

MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Ústav Biochemie

**VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V KOMBINACI
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V BIOANALYTICKÉ CHEMII**

Bakalářská práce

VYPRACOVALA: Eliška Cvingráfová

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.

BRNO 2011

Bibliografický záznam

Autor: Eliška Cvingrářová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: **Využití kapilární elektroforézy v kombinaci s hmotnostní spektrometrií v bioanalytické chemii**

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Vedoucí práce: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.
Rok obhajoby: 2011
Klíčová slova: kapilární elektroforéza, nevodná kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, analýza léčiv, dextromethorphan

Bibliographic entry

Author: Eliška Cvingrářová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of thesis: **Application of CE MS combination in bioanalytical chemistry**

Degree programme: Biochemistry
Field of study: Biochemistry
Supervisor: prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.
Year of defence: 2011
Keywords: capillary electrophoresis, non-aqueous capillary electrophoresis, mass spectrometry, analysis of drugs, dextromethorphan

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce, prof. RNDr. Zdeňku Glatzovi, CSc za odborné vedení.

Mé poděkování patří také konzultantce Mgr. Martě Zeisbergerové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost, ochotu, pomoc při práci v laboratoři a předané praktické zkušenosti.

Za poskytnutí reálného vzorku a pomoc s jeho extrakcí děkuji PharmDr. Janu Juřicovi, Ph.D.

Mému manželovi, Ing. Radku Cvingráfovi děkuji za projevenou podporu, trpělivost a pochopení.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů.

Brno 13. května 2011

.....

Eliška Cvingráfová

Abstrakt

Kapilární elektroforéza je univerzální analytická separační metoda. Ve spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie poskytuje účinný nástroj pro separaci bioanalyticky významných látek. Teoretická část této bakalářské práce se zabývá nevodnou kapilární elektroforézou jako vhodným nástrojem pro analýzu farmakologicky aktivních látek. Experimentální část prezentuje výsledky separace léčiva dextromethorphanu a jeho metabolitů pomocí nevodné kapilární elektroforézy. Dále zahrnuje optimalizaci použité metody a její základní statistické hodnocení. Závěr experimentální části je věnován analýze reálného vzorku.

Abstract

Capillary electrophoresis is a versatile method for analytical separations. In combination with mass spectrometry provides a powerful tool for bioanalytical separation of substances. The theoretical part of this thesis deals with non-aqueous capillary electrophoresis as a useful tool for the analysis of pharmacologically important compounds. Experimental section presents the results of the separation of drugs dextromethorphan and its metabolites by non-aqueous capillary electrophoresis. It also includes the optimization method used and its basic statistical evaluation. The conclusion of experimental section is devoted to the analysis of a real sample.

Obsah

<u>1</u>	<u>ÚVOD</u>	<u>2</u>
<u>2</u>	<u>KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA</u>	<u>3</u>
	2.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	3
2.1.1	ELEKTROFORETICKÝ POHYB	3
2.1.2	ELEKTROOSMÓZA	4
2.1.3	JOULEOVO TEPLO	6
	2.2 INSTRUMENTACE	6
2.2.1	KAPILÁRA	6
2.2.2	DETEKCE	7
	2.3 MÓDY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	7
	2.4 NEVODNÁ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	8
2.4.1	HISTORIE NEVODNÉ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	9
2.4.2	ROZPOUŠTĚDLA V NEVODNÉ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	9
<u>3</u>	<u>HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE</u>	<u>11</u>
	3.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE JAKO ZPŮSOB DETEKCE PŘI CE	11
<u>4</u>	<u>ANALÝZA LÉČIV</u>	<u>12</u>
	4.1 DEXTROMETHORPHAN A JEHO METABOLISMUS	12
<u>5</u>	<u>CÍL PRÁCE</u>	<u>14</u>
<u>6</u>	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>15</u>
	6.1 MATERIÁL	15
6.1.1	CHEMIKÁLIE	15
6.1.2	PŘÍSTROJE	15
	6.2 METODY	16
6.2.1	ÚPRAVA KAPILÁRY A PROMÝVÁNÍ	16
6.2.2	ZÁKLADNÍ ELEKTROLYT	16
6.2.3	PŘÍPRAVA VZORKU ZE STANDARDŮ	16
6.2.4	ÚPRAVA REÁLNÉHO VZORKU	17
	6.3 OPTIMALIZACE METODY	17
6.3.1	OPTIMALIZACE TEPLoty	18
6.3.2	OPTIMALIZACE SEPARAČNÍHO NAPĚTÍ	20
6.3.3	OPTIMALIZACE KONCENTRACE OCTANU AMONNÉHO	21
6.3.4	OPTIMALIZACE KONCENTRACE ACETONITRILU	23
6.3.5	SHRNUTÍ OPTIMÁLNÍCH SEPARAČNÍCH PODMÍNEK	25
	6.4 ZÁKLADNÍ VALIDACE METODY	26
	6.5 ANALÝZA REÁLNÉHO VZORKU	28
<u>7</u>	<u>DISKUZE</u>	<u>30</u>
<u>8</u>	<u>ZÁVĚR</u>	<u>32</u>
<u>9</u>	<u>SEZNAM ZKRATEK</u>	<u>33</u>
<u>10</u>	<u>POUŽITÁ LITERATURA</u>	<u>34</u>

