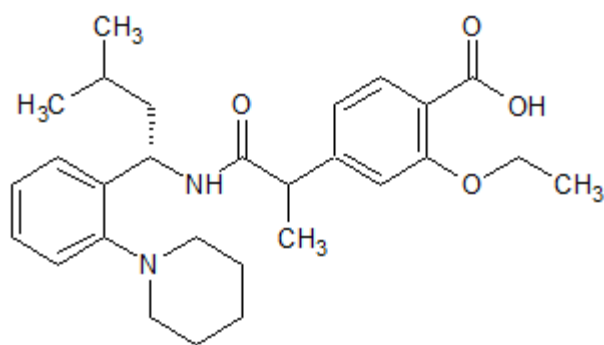


Tolbutamid

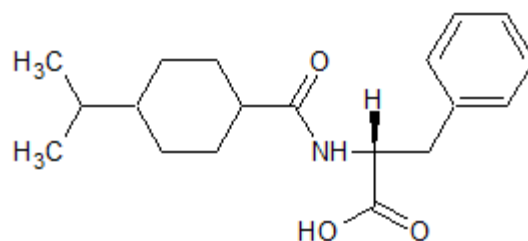
Obr.1: Strukturní vzorce některých sulfonylmočovinových sekretagoga

3.2 Nesulfonylmočovinová sekretagoga

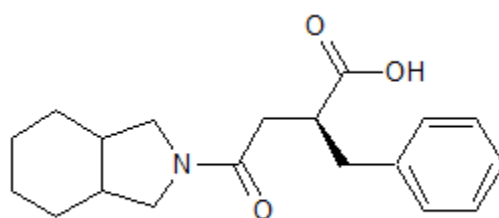
Mají podobný způsob účinku jako sulfonylmočovinové sekretagoga (Obr.2), ale s rychlejším nástupem a ztrátou účinku, vážou se na jiné receptory β -buněk. Nezhoršují lačnou hyperglykémii DM 2. typu, čímž se stávají vhodným lékem pro nemocné s uspokojivou glykémii nalačno a se vzestupující glykémii po jídle. Užívání léku je vázáno na dobu před jídlem a riziko hypoglykémie se vyskytuje jenom po něm. Využívání těchto léčiv umožňuje pacientovi snadnější a volnější rozhodování během dne. Dále mají tyto druhy přípravku minimální riziko zvýšení nadváhy.



Repaglinid



Nateglinid



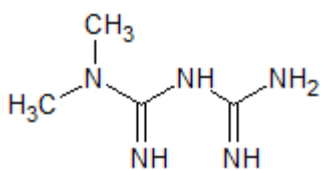
Mitiglinid

Obr.2: Strukturní vzorce některých nesulfonylmočovinných sekretagog

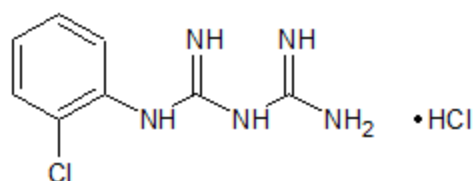
3.3 Biguanidy

Do skupiny biguanidových (Obr.3) antidiabetik patří léky se schopností zvyšovat citlivost buněk na inzulin. Což se používá proti inzulinové rezistenci, která se přednostně vyskytuje u lidí trpících nadváhou/obezitou. Bohužel se požívání těchto léčiv se značně vysokým rizikem laktátové acidózy. Jedinou v dnešní době používanou látkou z této skupiny je metformin. Má totiž nejnižší riziko laktátové acidózy.

Metformin zvyšuje citlivost na inzulin, ovlivňuje metabolismus buněk svalové a tukové tkáně a v hepatocytech tlumí glukoneogenezu. Zpomaluje trávení a vstřebávání cukrů, čímž zjednodušuje redukci hmotnosti. Dále se při léčbě jenom metforminem nevyskytuje hypoglykémie. K nechtěným účinkům patří riziko laktátové acidózy a zažívací potíže. Neměl by být tedy užíván pacienty s oběhovou a respirační nedostatečností a pacienty s porušenou funkcí ledvin a jater. Také se musí vysadit z léčby před rtg vyšetřením, neboť jsou v něm použity kontrastní látky.



Metformin

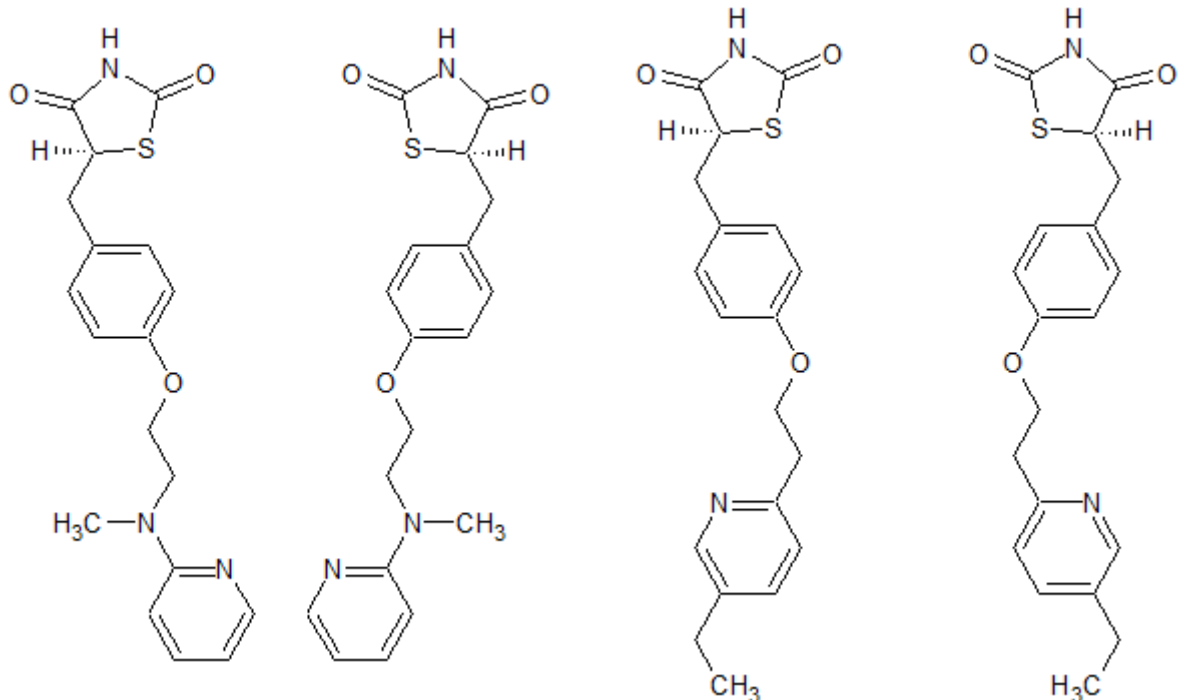


1-(2-Chlorophenyl)biguanide hydrochloride

Obr.3: Strukturní vzorce některých biguanidů

3.4 Tiazolidindiony

Patří mezi nejmladší PAD (Obr. 4). Podporují expresi specifických genů, které kódují procesy s kladným účinkem pro citlivost vůči inzulinu. Podobně jako u metforminu zvyšují citlivosti buněk na inzulin, blokují glukoneogenezu v játrech a zvyšují využití glukózy ve svalové a tukové tkáni. Při léčbě s těmito látkami se první kladné efekty prokazatelně dostaví až po 4-6 týdnech od počátku podávání. U nás se používají jen v podobě kombinovaných přípravků s metforminem nebo s přípravky ze skupiny inzulinových sekretagog.



Rosiglitazon – enantiomery

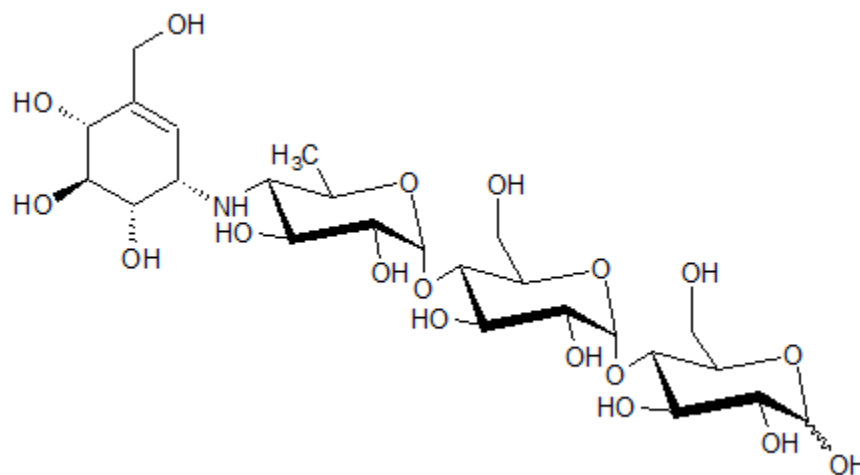
pioglitazon– enantiomery

Obr.4: Strukturní vzorce některých thiazolidindionů

3.5 Inhibitory α -glukosidáz (Akarbóza)

Inhibitory α -glukosidáz se liší od všech ostatních skupin PAD. Nepůsobí totiž na buňky organismu a jejich metabolismus, ale blokují štěpení sacharidů ve střevě a tím i následné vstřebávání jednoduchých cukrů do krevního oběhu. Jsou vhodné pro léčbu DM. 1. i 2. typu.