1 Úvod

Kapilární elektroforéza je analytická metoda se širokým uplatněním v chemii, je vhodná pro separaci celého spektra látek od malých anorganických iontů po biologické makromolekuly a vyniká vysokou separační účinností a nízkou spotřebou roztoků a vzorku [1].

Nevodná kapilární elektroforéza (NACE) vhodně doplňuje kapilární zónovou elektroforézu, protože umožňuje separovat i látky, které nelze analyzovat ve vodném prostředí. Mezi takové látky patří velké množství látek nacházejících se v životním prostředí a organismech a také léčiv. NACE tak nachází uplatnění v bioanalytické, ale i farmaceutické chemii.

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (MS) přináší další pozitiva. Zvyšuje citlivost detekce a přináší informace o struktuře látky. Spojení nevodné kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie využívá nízkých teplot varu u organických rozpouštědel, kdy dojde ke snadnému odpaření rozpouštědla a vzorek je snadno ionizován.

NACE a MS jsou tedy vhodnou kombinací metod při studiu složitějších systémů, například při analýze biologických materiálů nebo analýze léčiv a jejich metabolismů.

2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi elektromigrační separační metody. Tyto metody využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí. [2]

Elektroforetické separace jsou založeny na migraci analytů podle jejich hustoty náboje (poměr náboje vůči hmotnosti). Elektroforetická migrace může být ovlivněna složením základního elektrolytu několika cestami (např. díky změnám velikosti solvatovaného analytu).

2.1 Základní principy kapilární elektroforézy

2.1.1 Elektroforetický pohyb

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda založená na pohybu elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli k opačně nabitě elektrodě.

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly: elektrická síla F_1 , která ji uvádí do pohybu, a odpor viskózního prostředí F_2 , který ji brzdí. Po vyrovnaní těchto sil nastane stacionární stav, ve kterém se nabitě částice pohybují stálou rychlostí. Tato **rychlost v** je dána rovnicí (1):

$$v = Q \cdot E / k \text{ [ms}^{-1}\text{]} \quad (1)$$

(k je koeficient závislý na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí, ze Stokesova zákona plyne, že $k = 6\pi\eta r$)

Elektroforetická pohyblivost μ_e (mobilita) určité nabitě částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. [2]

$$\mu_e = v/E = Q/(6\pi\eta r) \text{ [m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}\text{]} \quad (2)$$

Z tohoto vztahu lze odvodit, že malé, vysoce nabitě částice mají vysokou mobilitu, naproti tomu velké minimálně nabitě částice mají mobilitu nízkou. [4]

Experimentálně se **rychlost** částice stanovuje z dráhy, kterou částice urazí za daný čas. V podmínkách kapilární elektroforézy z délky kapiláry od nástřiku vzorku po detektor (tzv. efektivní délka kapiláry, L_{ef}) a času potřebného pro překonání této vzdálenosti (doba migrace, t_m).

$$v = L_{ef}/t_m \quad (3)$$

Pro výpočet **elektroforetické pohyblivosti** se v laboratorní praxi používá následující vzorec:

$$\mu_e = L_{ef} \cdot L / t_m \cdot U \quad (4)$$

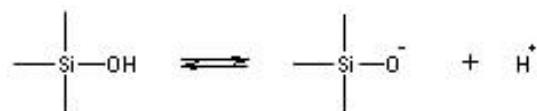
(L_{ef} - efektivní délka kapiláry, L - celková délka kapiláry, t_m - doba migrace, U - separační napětí)

Vzorce (3) a (4) jsou vhodné pro použití v laboratorní praxi, protože všechny použité veličiny jsou při provádění měření známy.

2.1.2 Elektroosmóza

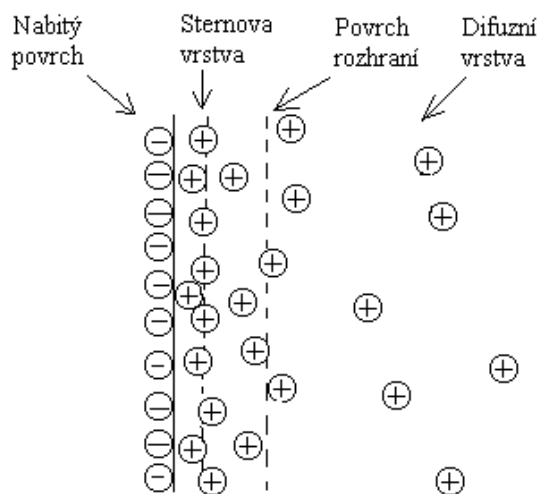
Kromě elektroforézy působí na částice během separace elektroosmóza (elektroosmotický tok, EOF). Způsobuje pohyb celého objemu kapiláry směrem ke katodě. Na tomto jevu se majoritně podílí vznik tzv. Sternovy dvojvrstvy.

Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s roztoky o $\text{pH} > 3$ disociují:



Obr. 1: Disociace stěny kapiláry (Klouda)

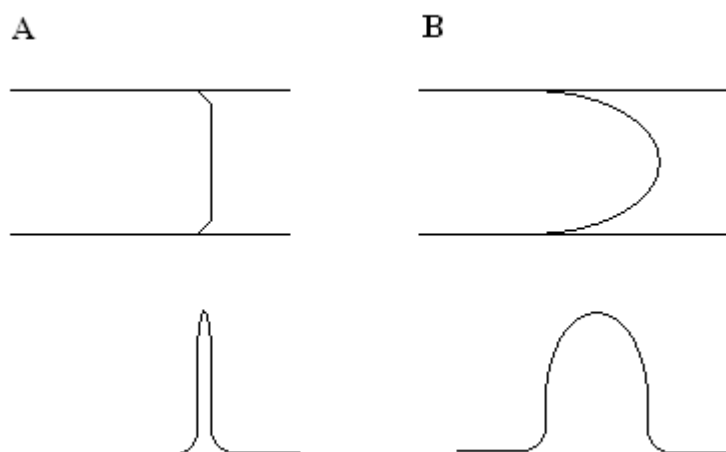
Disociací silanolové skupiny se vytvoří záporný náboj stěny. Kationty ze základního elektrolytu jsou přitahovány k záporně nabitě stěně a vytváří se stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty blíže středu kapiláry tvoří tzv. difuzní vrstvu. Po aplikaci napětí kationty z difuzní vrstvy migrují ke katodě. Kationty H^+ bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku ke katodě. Tok je tak silný, že nese ke katodě i anionty a elektroneutrální částice.



Obr. 2: Schématické znázornění vzniku elektrické dvojvrstvy

Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku, kationty rychleji, anionty pomaleji v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti. [2]

Výhodou kapilární elektroforézy, oproti HPLC, je stálý průtok v celém průřezu kapiláry. CE má tzv. pístový rychlostní profil. Díky této vlastnosti nedochází k tak znatelnému rozmývání zóny píku jako v HPLC, kde je profil toku laminární. V CE tedy dochází k menšímu rozmývání zón a je dosahováno lepší účinnosti ve srovnání s HPLC.



Obr. 3: Porovnání průtoku kapilárou: A) pístový rychlostní profil B) laminární rychlostní profil

EOF je velmi závislý na pH základního elektrolytu, protože na něm závisí disociace vnitřního povrchu kapiláry a ustanovení Sternovy vrstvy. Dále závisí na permitivitě a viskozitě základního elektrolytu, na separačním napětí a poloměru kapiláry.