Přípravek se užívá během jídla a tím podobně jako nesulfonylmočovinová sekretagoga umožňuje pacientovi snadnější a volnější rozhodování během dne. Bohužel nevstřebaný cukr vyvolává dyspeptické potíže – nadýmání, flatulence a průjem. Další velkou výhodou je, že v monoterapii akarbóza nezpůsobuje hypoglykémii²⁻⁵.



Akarbóza

Obr.5: Strukturní vzorec inhibitoru α -glukosidázy

4. Analyzované látky

Pro analýzu jsem si zvolil sedm perorálních antidiabetik. Pět ze skupiny sulfonylmočovinových sekretagog, glybenclamid, gliclazid, glipizid, glimepirid a tolbutamid. Dále potom jedno nesulfonylmočovinové sekretagogum, repaglinid a jedno ze skupiny biguanid, metformin.

Tabulka č.III: Přehled vybraných fyzikálních a chemických vlastností zvolených perorálních antidiabetik⁶.

	Molární hmotnost (g/mol)	Rozpustnost	pK (20°C)	Log P (oktanol-voda)
glybenclamid	494.00	Ethanol	5.3	4.8
gliclazid	323.41	Ethanol	5.8	2.1
glipizid	445.54	Ethanol	5.9	1.9
glimepirid	490.62	Ethanol	-	-
tolbutamid	270.35	Ethanol	5.3	2.3
repaglinid	452.59	voda, ethanol	-	-

5. Přehled metod pro stanovení perorálních antidiabetik

V odborné literatuře je nejčastěji uváděnou separační metodou kapalinová chromatografie, dále potom tenkevrstevná chromatografie a kapilární elektroforéza. Našel jsem i pár článků, kde nebyla prováděna separace látek, ale přímo detekce pomocí elektrod v základním roztoku.

5.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi nejčastěji používané separační metody ve farmaceutickém průmyslu. Vyznačuje se totiž rychlou separací s vysokou účinností. Dále je možné ji jednoduchým způsobem modifikovat a tím upravit pro separaci různých sloučenin. Tyto úpravy můžeme provádět prostřednictvím změny rozpouštědla nebo změnou stacionární fáze v koloně.

Několikrát byla publikována separace směsi perorálních antidiabetik pomocí této metody. Všechny publikace se shodují v používání kolon s reverzní fází (většinou C_{18}). Mobilní fáze bývají různé vzhledem k vlastnostem separovaných léčiv a použitému detektoru.

Sulfonylmočovinové sekretagoga, přesněji tolbutamin, acetohexamid, chlorpropamid, gliclazid, glybenclamid a glimepirid, byli separováni pomocí zmiňované C_{18} kolony. Kdy využívali gradientu dvou mobilních fází. Jako fáze A byl použit acetonitril a jako B 10 mM octan amonný (pH 4.0). Přičemž na počátku experimentu se skládala mobilní fáze z 30 % A a ze 70 % B. Poté byla složka A během 5 minut zvýšena na 50 % a udržována 7 minut. Jako detektor využívali DAD UV-VIS (Detektor s diodovým polem pro ultrafialovo-viditelnou spektroskopii) v rozmezí 210 až 360 nm. Meze detekce a meze kvantifikace jsou uvedeny v tabulce č.IV⁷.

Tabulka č.IV: Meze detekce a meze kvantifikace⁷.

	Mez detekce (ng/ml)	Mez kvantifikace (ng/ml)
Tolbutamin	1.8	6.0
Acetohexamid	1.1	3.6
Chlorpropamid	1.2	3.9
Gliclazid	1.8	6.1
Glybenclamid	0.8	2.5
Glimepirid	0.9	2.9

Pro separaci glipizidu, gliklazidu, glybeclamidu, glimepiridu, gliquianu a repaglinidu byla taky použita kolona C₁₈ a mobilní fáze byla smíchána z methanolu a 10 mM fosfátového pufru (pH 3.0) v poměru 70:30. Jako detektor využívali UV-VIS s nastavením na 230 nm. Meze detekce a meze kvantifikace jsou uvedeny v tabulce č.V, hodnoty se vztahují na plazmu před extrakcí⁸.

Tabulka č.V: Meze detekce a meze kvantifikace⁸.

	Mez detekce (ng/ml)	Mez kvantifikace (ng/ml)
Glipizid	160	340
Gliclazid	120	380
Glybenclamid	240	770
Glimepirid	260	880
Gliquian	350	1050
Repaglinid	1050	3950

Při separaci metforminu, glipizidu, gliclazidu, glybeclamidu a glimepiridu byla opět použita kolony C₁₈, ale mobilní fáze se skládala z 37.5 % acetonitrilu, 62.5 % dihydrogen fosforečnanu sodného a 2 mM dodecylsulfátu sodného. Experiment byl složen ze dvou fází. Při prvním titrovali mobilní fázi na pH 7.3 a při druhém na pH 6.4. Jako detektor byl použit UV-VIS při 225 nm. Meze detekce a meze kvantifikace pro plazmu jsou uvedeny v tabulce č.VI, hodnoty se vztahují na plazmu před extrakcí⁹.

Tabulka č.VI: Meze detekce a meze stanovitelnosti⁹.

	Mez detekce (ng/ml)	Mez kvantifikace (ng/ml)
Metformin (pH 7.3)	3.0	5.0
Metformin (pH 6.4)	9.9	16.5
Glipizid	4.5	7.5
Gliclazid	13.5	22.5
Glybeclamid	4.0	7.0
Glimperid	4.5	7.5

V další práci srovnávali vlastnosti tří detektorů UV-VIS, CAD (detektor pro detekci nabytých částic aerosolů) a ELSD (detektor rozptylu světla). Separovali při tom glipizid, gliclazid, glybenclamid a glipirid. Separace zase probíhala na C₁₈ koloně s mobilní fází přichystanou z 35 % směsi A (89.9 % vody, 0.1 % kyseliny octové a 10 % acetonitrilu) a 65 % směsi B (10 % voda a 90 acetonitril). Meze detekce pro jednotlivé detektory jsou uvedeny v tabulce č.VII¹⁰.

Tabulka č.VII: Meze detekce pro jednotlivé detektory¹⁰.

	UV-VIS (ng/μl)	CAD (ng/μl)	ELSD (ng/μl)
Glipizid	3.6	2.5	7.3
Gliclazid	4.7	1.6	7.6
Glybenclamid	4.5	4.8	7.6
Glimepirid	2.7	2.1	7.7

Velice užitečné je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. V jedné publikaci pomocí tohoto spojení rozseparovali 10 perorálních antidiabetik (glipizid, glybenclamid, glimepirid, gliclazid, tolazamid, tolbutamid, nateglinid, repaglinid, rosiglitazon a pioglitazon). Využívali kolonu C₈ a mobilní fáze byla složena z dvou roztoků, které vytvářeli gradient. Jako roztok A byl 10 mM mravenčan amonný a jako B methanol. Separace trvala 13 minut a během prvních 8 minut separace se plynule zvyšoval obsah roztoku B z 30 % na 100 %. Mez detekce byla 1 ng/ml pro moč a plazmu před extrací¹¹.

V roce 2005 vyšla publikace zaměřená na separaci pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, ve které je popsána separace 13 perorálních antidiabetik (glybenclamid, glibornurid, gliclazid, glimepirid, glipizid, gliquidon, metformin, nateglinid, pioglitazon, repaglinid, rosiglitazon, tolazamid a tolbutamid). Při této separaci používali kolonu C₁₈. Mobilní fáze byla zase složena z dvou roztoků, které vytvářeli gradient. Jako roztok A byla 0.1% kyselina octová a jako B acetonitril. Separace trvala 6 minut a v tomto časovém rozmezí se plynule zvyšoval obsah roztoku B z 20 % na 100 %. Mez detekce byla 10 ng/ml (u tolbutaminu ležela u 30 ng/ml) pro moč před extrakcí¹².

Ke kapalinové chromatografii můžeme připojit i elektrochemický detektor a pomocí něho stanovovat perorální antidiabetika. V jedné publikaci je popsána metoda pro stanovení gliklazidu pomocí elektrochemického detektoru. Zase byla použita C₁₈ kolona s mobilní fází složenou ze 73.5 % 70 mM tetraboritanu sodného o pH 7.5 a 26.5 % acetonitrilu. Mez detekce byla 10 nM pro plazmu před extrakcí¹³.

5.2 Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie se používá pro separaci látek při jejich analýzách a výzkumu syntéz. Umožňuje totiž rozseparovat větší množství zkoumané látky a její další zpracování. Dále je možné pomocí tenkovrstevné chromatografie separovat několik vzorků zároveň během pokusu.

V publikaci zaměřenou na separaci metforminu od glybenclamidu ze současných přípravků pro léčbu diabetu 2. typu. Používali jako stacionární fázi silikagel 60 a jako mobilní fázi směs vody a methanolu (2:1) s přídavkem síranu amonného (0.5%). Desky se silikagelem vyhodnocovali absorpčním měřením při 237 nm. Mez detekce a mez kvantifikace pro metformin byli 25.24 ng a 84.12 ng a pro glybenclamid 12.26 ng a 40.86 ng¹⁴.

V roce 2005 byl zveřejněn způsob separace 6 perorálních antidiabetik (tolbutamin, acetoheksamid, chlorpropamid, gliclazid, glybenclamid a glimepirid) pomocí této metody. Jako stacionární fázi použili silikagel 60 a jako mobilní fázi použili acetyl acetátu s přídavkem kyselinou mravenčí (0,4 %). Detekci látek prováděli pomocí absorpčním měřením při 254 nm (UV), Dragendorfova činidla (DD), roztoku methanolu s tetrakis(trimolybdáto)fosforečné kyseliny (PM) a methanolem s kyselinou sírovou (SA). Mez detekce jednotlivých detekčních metod jsou uvedeny v tabulce č.VIII⁷.