2.1.3 Jouleovo teplo

Při průtoku elektrického proudu kapilárou vzniká teplo. Čím vyšší proud elektrolytem prochází, tím je uvolňované teplo vyšší.

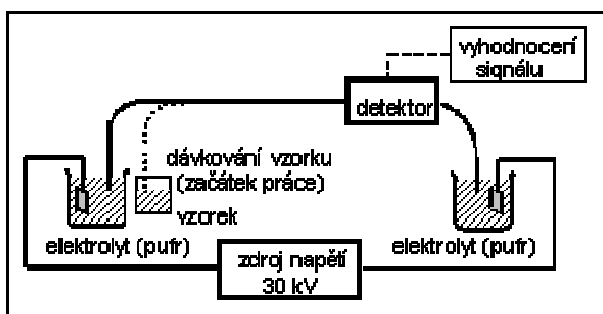
Následkem tepla může docházet k rozkladu analyzovaných látek, lokálním změnám viskozity elektrolytu. Tyto efekty zvyšují rozmytí jednotlivých zón analytů a mají za následek snížení účinnosti separace.

Pro zamezení negativních vlivů vzniklých působením tepla podléhá prostor s umístěnou kapilárou chlazení.

2.2 Instrumentace

Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu je zobrazeno na Obr. 4.

Separace probíhá v kapiláře naplněné základním elektrolytem. Kapilára je ponořena do vialky se zásobou základního elektrolytu a pomocí vložených elektrod je připojena ke zdroji stejnosměrného napětí (10–30 kV). Na počátku separace se do kapiláry nadávkuje malé množství vzorku. Na kapiláře je umístěný detektor (nejčastěji spektrofotometrický), který zaznamenává signál. Signál je následně vyhodnocen vhodným softwarovým programem.



Obr. 4: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu [2]

2.2.1 Kapilára

Používají se křemenné kapiláry, které jsou z vnější strany potaženy polyimidem. Polyimidová vrstva chrání křehkou kapiláru před znehodnocením. Pouze oblast kapiláry, která prochází detektorem, je zbavena ochranné polyimidové vrstvy.

Nejčastěji se uplatňují kapiláry dlouhé 15–100 cm o průměrech 25–150 μm . [4]. Kapilára je umístěna do speciální kazety, která se vkládá do přístroje a zajišťuje přesné umístění kapiláry. Správné umístění kapiláry je důležité především jako prevence proti zlomení konce kapiláry při výměně vialky a pro zajištění přesného místa detekce v místě bez potažení.

2.2.2 Detekce

Kapilární elektroforéza je metoda s vysokými požadavky na citlivost používaných detektorů. Vysoká citlivost používaných detektorů je nutná především díky velmi malým průměrům kapiláry a velmi malým objemům nadávkovaných vzorků (v nl). V současné době je nejběžnější detekcí UV spektrometrie. Často se také využívá spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Přehled jednotlivých způsobů detekce je uveden v následující tabulce.

Tab. 1: Klíčové údaje detekčních metod [4]

Metoda	Detekční limit (mol/l)	Výhody	Nevýhody
UV-VIS	$10^{-5} - 10^{-7}$	univerzální, nabízí zisk spektra látky	nízká citlivost
fluorescenční detektor	$10^{-7} - 10^{-9}$	citlivá	obvykle vyžaduje derivatizaci vzorku
laserem indukovaný fluorescenční detektor	$10^{-9} - 10^{-12}$	extrémně citlivý	obvykle vyžaduje derivatizaci vzorku, drahý
ampérometrický detektor	$10^{-10} - 10^{-11}$	citlivý, selektivní	pouze pro elektroaktivní látky
vodivostní detektor	$10^{-6} - 10^{-7}$	univerzální	
hmotnostní spektrometrie	$10^{-8} - 10^{-9}$	citlivý, poskytuje strukturní informace	komplikované spojení mezi CE a MS
nepřímá UV, fluorescenční nebo amperometrická detekce	10-100x menší citlivost než přímé metody	univerzální	nižší citlivost než přímé detekční metody

2.3 Módy kapilární elektroforézy

Hlavní výhodou kapilární elektroforézy je dostupnost různých módů, které umožňují separaci a analýzu rozdílných typů látek od anorganických po biopolymery. [5]

Pro uplatnění při studiu léčiv jsou nejvýznamnější: kapilární zónová elektroforéza, nevodná kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, kapilární elektrochromatografie, kapilární izotachoforéza. [6]

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší formou kapilární elektroforézy. V CZE je kapilára naplněna základním elektrolytem (pufrem), vzorek je nadávkován na vstup kapiláry a je připojeno elektrické napětí. Rozpuštěné látky migrují různou rychlostí a vytvoří nespojitě zóny. [4] Rychlost migrace jednotlivých rozpuštěných látek je dána elektroforetickou pohyblivostí a elektroosmotickým tokem.

Nevodná kapilární zónová elektroforéza (NACE) využívá jako základní elektrolyt organická rozpouštědla nebo jejich směsi. Používá se především pro látky hydrofóbního charakteru, které jsou špatně rozpustné ve vodě (resp. vodných pufrech). Díky vhodným vlastnostem organických rozpouštědel (nízké povrchové napětí, těkavost) je NACE velmi vhodná pro spojení s MS.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) byla původně vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které se nedělí užitím CZE. Separace se provádí za použití základního elektrolytu s vysokým pH, který obsahuje relativně vysokou hladinu povrchově aktivních látek (např. SDS). Ty začnou vytvářet micely, které mají hydrofóbní střed – tzv. pseudostacionární fáze.

Látky více zadržované micelami mají delší separační časy než látky v micelách zadržované méně. Elektromigrační separační proces je zde vhodně doplněn chromatografickým principem. [6,2]

Kapilární elektrochromatografie (CEC) kombinuje princip CE a HPLC. Kolona není pouze naplněna volným vodným roztokem, ale navíc obsahuje stacionární fázi tvořenou z mikročástic. Tok mobilní fáze je způsobem připojeným stejnosměrným napětím. [2] Výhodou CEC oproti HPLC je lineární rychlostní profil elektroosmotického toku, což umožňuje dosahovat vyšších účinností při separaci. [6]

Kapilární izotachoforéza (CITP) je metoda, při které se vzorek dávkuje mezi dva základní elektrolyty, vedoucí a koncový. Po zapnutí stejnosměrného elektrického proudu migrují zóny v pořadí jejich pohyblivosti. [6]

2.4 Nevodná kapilární elektroforéza

Nevodná kapilární elektroforéza je komplementární metodou ke kapilární zónové elektroforéze. Použití organických rozpouštědel, namísto vody, jako základního elektrolytu zvyšuje rozpustnost hydrofóbních analytů a selektivitu metody. [5]

Pomocí NACE mohou být separovány látky, které ve vodném prostředí podléhají reakcím, rozkládají se nebo je nelze rozseparovat s dostatečným rozlišením.

2.4.1 Historie nevodné kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza se jako univerzální analytická separační metoda objevila v současné podobě před asi třiceti lety, kdy Jorgenson a Lukacsová v roce 1981 provedli stanovení derivatizovaných aminokyselin a peptidů [7]

První užití základního elektrolytu založeného na organickém rozpouštědle bylo publikováno krátce po roce 1984, kdy Wahlbroehl a Jorgensen separovali deriváty chinolinu v acetonitrilu obsahujícím směsný systém chloristan tetraethylamonný/kyselina chlorovodíková. [8]

První práce publikující spojení NACE a MS byla vydána až v roce 1994 skupinou okolo S. Naylora. V roce 1999 byly Naylor a jeho skupinou spolupracovníků shrnuty dosud publikované práce týkající se analýzy léků a lipofilních peptidů. [3]

Do roku 2006 nebyl příliš patrný rozvoj NACE a jejího spojení s MS, protože ve srovnání s vodnými pufrů jsou procesy jako disociace a migrace v organickém rozpouštědle nedostatečně prozkoumány. [3] V současné době se však velké množství prací zabývá právě těmito specifickými problémy a využití NACE vzrůstá.

2.4.2 Rozpouštědla v nevodné kapilární elektroforéze

Jako rozpouštědla pro NACE se používají čistá organická rozpouštědla (např. methanol, acetonitril, n-propanol, dimethylsulfoxid, N,N-dimethylformamid, atd.) nebo jejich směsi.