Tabulka č.VIII: Meze detekce pro jednotlivé detekční metody, - nedetekovatelné⁷.

	UV (μg)	DD (μg)	PM (μg)	SA (μg)
Tolbutamin	2.0	-	-	-
Acetohexamid	0.01	-	-	-
Chlorpropamid	0.5	-	-	-
Gliclazid	0.5	2.0	0.25	-
Glybenclamid	0.5	0.5	-	0.25
Glimepirid	0.25	1.0	-	-

5.3 Kapilární elektroforéza

Několik publikací poukazovalo na úspěšné využití kapilární elektroforézy při separaci perorálních antidiabetik. Hlavní pozornost přitom byla věnována na vývoj rychlé a levné metody pro kontrolu farmaceutické výroby těchto sloučenin a stanovování stopových množství v biologických vzorcích. Hlavně v krvi a moči lidí trpících diabetes 2 typu.

Průmyslově použitelná separace byla popsána v publikaci, kde se zaměřili na separaci rosiglitazonu a metforminu v používaném léčivu. Při separaci využívali křemenou kapiláru (75 μm průměr). Elektrolyt pro separaci představoval roztok octanu sodného o koncentraci 25 mM titrovaného na pH 4.0 ledovou kyselinou octovou. Jako detektor použili UV-VIS při 203 nm. Mez detekce pro tyto látky byla 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a mez stanovitelnosti 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹⁵.

Velice dobré výsledky při separaci perorálních antidiabetik získáme pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Pomocí této metody byla popsána separace glipizidu, glybenclamidu, acetohexamidu, chlorpropamidu, tolazamidu a tolbutamidu. Jako elektrolyt používali směs složenou z 20 mM borátu sodného s 20 mM fosfátem sodným a 150 mM SDS (pH 8.5). Pomocí snížení koncentrací složek elektrolytu (5 mM borát sodný, 5 mM fosfát sodný) snížily dobu separace na 10 minut při zachování stejného rozlišení. Dále srovnávali různé povrchově aktivní látky a jako ekvivalentní náhradu za SDS našli cholát sodný. Jako detektor použili UV-VIS při 200 nm a DAD UV-VIS v rozmezí 200 až 350 nm. Mez detekce pro tyto látky byla 50 ng/ml pro moč před extrakcí¹⁶.

O dva roky později (v roce 1997) vychází publikace, ve které separují šest výše zmiňovaných perorálních antidiabetik. Využívají přitom micelární elektrokinetickou

chromatografii s elektrolytem složeným ze směsi z 5 mM borátem s 5 mM fosfátem a 75 mM cholátem sodným (pH 8.5). Jako detektor použili UV-VIS při 200 nm a DAD UV-VIS v rozmezí 190 až 350 nm. Tento postup umožňoval stanovit zmíněné perorální antidiabetika v moči až 24 hodin po podání 5 mg léčiva, což představuje koncentraci 300 až 500 ng/ml¹⁷.

Online prekoncentrační metoda je popsána v publikaci zaměřenou na separaci 6 perorálních antidiabetik (glipizid, glybenclamid, chlorpropamid, acetohexamid, tolbutamid, tolazamid). Zde využívali křemennou kapiláru upravenou tak, aby umožnila zakoncentrování vzorku na začátku kapiláry (takzvanou SPE-CE solid-phase extraction-capillary electrophoresis). Na začátek kapiláry je úsek obsahující náplň z kolony C₁₈ pro kapalinovou chromatografii, když vzorek prochází tímto úsekem hydrofobní sloučeniny jsou zde zadrženy. Jako elektrolyt používali 250 mM borát s 5 mM fosfátem (pH 8.4) a pro uvolnění antidiabetik ze stacionární C₁₈ fáze použili směs z 20 % elektrolytu a 80 % acetonitrilu (po dobu 0,33 min. celá analýza trvala 25 minut). Jako detektor použili UV-VIS při 200 nm. Mez detekce se pohybovala 20 ng/ml¹⁸.

5.4 Potenciometrie

Je analytická metoda při, které stanovujeme rovnovážný potenciál vznikající na elektrodách. Reverzibilní elektrody můžeme dělit na několik druhů: elektrody I. druhu, elektrody II. druhu, redoxní elektrody a iontově selektivní neboli membránové elektrody.

Pro perorální antidiabetika jsou používány iontově selektivní elektrody. Při stanovení metforminu byly použity membránové elektrody typu metformin-tungstosilicate (MR-TSA), metformin-reinektat (MR-RE) a PVC-karboxylát (PVC-CA). Argentchloridová elektroda byla dále použita jako referenční. Meze detekce pro MR-TSA elektrodu byla 5.5×10^{-6} mol/l, pro MR-RE elektrodu byla 5.2×10^{-5} mol/l a pro PVC-CA elektrodu 6.9×10^{-6} mol/l¹⁹.

Při stanovení glybenclamidu byla zase použita heterogenní uhlíková elektroda (CPE) a Sephadexem modifikovaná heterogenní uhlíková elektroda (MSCPE), pro zvýšení životnosti. Jako pomocnou elektrodu si zvolili platinovou a Argentchloridová elektroda byla referenční. Jako základní roztok pro analýzu si zvolili Britton-Robinsonův pufr (0.04 mol/l). Mez detekce bez akumulace ležela u 3×10^{-7} mol/l. Se 60 sekundovou akumulací se snížila na 1×10^{-8} mol/l a s 180 sekundovou akumulací se dále snížila na 4×10^{-10} mol/l²⁰.

6. Kapilární elektroforéza

6.1 Historie kapilární elektroforézy

V roce 1937 zavedl Arne W. K. Tiselius elektroforézu mezi separační techniky. Jeho pokusy byly založeny na pozorování směsi bílkovin a pufrů ve zkumavce, na kterou připojil elektrody. Po aplikaci elektrického pole zjistil, že se jednotlivé proteinové řetězce pohybují k elektrodám s opačným nábojem než je náboj řetězce, a že rychlost pohybu závisí na náboji a velikosti řetězce. V roce 1948 získal Nobelovu cenu za chemii.

Dalším vývoj elektroforézy spočíval v hledání anti-konvenčního media, které mělo snížit tepelnou difúzi a konvenci. Jako účinné řešení těchto jevů se uplatnily polyakrylamidové a agarózové gely. Což položilo základy pro rozvoj polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) a SDS-PAGE, které dodnes patří k nepostradatelným separačním metodám v oblasti biochemie. Velkou nevýhodou těchto metod je značně dlouhá doba analýzy, problémy s detekcí a automatizací.

V roce 1969 vypracoval Vestenberg metodu přípravy amfolytů, které jsou vhodné pro izoelektrickou fokusaci (IEF) směsí proteinů. Zkombinováním SDS-PAGE s IEF vznikla dvourozměrná analytická metoda, která je z hlediska rozlišení jednou z nejvýkonnějších separačních metod.

V 70. a 80. letech došlo k bouřlivému rozvoji vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Nevýhodou této metody je však velké množství organického odpadu, a proto bylo velkou snahou vyvinout úspornější metodu jakou je právě CE.

Alternativou ke gelové elektroforéze tvoří kapilární elektroforéza, kde kvůli malému průměru kapiláry a elektroosmotickému toku dochází jen k minimálnímu konvektivnímu proudění a difúzi.

Vývoj metody začal pokusy s kapilárami o průměru 1-3 milimetru, jiné nebyly v té době ještě dostupné, když Hjerten je nechával rotovat kolem podélné osy, aby tím zabránil konvekci.

Druhým krokem ve vývoji metody představují na sobě nezávislé pokusy od Virtanena a Mikkerseho, kteří prováděli pokusy na kapiláře zhotovené ze skla a teflonu o vnitřním průměru 200 μm .

Třetí podstatná změna proběhla kolem roku 1980, kdy Jorgenson a Lukacs vylepšily techniku používáním 75-100 μm kapiláry z křemene potažené polyimidem. A zároveň poukázali na potenciál metody úspěšnou separaci proteinů.

V roce 1984 Terabe využil v kapilární elektroforéze povrchově aktivní látky a umožnil tím separaci neutrálních látek. Tím vytvořil micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC).

Na konci 80. let byla zahájena komerční výroba přístrojů pro CE^{21,22}.

V současné době se kapilární elektroforéza a její varianty využívají při separaci organických molekul a anorganických iontů. S velice malou spotřebou pracovního elektrolytu a nízkou časovou náročností.

6.2 Elektroforéza

Základním principem elektroforézy jako analytické separační metody je, že jde o přenos hmoty vyvolaný elektrickým polem, kdy různé látky tvořící i směsnou zónu urazí určitou část migrační dráhy a při tom se směs rozdělí na zóny jednotlivých látek. Jakmile je směs takto rozdělena na zóny jednotlivých látek, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. V kapilární elektroforéze se prakticky výhradně používá detekce v on-line uspořádání. To znamená, že po dosažení separace se nevypíná proud, ale v elektroforéze se pokračuje. Látky (již separované) migrují kapilárou dále, až všechny postupně projdou určitým místem, kde je detekční cela. Záznam analýzy, tj. elektroforeogram, reprezentuje závislost odezvy (měřeného signálu) na čase²³.

Separace látek v kapiláře závisí na několika jevech. Mezi hlavní patří rychlost pohybu iontu a související elektroosmotický tok, difúze a sorpce na povrch kapiláry.