Elektroforetická pohyblivost i elektroosmotický tok jsou závislé na viskozitě prostředí a dielektrické konstantě rozpouštědla. Hlavním určujícím parametrem je poměr ϵ/η (ϵ dielektrická konstanta, η viskozita rozpouštědla). V médiích s nízkým poměrem ϵ/η migrují ionty pomaleji, než v elektrolytu s vyšším poměrem ϵ/η . Změnou poměru ϵ/η lze ovlivnit mobilitu a tím i selektivitu separace. [3]

Rozdílné vlastnosti organických rozpouštědel mají významný vliv na interakce rozpuštěné látky – rozpouštědlo, rozpuštěné látky – aditivum, iont – iont probíhající v základním elektrolytu. Nevodná média tak nabízí prostor pro separační mechanismy založené na interakcích, které nelze uplatnit ve vodném prostředí. [3]

Organická rozpouštědla jsou především vhodná pro analyty se špatnou rozpustností ve vodě. Často je pozorována rozdílná selektivita. Nízké generované proudy ve srovnání s vodnými pufrů umožňují užití vyšší intenzity elektrického pole a užití širších průměrů kapilár. Vyšší těkavost a nižší povrchové napětí organických rozpouštědel dělají NACE vysoce kompatibilní s MS. [3]

Pro spojení NACE a MS se nejčastěji používá směs acetonitrilu a methanolu. Ostatní alkoholy (ethanol, 1-propanol a další) mají omezené použití. Typický elektrolyt zahrnuje dále octan amonný, případě mravenčan amonný nebo jejich kombinaci s příslušnou kyselinou. [3]

Tab. 2: Základní vlastnosti organických rozpouštědel a vody [3]

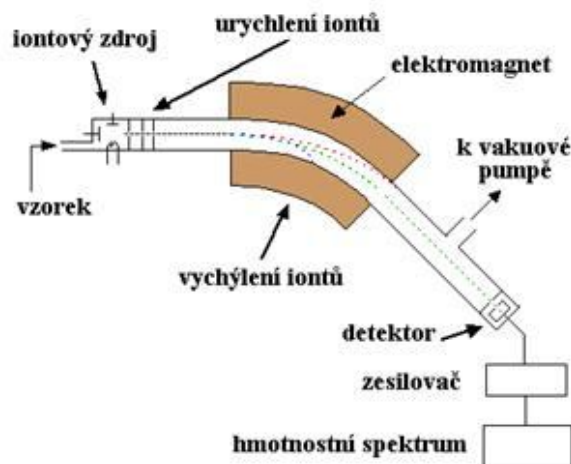
Rozpouštědlo	ϵ	η (mPa . s)	ϵ / η	γ (N.m ⁻¹)	pK _a	T _{varu} (°C)
methanol	32,70	0,545	60,0	0,0221	17,2	65
ethanol	24,55	1,078	22,8	0,0219	18,9	78
1-propanol	20,33	1,956	10,4	0,0233	19,4	97
2-propanol	19,92	2,073	9,6	0,0212	20,8	82
formamid	111,0	3,300	33,6	0,0579	16,8	210
acetonitril	37,50	0,341	110,0	0,0276	-	82
voda	78,39	0,890	88,1	0,0718	14,0	100

(ϵ – dielektrická konstanta, η – viskozita, γ - povrchové napětí)

3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je jedna z nejuniverzálnějších detekčních technik umožňující nejen detekci prakticky každého analytu, ale také poskytující strukturní informaci pro jeho jednoznačnou identifikaci.

MS je separační technika, která separuje desolvatované ionty studované látky dle jejich hodnoty podílu hmotnosti a náboje m/z . Základními kroky v této technice jsou: odpaření rozpouštědla, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem, detekce iontů.