6.3 Rychlost pohybu molekul

Celková rychlost iontu je určena součtem elektroforetické rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku

$$v = v_{EM} + v_{EOF}$$

v – celková rychlost, v_{EM} - elektroforetická rychlost, v_{EOF} - rychlost elektroosmotického toku

Přičemž pro separaci jednotlivých látek je podstatná elektroforetická rychlost, která je součtem elektroforetické mobility a intenzity elektrického pole.

$$v_{EM} = \mu_e \times E$$

v_{EM} - elektroforetická rychlost, μ_e - elektroforetická mobilita, E - intenzity elektrického pole

Elektrické pole je funkcí napětí a délky kapiláry (volt/cm). Mobilita iontu pro určité prostředí je konstantou charakterizující iont. Závisí na viskozitě prostředí, náboji a poloměru iontu.

$$\mu_e = \frac{z}{6\pi \eta r}$$

μ_e - elektroforetická mobilita, z – náboj iontu, η - viskozita roztoku, r - poloměr kulového iontu

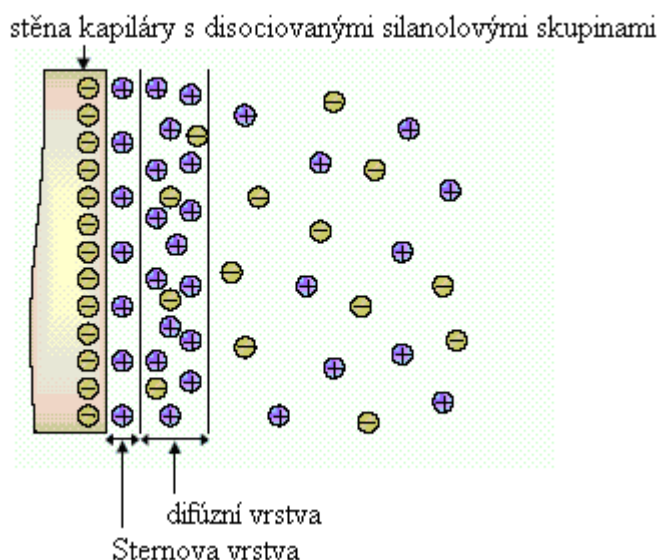
Ze vztahu vyplývá, že ionty s malým poloměrem a velkým nábojem budou mít vyšší elektroforetickou mobilitu než ionty s velkým poloměrem a malým nábojem. A protože elektroforetická mobilita je jedním z parametrů ovlivňující rychlost. Má menší molekula s větším nábojem vyšší rychlost než větší s menším nábojem. A na detektoru tím uvidíme jako první odezvu malé molekuly²¹.

6.4 Elektroosmotický tok

Jak jsem již zmínil je elektroosmotický tok (Electro-osmotic flow - EOF) neboli elektroosmóza jedním z hlavních jevů ovlivňujících celkovou rychlost pohybu látek při kapilární elektroforéze. Jedná se o tok kapaliny v kapiláře, který je následkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry. Náboj vzniká v důsledku ionizace vnitřního povrchu nebo adsorpcí iontových sloučenin na vnitřní povrch kapiláry. U často používaných křemenných kapilár probíhají oba děje současně, ale ionizace silanolových skupin SiOH na iontovou formu SiO⁻, roste s hodnotou pH a od určité velikosti pH se stává rozhodujícím prvkem pro rychlost toku. Kapiláry zhotovené z neiontového materiálu jako je teflon si náboj na vnitřní stěně vytváří adsorpcí aniontů z elektrolytu.

Pro zachování elektroneutality se shromažďují u těchto záporně nabitých skupin kationty z elektrolytu a tím vzniká dvojvrstva (Obr.6). Její struktura se skládá z několika částí.

Na vnitřní straně kapiláry je nepohyblivá vrstva právě těchto negativně nabytých silanolových skupin. Ty jsou kompenzovány nepohyblivou vrstvou opačného náboje vznikající z kationtů - Sternova vrstva. A druhou pohyblivou difúzní vrstvou. Jelikož jsou tyto kationty solvatovány, jejich pohyb vyvolá tok celého roztoku v kapiláře ke katodě.



Obr.6: Rozmístění nábojů v kapiláře²²

Rychlost EOF vyjadřujeme podobně jako u rychlosti elektroforetické pomoci mobility.

$$v_{EOF} = \left(\epsilon \frac{\zeta}{\eta} \right) E$$

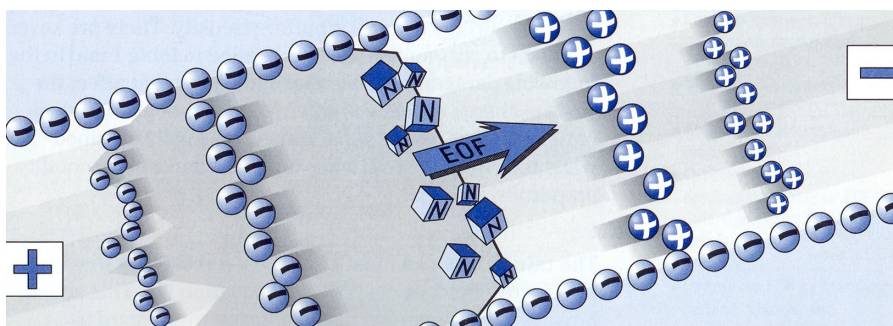
$$\mu_{EOF} = \left(\epsilon \frac{\zeta}{\eta} \right)$$

v_{EOF} - rychlost elektroosmotického toku, μ_{EOF} - elektroforetická mobilita elektroosmotického toku, ϵ - dielektrická konstanta a ζ - zeta potenciál, E - intenzity elektrického pole.

Zeta potenciál je potenciálový rozdíl mezi Sternovou vrstvou a nábojem kapiláry. Poněvadž je silně závislý na pH, i velikost EOF se mění s pH. Pod pH 2 je disociace malá a EOF není významný, nad pH 12 jsou silanolové skupiny plně disociovány a rychlost EOF je nejvyšší. V určitých podmínkách se může hodnota EOF lišit až o jeden řád. Dále velikost rychlosti EOF závisí na iontové síle elektrolytu, neboť s rostoucí iontovou silou se snižuje hodnota dvojvrstvy a tím klesá i zeta potenciál a EOF.

Unikátní znak EOF, je jeho profil. Na rozdíl od čerpadly poháněnými přístroji, kde kvůli smykovým silám má profil podobu paraboly, je profil EOF plochý. Významně tím podporuje schopnosti rozlišování látek, protože nepřispívá k rozmývání zón. Další vlastností

EOF je skutečnost, že způsobuje pohyb všech částic, bez ohledu na jejich náboj a velikost, ve stejném směru. Za normálních okolností (tj. záporně nabitý povrch kapiláry, bez povrchově aktivních látek) se analyty pohybují od anody ke katodě. V tom případě kationty migrují nejrychleji, protože migrace kationtů ke katodě a EOF jsou ve shodném směru. Všechny neutrální látky putují rychlostí EOF a nejsou od sebe separovány. Anionty migrují nejpomaleji. Jsou přitahovány k anodě a jejich rychlost se odečítá od rychlosti EOF. Proto pro separaci směsi látek během jediné analýzy musí mít EOF dostatečně vysokou hodnotu (Obr.7). EOF sám o sobě analyzované ionty nedělí, pouze čerpá roztok elektrolytu z jedné nádoby do druhé.



Obr.7: EOF v CZE ²¹

Při analýzách je nutné umět přizpůsobovat rychlost EOF, neboť při vysoké rychlosti toku může vzorek projít kolem detektoru aniž by byl rozseparovaný. Naopak při příliš nízké rychlosti se separace zbytečně prodlužuje, zvyšuje se rozmytí zón důsledkem disperze a anionty nemusí vůbec domigrovat k detektoru. Nejjednodušším způsobem jak ovlivnit rychlost je změnit intenzitu elektrického pole, volbou jiného pH, iontové síly a nebo přidáním povrchově aktivních látek (tenzidů), které pokryjí vnitřní povrch kapiláry a změni rychlost, popřípadě i směr toku ^{21 - 23}.

6.5 Migrační čas

Migrační čas t_m představuje dobu, která uplyne od nadávkování vzorku po detekci jednotlivých zón detektorem. Ionty lišící se v elektroforetických rychlostech se liší i v migračních časech.

$$t_m = \frac{l_{ef}}{v} = \frac{l_{ef}}{(\mu_e + \mu_{EOF}) E}$$

t_m - migrační čas, l_{ef} - efektivní délka kapiláry, v - celková rychlost, E - intenzita elektrického pole, μ_e - elektroforetická mobilita, μ_{EOF} - elektroosmotická mobilita

Celkovou dobu analýzy určujeme pomocí času nejpomalejšího analytu. Jak již bylo zmíněno s prodlužující dobou analýzy se výrazněji projevuje disperze a snižuje se rozlišení separace. Migrační časy lze snížit zkrácením efektivní délky kapiláry nebo aplikací silnějšího elektrického pole. Intenzita elektrického pole je však limitována Jouleovým teplem a zkrácení efektivní délky kapiláry se negativně odrazí na účinnosti²⁴.

6.6 Jouleovo teplo

Další výhodou malého průměru kapiláry, vedle EOF, spočívá ve snížení negativních účinků Jouleova tepla, které značně omezuje možnosti jiných elektroforetických metod.