Obr. 5: Schéma hmotnostního spektrometru (Zdroj: Jan Šíma, PŘF JČU)

3.1 Hmotnostní spektrometrie jako způsob detekce při CE

Spojení separačních technik (např. HPLC, CE, plynová chromatografie) s hmotnostní spektrometrií se stalo účinným nástrojem v chemických a biologických analýzách. Ačkoli je stále UV detekce nejčastěji používaným detektorem v CE, její citlivost je nízká, protože signály přímo souvisejí s krátkou optickou dráhou, která odráží vnitřní průměr kapiláry. Proto může být MS detektor zajímavou volbou. Nabízí vyšší citlivost a schopnost rozlišit některé překrývající se píky. MS poskytuje informace o molekulární hmotnosti a strukturní informace, které mohou být užity pro identifikaci neznámé látky nebo potvrzení její identity. [5]

Při spojení MS s CE se používají tři typy zdrojů iontů (ionizace): ionizace atmosferickým tlakem (elektrosprej (ESI), chemická ionizace atmosferickým tlakem (APCI), fotoionizace atmosferickým tlakem (APPI)), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), indukčně vázaná plazma (ICP). Hmotnostní analyzátoři nejčastěji využívají kvadrupól, iontovou past, detektor doby letu a iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací. [5]

4 Analýza léčiv

Chemická analýza je disciplína, která je silně spjatá s vývojem léčiv a farmaceutickou kontrolou jejich kvality a bezpečnosti. Bohužel jsou stále dostupná léčiva s velmi nízkou kvalitou či padělky. Kapilární elektroforéza je výkonná analytická metoda se zásadním významem v objevování léčiv a v aplikaci v jejich výrobních procesech, především díky jejímu specifickému mechanismu, rychlosti, účinnosti a univerzálnosti. [5]

Při analýze léčiv jsou kladeny na použitou metodu vysoké požadavky, protože je často nutné od sebe rozdělit látky s velmi podobnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Nejčastěji se používají chromatografické metody, ale v poslední době vzrůstá také obliba elektromigračních metod.

Nezbytnou součástí analýzy terapeutických účinků léčiv je kromě pozorování vnějších příznaků také laboratorní zpracování tělních tekutin. Analýza léčiv v tělních tekutinách přináší mnoho problémů, které jsou běžné pro všechny analytické separační techniky. Příčinou je přítomnost velkého množství různých sloučenin v organické matrici, které vedou k interferenci matrice s analytem a obtížnost detekce nízkých koncentrací. Proto se provádí úprava vzorku před vlastní analýzou. Běžné postupy přípravy vzorku zahrnují precipitaci proteinů, extrakci na pevné fázi nebo extrakci z kapaliny do kapaliny. Zakoncentrování je dosaženo pomocí odpaření organického rozpouštědla a rekonstituci vzorku v malém objemu. [6]

V praxi je nutné, aby metoda byla jednoduchá, spolehlivá, dostatečně selektivní a automatizovatelná. Tyto podmínky splňuje spojení NACE a MS.

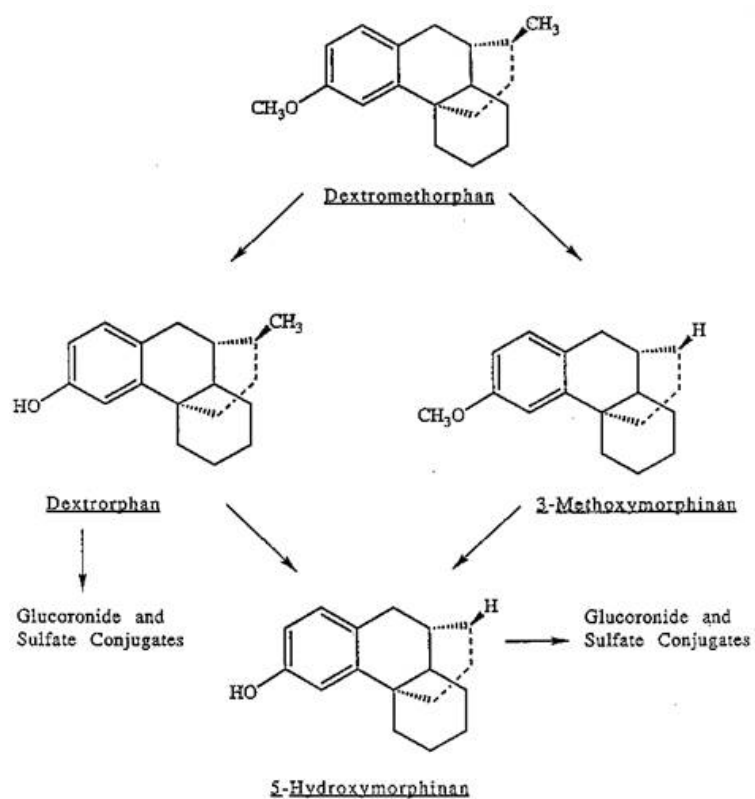
4.1 Dextromethorphan a jeho metabolismus