Jouleovo teplo je teplo, které vzniká při průchodu elektrického proudu uzavřeným elektrickým obvodem. Jeho původem je transformace elektrické energie na vnitřní energii.

$$Q = \frac{U^2}{R} t = I^2 R t$$

Q - Jouleovo teplo, U - napětí, I - proud, R - odpor, t - čas

Zahřívání elektrolytu v kapiláře bývá spojené s problémy, neboť může způsobit nehomogenní teplotní gradient, lokální změny viskozity a tím další rozšíření zóny. Kapalina v kapiláře se zahřívá procházejícím proudem a vytváří klesající teplotní gradient od středu k okraji kapiláry. Teplotní gradient ovlivní viskozitu elektrolytu, která je v přímém vztahu s rychlostí EOF. Rychlost EOF tak není v profilu toku konstantní. Následkem je dodatečné rozmývání zón a snížení rozlišení.

Negativní vlastnosti Jouleova tepla můžeme snížit změnou vlastností kapiláry. Ukázalo se, že velikost teplotního gradientu úzce souvisí s vnitřním průměrem, tloušťkou stěny, tloušťkou povlaku polyimidu a rychlostí tepelné výměny s okolím. Jako ideální by potom byla kapilára o minimálním vnitřním průměru, maximální tloušťkou stěny a zanedbatelnou vrstvou polyimidu na povrchu, uložená v roztoku s chladícím systémem pro udržení konstantní teploty. Bohužel by taková kapilára značně zkomplikovala praktické využití přístroje kvůli snížení citlivosti a riziku ucpání kapiláry nečistotami.

Další možnost spočívá ve snížení napětí nebo vodivosti. Snížení napětí znamená i snížení separačního výkonu, čemu se většinou snažíme zamezit. Vodivost můžeme ovlivňovat koncentrací pufru, ale s klesající koncentrací klesá i schopnost udržovat konstantní pH a tím i EOF^{21,24}.

6.7 Účinnost, selektivita a rozlišení

Účinnost separace se popisuje počty teoretických pater. Velký počet teoretických pater znamená lepší separaci do úzkých zón. To má pozitivní vliv na rozlišení mezi sousedícími zónami. Počet teoretických pater u CE se pohybuje v rozmezí 50 000 – 1 000 000.

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) El_{ef}}{2D}$$

N - počet teoretických pater, *D* - difuzní koeficient, *l_{ef}* - efektivní délka kapiláry, *E* - intenzita elektrického pole, *μ_e* - elektroforetická mobilita, *μ_{EOF}* - elektroosmotická mobilita

$$D = \frac{kt}{6\pi r\eta}$$

k - Boltzmanova konstanta, *T* - termodynamická teplota, *r* - poloměr iontu, *η* - viskozita

Selektivita je dána poměrem proměnných, které jsou zodpovědné za separaci. U CE se jedná o poměr elektroforetických mobilit. Poskytuje informaci o tom, jak dobře lze oba analyty separovat na základě jejich vlastností. Selektivitu lze pozměnit přidávkem aditiv do základního elektrolytu.

$$\alpha = \frac{\mu_{e,1}}{\mu_{e,2}} ; \alpha \geq 1$$

α - selektivita, *μ_{e,1}* - elektroforetická mobilita rychlejšího iontu, *μ_{e,2}* - elektroforetická mobilita pomalejšího iontu

Rozlišení vypovídá o schopnosti od sebe separovat dva analyty. Dobré rozlišení je důležité pro správnou kvantifikaci analytů.

$$R = \frac{0,177 (\mu_{e,1} - \mu_{e,2}) V^{\frac{1}{2}}}{\sqrt{(\mu_{avg} + \mu_{EOF}) D}}$$

R - rozlišení, *μ_{avg}* - průměrná elektroforetická mobilita, *V* - napětí²²

7. Módy kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza je separační technika, která umožňuje provádět separace s využitím několika odlišných mechanismů. Tyto metody se právě shodují v používání kapiláry a elektrického pole pro separaci, ale liší se v mechanismu dělení. Mezi základní metody patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární izotachoforéza (CITP).

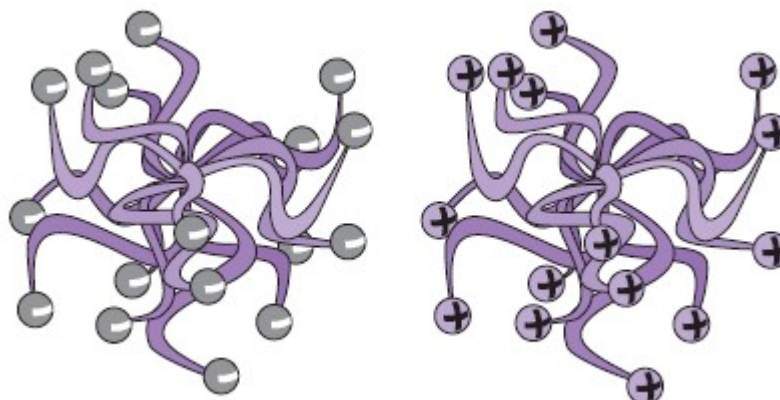
7.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejrozšířenějším používaným mechanismem separace. Mezi její přednosti patří jednoduchý provoz a malá spotřeba vzorku. Pomocí této metody můžeme provádět analýzu aminokyselin, peptidů, iontů, enantiomerů, a řadu dalších nabitých analytů. Zde je důležité si uvědomit, že je tato metoda vázána na iontový charakter analyzované látky. Pro separaci látek bez náboje musíme zvolit jinou metodu.

CZE je v podstatě nejjednodušší forma CE, protože kapiláru pouze plníme vhodně zvoleným pufrům. K separaci dochází na základě různé rychlosti pohybu látek v elektrickém poli vzhledem k jejich náboji a velikosti. Při správně zvoleném pH pracovního elektrolytu (dostatečně rychlý EOF), můžeme úspěšně separovat jak kationty tak i anionty v jediné analýze^{21,24}.

7.2 Micelární elektrokinetické chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je metodou využívající principu elektroforézy a chromatografie. MEKC patří mezi další hodně používané režimy CE. Mezi její přednosti patří schopnost separovat iontové, polární a nepochybně nepolární sloučeniny. Přičemž při separaci sloučenin využíváme povrchově aktivních látek a jejich schopnost tvořit micely (Obr.8). Pro vznik micel v pufru musí koncentrace povrchově aktivních látek přesáhnout kritickou micelární koncentraci, u SDS musí být vyšší než 8 mM (v deionizované vodě).



Obr.8: Schéma aniontových a kationtových micel²⁰

Během separace můžeme funkci micel přirovnat k funkci stacionární fáze při běžné chromatografii, kde se jednotlivé složky směsi separují v důsledku rozdílné interakce se stacionární fází. Podobný jev se vyskytuje i při separaci v MEKC, látky v elektrolytu interagují s micelami a mění svojí rychlost pohybu na rychlost micel. A proto k separaci látek dochází na základě rozdílné síly interakce, která hlavně závisí na hydrofobních vlastnostech separovaných látek. Čím je interakce silnější tím je analyzovaná látka déle zadržena a více oddělena od směsi.

MEKC se často používá při separaci větších molekul s malým nebo žádným nábojem a hlavním parametrem pro separaci je hydrofobní charakter. Jako příklad můžeme uvést aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny, široký sortiment léčiv, aromatické uhlovodíky, výbušniny atd^{21,24}.

7.3 Kapilární gelová elektroforéza

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) je hlavně využívána pro separaci biologických vzorků jako je DNA, RNA a proteiny. Molekuly těchto sloučenin se vyznačují identickou rychlostí pohybu v elektrickém poli. Tento jev je způsobený velice podobnou hodnotou poměru mezi nábojem a velikostí molekul. A proto při separaci využíváme polymerních gelů, které vytváří “molekulová síta” a tím umožňují dělit molekuly podle velikosti. Čím je molekula menší tím se může volněji pohybovat a má vyšší rychlost^{21,24}.

7.4 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) slouží k separaci amfolytů v gradientu pH. Amfolyty jsou látky, jejichž náboj se mění v závislosti na pH prostředí; obsahují jak bazické, tak kyselé funkční skupiny. Při určitém pH je rozdíl náboje kladně a záporně nabitých funkčních skupin nulový a molekula se stává elektroneutrální. Toto pH je pro daný amfolyt charakteristické a označuje se jako izoelektrický bod pI .

Gradient pH se vytváří ponořením anodového konce kapiláry do roztoku kyseliny, nejčastěji H_3PO_4 , katodového konce do roztoku hydroxidu, nejčastěji $NaOH$, a aplikací elektrického pole po určitou dobu. Amfolyty se separují do úzkých zón, ve kterých pH odpovídá izoelektrickému bodu daného amfolytu. Tento děj se nazývá fokusace.

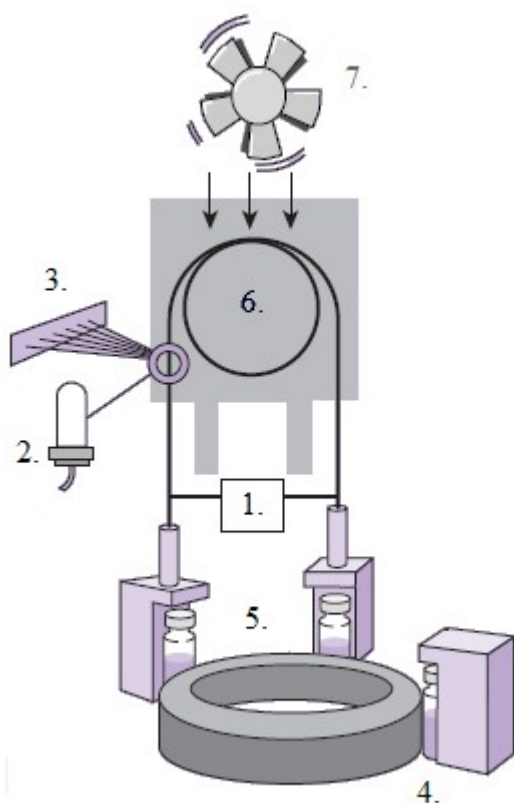
Výhodou CIEF je samozaostřování. Pokud amfolyt opustí zónu, nebude nadále elektroneutrální a elektroforetickým pohybem je vrácen zpět. Efekt samozaostřování umožňuje od sebe separovat amfolyty lišící se v izoelektrických bodech o pouhé 0,02 pH jednotky. Využívá se pro separaci aminokyselin a peptidů²⁴.

7.5 Kapilární izotachoforéza

Kapilární izotachoforéza (CITP) využívá dvou rozdílných elektrolytů, tzv. vedoucího elektrolytu s elektroforetickou mobilitou větší, než kterýkoli analyt a tzv. koncového elektrolytu s elektroforetickou mobilitou naopak nižší, než kterýkoli analyt ve vzorku. Vzorek je nadávkován mezi vedoucí a koncový elektrolyt a je separován do zón v pořadí od vedoucího elektrolytu se snižující se elektroforetickou mobilitou.

V rovnovážném stavu se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí, kterou určuje vedoucí elektrolyt. Jednotlivé zóny se liší v intenzitě elektrického pole. Díky tomu má CITP vlastnost samozaostřování. Pokud analyt opustí svou zónu, je vlivem odlišné intenzity elektrického pole vrácen zpět. Pomocí CITP lze separovat buď kationty, nebo anionty²⁴.

8. Instrumentace



V současné době je na trhu několik výrobců dodávající přístroje pro kapilární elektroforézu. Všechny tyto přístroje mají shodné základní konstrukční prvky. Přehled a umístění těchto prvků je zobrazený na obr. 9. Informace získané z detektoru musíme dále zpracovat a to nejčastěji pomocí počítače přímo připojeného na přístroj.

Obr.9: 1. zdroj vysokého napětí, 2. zdroj záření pro UV-VIS detektor, 3. detektor, 4. vzorek, 5. zásobníky s pufrem, 6. kapilára, 7. termostat²¹

8.1 Zdroj vysokého napětí

Dobrý zdroj se vyznačuje schopností generovat napětí od 5 do 30 kV a proud od 0 do 300 μA . Důležité přitom je, aby hodnoty napětí a proudu co nejméně kolísaly. Pro dobrou reprodukovatelnost by neměla odchylka přesáhnout hodnotu 0.1 %. Pro některé separace je dále nutná plynulá změna velikosti jednoho z výše zmiňovaných parametrů. Možnost změny polarit na inertních elektrodách patří samozřejmostí^{21,24}.

8.2 Detektor

V kapilární elektroforéze používáme několik různých druhů detekčních systémů. Jako příklad lze uvést UV-VIS detektor, hmotnostní spektrometrie, fluorescenční detektor, konduktometrický detektor a amperometrický detektor. Z těchto detektorů je nejběžnější UV-VIS, který měří absorbanci procházejícího záření přes kapiláru. Velkou výhodou je jeho

široké pole uplatnění. Můžeme pomoci něho detekovat látky, které mají schopnost absorbovat záření ve viditelné a ultrafialové oblasti. Vylepšenou verzi UV-VIS detektoru je detektor s diodovým polem, který umožňuje během jediné analýzy měřit absorpční spektra separovaných látek.

Jako každá jiná detekční metoda využívající absorbanci, musíme se i zde řídit Lambert-Beerovým zákonem. Z něhož vyplývá, že absorbance je přímo úměrná délce optické dráhy a u kapiláry je tato délka rovna vnitřnímu průměru, který se pohybuje v desítkách mikrometru. Z čehož vyplývá hlavní nevýhoda UV/VIS detektorů - nízká koncentrační citlivost.

Mezi další často používané detekční metody patří hmotnostní spektrometrie. Využívá se jako univerzální detekční technika s vysokou citlivostí a schopností podávat strukturní informace o zkoumaných sloučeninách. Bohužel patří mezi cenově nákladné přístroje²¹.

8.3 Dávkování

Pro správné nadávkování potřebujeme nepatrné množství vzorku. Jako optimální množství se považuje 1 až 2 % z celkového objemu kapiláry (1-50 nl). Dávkování můžeme provádět různými způsoby, mezi nejčastější patří hydrodynamické a elektrokinetické.

Během hydrodynamického dávkování je vzorek nasáván do kapiláry v důsledku rozdílného tlaku na koncích kapiláry. V praxi se může provádět několika způsoby. Buď zvýšíme tlak v nádobce s analytem, nebo vytvoříme podtlak v nádobce na opačné straně kapiláry a nebo využijeme tlak způsobený rozdílem hladin. Tento druh nástřiku je nejpoužívanější ze všech.

Dalším často používaným druhem nástřiku je elektrokinetické dávkování. Princip je založený na migraci nabitých částic v elektrickém poli. Pro nadávkování proto nepotřebujeme vytvářet tlakové rozdíly. Stačí nám ponořit první konec kapiláry do vzorku s elektrodou a druhý do pufru s elektrodou a aplikovat napětí, většinou 5 až 10krát menší než při vlastní separaci. Bohužel při aplikaci napětí se jednotlivé složky vzorku pohybují různou rychlostí do kapiláry. Výsledkem je, že vzorek v kapiláře je bohatší na ionty s větší elektroforetickou mobilitou. I přes tento nedostatek našlo značné uplatnění u kapilárách naplněných gelem, u kterých nelze provádět hydrodynamické dávkování²¹.

9. Experimentální část

9.1 Chemikálie

Kyselina boritá, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, redukováného Tritonu X-114, Genapol X-080, glybenclamid (glyburid), gliclazid, glipizid, glimepirid, repaglinid a tolbutamid byly dodány společností Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol pocházel od společnosti Fluka (Buchs, Švýcarsko).

Elektrolyt byl připraven rozpouštěním odpovídajícího množství kyseliny borité v deionizované vodě, která byla titrována 50% (w/w) hydroxidem sodným na požadované pH. Na konci titrace se do roztoku přidalo požadované množství neionogenních tenzidů (Genapol X-080) a elektrolyt se na 15 minut vložil do ultrazvukové lázně s termostatem, pro lepší homogenitu roztoku.

Jednotlivé standardy perorálních antidiabetik byly připraveny rozpuštěním 10 mg standardu v 1 ml methanolu. Z těchto připravených roztoků, byla ředěním připravena směs standardů o nižších koncentracích. K dalšímu ředění se používala deionizovaná voda.

9.2 Použité přístroje a postup při měření

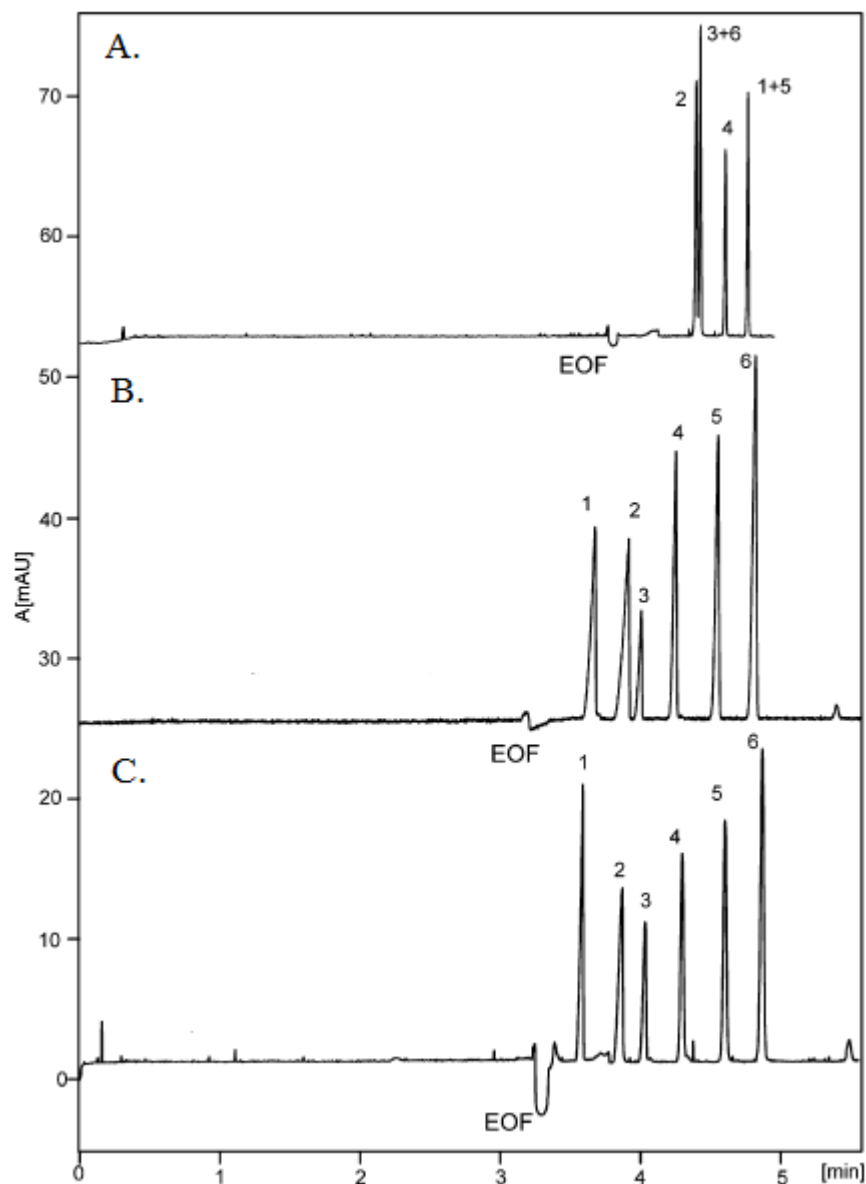
Jako separační přístroj byla použita kapilární elektroforéza HP 3D Agilent (Waldbronn, Německo) vybavená DAD UV-VIS detektorem, který byl pro tuto analýzu nastaven na měření absorpce při 200 nm.

Separace probíhala v křemíkové kapiláře o efektivní délce 40 cm (celková délka byla 48,5 cm) a vnitřním průměru 50 μm (od MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA). Kapilára byla termostatována na 20 °C. Před samotným měřením se kapilára promývala 15 minut 0.1 mol/l NaOH, potom 15 minut deionizovanou vodou a potom 5 minut připraveným elektrolytem. Tento proces byl opakován každý den na začátku měření. Mezi jednotlivými separacemi byla kapilára promývána 1 minutu 0.1 mol/l NaOH, 1 minutu deionizovanou vodou a 2 minuty elektrolytem. Vzorek byl do kapiláry dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund. Během všech pokusů se používalo napětí o velikosti 20 kV. Všechna měření byla provedena pětkrát, pokud není uvedeno jinak.

10. Separace antidiabetik kapilární zónovou elektroforézou

Studované antidiabetika se chovají ve vodných roztocích jako slabé kyseliny. Hodnoty pK_a jsou v rozmezí 5.0 až 6.5. Z tohoto důvodu je možné provádět jejich separaci v alkalických pracovních elektrolytech. Jako první byl studován vliv hodnoty pH na separaci antidiabetik v nepokryté křemenné kapiláře. Jako pracovní elektrolyty byly zvoleny fosfát sodný pH 7.0 a 7.5 a borát sodný o pH 8.0 až 10.5. Ve všech uvedených pracovních elektrolytech byla elektroosmotická mobility dostatečně vysoká, takže separace antidiabetik ve formě aniontů probíhala při kladné polaritě, tj. od anody ke katodě. Antidiabetika v tomto případě mají tendenci migrovat proti pohybu elektroosmotického toku, který je ale silnější a antidiabetika tak migrují ke katodě. Ve všech pracovních elektrolytech byla dosažena pouze částečná separace antidiabetik. Nejvyšší selektivitu separace poskytoval elektrolyt borát sodný pH 10.0, který byl dále využíván pro další experimenty jako výchozí základní elektrolyt.

Další studovaný parametr, který ovlivňuje separaci iontů v kapilární zónové elektroforéze byla koncentrace složek pracovního elektrolytu. Byly připraveny pracovní elektrolyty o koncentraci 10 až 200 mM borát sodný pH 10.0. Se zvyšující se koncentrací borátu v pracovním elektrolytu docházelo k zvýšení migračních časů separovaných antidiabetik a také ke snížení elektroosmotické mobility. Ke zvýšení rozlišení separovaných antidiabetik však nedošlo. Jako vhodná koncentrace borátového pracovního elektrolytu byla zvolena koncentrace 50 mM. Na obr.10 a je elektroferogram antidiabetik separovaných v 50 mM borátu sodném pH 10.0 (ostatní podmínky jsou uvedeny pod obrázkem).

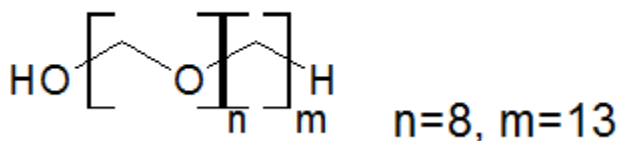


Obr. 10: Elektroferogramy separace antidiabetik (0,01 mg/mL) v 50 mM borátu sodném pH 10,0, $U = 20$ kV, hydrodynamické dávkování 50 mbar/5s, $\lambda = 200$ nm. A – bez přidavku neiontového tenzidu, B – s přidavkem redukovaného Tritonu X-114, C – s přidavkem Genapolu X-080

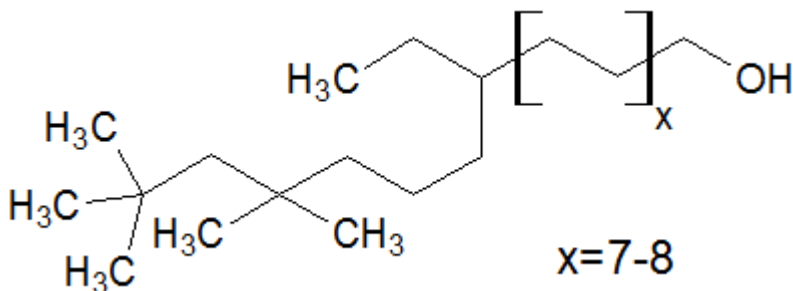
Pro zvýšení selektivity separace byly studovány přidavky dvou neiontových tenzidů: Genapolu X-080 a redukovaného Tritonu X-114. Jejich základní fyzikálně chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce č. IX. A jejich struktury jsou uvedeny na obr. 11.

Tabulka č. IX: Základní fyzikálně chemické vlastnosti neiontových tenzidů.

	Bod zákalu (°C)	Kritická micelární koncentrace (mM)	Molární hmotnost (g/mol)	Hustota (g/ml)
Genapolu X-080	42	0.06-0.015	564,8	0.999
Tritonu X-114 (red)	23-25	0.35	553.0	1.022



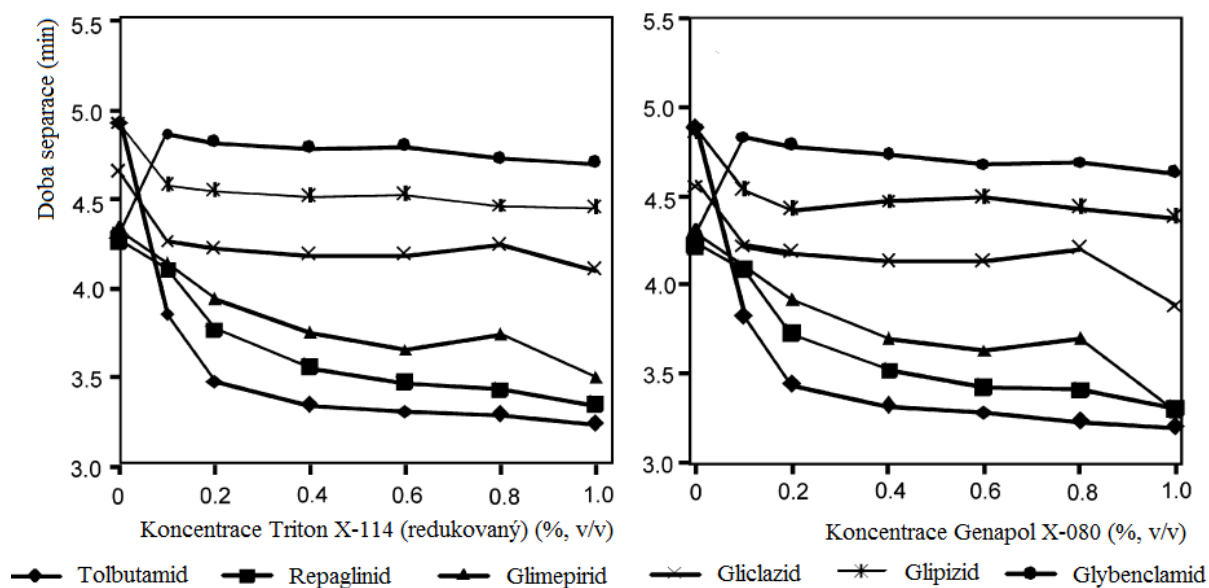
Genapolu X-080



Tritonu X-114 (redukovaný)

Obr.11: Struktury neiontových tenzidů

Byly studovány přídavky obou neiontových tenzidů zvlášť do pracovního elektrolytu 50 mM borát sodný pH 10.0 v rozmezí koncentrací 0% až 1,0 %. Závislosti migračních časů na koncentraci jednotlivých neiontových tenzidů jsou uvedeny na obr. 11.



Obr.11: Vliv koncentrace neiontových tenzidů na migrační časy antidiabetik
v 50 mM borátu sodném pH 10.0

Protože kritické micelární koncentrace uvedené v tabulce č. IX jsou velmi nízké, je možné předpokládat změnu mechanismu separace antidiabetik na micelární elektrokinetickou chromatografii. Dochází k interakci hydrofóbních částí molekul tenzidů s hydrofóbními jádry micely neiontových tenzidů a k jejich rozdělování mezi micely a vodný pracovní elektrolyt. Vzhledem k tomu, že separované antidiabetika mají záporný náboj je možná jejich separace s využitím neiontových tenzidů.

Elektroferogramy separace antidiabetik s využitím MEKC s neiontovými tenzidy jsou na obr. 10 B a 10 C. Jako vhodné koncentrace neiontových tenzidů v pracovním elektrolytu byly zvoleny koncentrace 0,2 % (v/v) jako pro Genapol X-080, tak pro Triton X-114.

Dále byly studovány opakovatelnosti elektroosmotické mobility na koncentraci neiontových tenzidů v 50 mM borátu sodném pH 10.0. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. X.

Tabulka č. X: Opakovatelnost elektroosmotické mobility vzhledem ke koncentraci neiontových tenzidů.

Koncentrace (%, v/v)	Genapol X-080		Tritonu X-114 (redukovyný)	
	$\mu_{EO} \times 10^{-9}$ (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	RSD (%)	$\mu_{EO} \times 10^{-9}$ (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)	RSD (%)
0	50.3	0.6	50.3	0.5
0.2	51.4	0.2	51.3	0.6
0.4	51.3	0.4	51.3	0.4
0.6	51.9	0.5	51.6	0.5
0.8	51.2	0.7	51.2	0.6
1.0	51.5	0.2	51.8	0.6

Jako konečné podmínky pro separaci antidiabetik byly zvoleny 50 mM borát sodný pH 10.0 s přidavkem 0,2 % (v/v) Genapolu X-080, U = 20 kV.

Za uvedených podmínek separace antidiabetik byly naměřeny kalibrační závislosti, vypočítány mez detekce a mez kvantifikace. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce č. XI:

Tabulka č. XI: Mez detekce a mez kvantifikace.

Antidiabetikum	Mez detekce ($\mu\text{mol/l}$)	Mez kvantifikace ($\mu\text{mol/l}$)	Sklon kalibračního diagramu	Posunutí	korelační koeficient
Tolbutamid	2.3	7.8	0.2404	0.007	0.998
Repaglinid	2.5	8.4	0.2893	0.009	0.997
Glimepirid	3.1	10.5	0.3267	0.006	0.998
Gliklazid	4.6	15.4	0.3452	0.008	0.998
Glipizide	6.9	23.0	0.3583	0.007	0.996
Glybenklamid	8.9	28.8	0.3607	0.009	0.998

Metoda poskytuje meze detekcí řádově v $\mu\text{mol/L}$, pro její aplikaci na biologické vzorky je nutné další snížení mezí detekcí, což je předmětem dalšího měření.

11. Diskuse a závěr

Při volbě metody pro separaci perorálních antidiabetik jsem si zvolil micelární elektrokinetickou chromatografii. Tato metoda za využití neiontových tenzidů (Genapolu X-080 a redukovaného Tritonu X-114) umožňuje velice rychle a levně rozseparovat a detekovat perorální antidiabetika. Průměrná doba úspěšné separace nepřesáhla pět minut.

Zmiňované neiontové tenzidy jsem si zvolil, protože mají nízkou absorpční hodnotu v UV oblasti. V této oblasti můžeme najít i absorpční maxima pro velký počet perorálních antidiabetik, do kterých patřily i méch šest separovaných. Další výhodou těchto tenzidů je, že minimálně zvyšují vodivost elektrolytu a tím i málo podporují zahřívání v důsledku Jouleova tepla.

Zvolená metoda má mez detekce řádově v $\mu\text{mol/L}$, pro její úspěšnou aplikaci na biologické vzorky je nutné snížit tuto mez, čehož můžeme docílit pomocí prostřednictvím vhodně zvolené prekoncentrační metody, na kterou se zaměří moje další studium těchto sloučenin.

12. Použitá literatura

1. Česká diabetologická společnost: Standardy péče o diabetes mellitus 2.typu.
<http://www.diabetes.cz/data/standardy/4-dm2.pdf> (15.2.2010).
2. Jana Bělobrádková: Perorální antidiabetik.
<http://www.solen.cz/pdfs/far/2006/01/04.pdf> (15.2.2010).
3. Doc. MUDr. Milan Kvapil: Nová perorální antidiabetika mění strategii léčby diabetu.
<http://www.solen.cz/pdfs/int/2002/01/05.pdf> (15.2.2010).
4. Doc. MUDr. František Saudek, DrSc.: Nataglinid.
<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xber/zc/Farmakoterapie-1-2006-327-Nateglinid.pdf>
(15.2.2010).
5. http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3732 (15.2.2010).
6. Anthony C. Moffat, M. David Osseltan, Brian Widdap (Eds.), Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceutikals, Body Fluids and Postmortem materiál, vol 2, *Pharmaceutical press*, London (2004).
7. Kenichi Kumasaka, Takashi Kojima, Hideo Honda, Kayo Doi, *Journal of Health Science*, **51**(4), 453-460 (2005).
8. Jing Yao, Ya-Qin Shi, Zhuo-Rong Li, Shao-Hong Jin, *Journal of Chromatography B*, **853**, 254–259 (2007).
9. S. AbuRuz, J. Millerschip, J. McElnay, *Journal of chromatography B*, **817**, 277-286 (2005)
10. Jia Shaodong, Won Jun Lee, Ji Won Ee, Jeong Hill Park, Sung Won Kwon, Jeongmi Lee, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**, 973–978 (2010).
11. Emmie N.M. Ho, Kenneth C.H. Yiu, Terence S.M. Wana, Brian D. Stewart, Keith L. Watkins, *Journal of Chromatography B*, **811**, 65–73 (2004).
12. Mario Thevis, Hans Zeyer, Wilhelm Schänzer, *Rapid Communicatios in Mass Spectrometry*, **19**, 928–936 (2005).
13. Chien-Yuan Kuo, Shou-Mei Wu, *Journal of Chromatography A*, **1088**, 131–135 (2005).
14. A. Ghassempour, M. Ahmadi, S. N. Ebrahimi, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia*, **64**, 101-104 (2006).
15. Ceren Yardımcı, Nuran Özaltın, *Analytica Chimica Acta*, **549**, 88–95 (2005).
16. E. Nunez, J.E. Ferguson, D. Machacek, G. Jacob, R.P. Oda, G.M. Lawson, J.P. Landers, *Analytical Chemistry*, **67**, 3668 (1995).

17. Matthew E. Roche, Robert P. Oda, George M. Lawson, James P. Landers, *Electrophoresis*, **18**, 1865-1874 (1997).
18. M.A. Strausbauch, S.J. Xu, J.E. Ferguson, M.E. Nunez, D. Machacek, G.M. Lawson, Peter J. Wettstein, James P. Landers, *Journal of Chromatography A*, **717**, 279-291 (1995)
19. Saad S.M. Hassan, Wagiha H. Mahmoud, Mohamed A.F. Elmosallamy, Abdel Hammeed M. Otoman, *Analytica Chimica Acta*, **378**, 299-311 (1999).
20. A. Radi, *Anal Bioanal Chem*, **378**, 822–826 (2004).
21. David Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction. *Agilent Technologies*, Germany (2000).
22. Mičáková I.: *Studium metabolismu xenobiotik pomocí moderních elektromigračních metod*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykova Univerzita, Brno 2007.
23. Němec T.: *Využití metody EMMA při studiu enzymů*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykova Univerzita, Brno 2006.
24. Mádr A.: *Využití kapilární elektroforézy při studiu metabolismu léčiv*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykova Univerzita, Brno 2008.

13. Seznam použitých zkratek

DM 1	diabetes mellitus 1. typu
DM 2	diabetes mellitus 2. typu
PAD	perorální antidiabetik
UV-VIS	detektor pro ultrafialovo-viditelnou spektroskopii
DAD UV-VIS	detektor s diodovým polem pro ultrafialovo-viditelnou spektroskopii
CAD	detektor pro detekci nabytých částic aerosolů
ELSD	detektor rozptylu světla
DD	Dragendorfovo činidlo
PM	roztok methanolu s tetrakis(trimolybdáto)fosforečnou kyselinou
SA	methanol s kyselinou sírovou
SPE-CE	solid-phase extraction-capillary electrophoresis
MR-TSA	metformin-tungstosilicate
MR-RE	metformin-reinektat
PVC-CA	PVC-karboxylát
CPE	heterogenní uhlíková elektroda
MSCPE	Sphadexem modifikovaná heterogenní uhlíková elektroda
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
IEF	izoelektrická fokusace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
CZE	kapilární zónová elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
RSD	relativní směrodatná odchylka

OBSAH

	Strana
1. Úvod	4
1.1 Introduction	5
2. Diabetes mellitus	6
3. Perorální antidiabetik	7
3.1 Sulfonylmočovinové sekretagoga	8
3.2 Nesulfonylmočovinová sekretagoga	9
3.3 Biguanidy	10
3.4 Tiazolidindiony	11
3.5 Inhibitory α -glukosidáz (Akarbóza)	12
4. Analyzované látky	13
5. Přehled metod pro stanovení perorálních antidiabetik	14
5.1 Kapalinová chromatografie	14
5.2 Tenkovrstevná chromatografie	17
5.3 Kapilární Elektroforéza	18
5.4 Potenciometrie	19
6. Kapilární elektroforéza	20
6.1 Historie kapilární elektroforézy	20
6.2 Elektroforéza	21
6.3 Rychlost pohybu molekul	21
6.4 Elektroosmotický tok	22
6.5 Migrační čas	24
6.6 Jouleovo teplo	25
6.7 Účinnost, selektivita a rozlišení	26
7. Módy kapilární elektroforézy	27
7.1 Kapilární zónová elektroforéza	27
7.2 Micelární elektrokinetické chromatografie	27
7.3 Kapilární gelová elektroforéza	28
7.4 Kapilární izoelektrická fokusace	29
7.5 Kapilární izotachoforéza	29
8. Instrumentace	30

8.1	Zdroj vysokého napětí	30
8.2	Detektor	30
8.3	Dávkování	31
9.	Experimentální část	32
9.1	Chemikálie	32
9.2	Použité přístroje a postup při měření	32
10.	Separace antidiabetik kapilární zónovou elektroforézou	33
11.	Diskuse a závěr	38
12.	Použitá literatura	39
13.	Seznam použitých zkratek	41
14.	Obsah	42