Dextromethorphan (DXM) patří chemickou podstatou mezi alkaloidy, z farmakologického hlediska jej řadíme mezi antitusika a analgetika. DXM je syntetické antitusikum s velmi dobrou tolerancí, které na rozdíl od kodeinu nemá narkotický účinek, a při jeho užívání existuje minimální riziko závislosti. V přípravcích na suchý kašel je obsažen ve formě dextromethorphan hydrobromidu.

Dextromethorphan je hydrofóbní látkou, proto se z trávicího ústrojí dobře vstřebává. Metabolity i nezměněná látka se vylučují močí.

Metabolismus DXM probíhá převážně v játrech a to dvěma cestami. Odbourání DXM je katalyzováno dvěma enzymy z rodiny cytochromu P450 (CYP) za vzniku aktivních demethylovaných metabolitů (Obr. 6). O-demethylace z DXM na dextrophan je katalyzována formou CYP 2D6 a za N-demethylaci z dextromethorphanu na methoxymorphan zodpovídá

forma CYP3A4. Oba tyto metabolity mohou být dále demethylovány na 3-hydroxymorphinan. [9]



Obr. 6: Metabolismus dextromethorphanu

5 Cíl práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma Nevodná elektroforéza pro separaci farmakologicky významných látek.

Hlavním cílem experimentální části bakalářské práce byla optimalizace parametrů separace dextromethorphanu a jeho metabolitů pomocí kapilární elektroforézy a provedení základní validace. Pomocí optimalizované metody provést analýzu reálného vzorku a využít vhodných vlastností nevodné kapilární elektroforézy pro spojení s hmotnostní spektrometrií.

6 Experimentální část

6.1 Materiál

6.1.1 Chemikálie

Dextromethorfan hydrobromid (Sigma Aldrich, Německo)
3-Methoxymorfinan hydrochlorid (Sigma Aldrich, Německo)
(+)-3-Hydroxymorfinan hydrobromid (Sigma Aldrich, Německo)
Dextrorfan D-tartrát (Chemos CZ, s.r.o., Česká republika)
Levallorfan (+)-tartrát (Sigma Aldrich, Německo)
Deionizovaná voda z přístroje Millipore (Millipore, Francie)
Hydroxid sodný (ONEX, Česká republika)
Acetonitril (Sigma Aldrich, Německo)
Methanol (Sigma Aldrich, Německo)
Octan amonný (Sigma Aldrich, Německo)
Thiomočovina (Sigma Aldrich, Německo)

6.1.2 Přístroje

Agilent 3D Kapilární elektroforetický systém, detektor: diodové pole s UV-VIS detekcí s rozsahem 190 - 600 nm (Waldbronm, Německo)
Software: Agilent 3D CE ChemStation
Kapilára: vnitřní průměr 75 μm , efektivní délka 40 cm, celková délka 48,5 cm (Polymicro Technologies, Arizona, USA)
Třepačka: Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
Digitální váhy: Sartorius LE225D (Sartorius, Švýcarsko)
Vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)
Centrifuga: miniSpin (Eppendorf, Německo)
Automatické pipety

6.2 Metody

6.2.1 Úprava kapiláry a promývání

Aktivace vnitřního povrchu nové kapilára probíhala:

1 M NaOH	10 minut
0,1 M NaOH	10 minut
deionizovaná voda	10 minut
acetonitril	10 minut
deionizovaná voda	10 minut

Každý den byla kapilára před začátkem práce promývána:

0,1 M NaOH	5 minut
deionizovaná voda	5 minut
methanol	10 minut
základní elektrolyt	10 minut

Před každou analýzou byla kapilára promývána 3 minuty základním elektrolytem. Po provedení každé separace byla kapilára promyta 1,5 minuty 0,1 M NaOH, 1 minutu methanolem a na závěr 2 minuty základním elektrolytem.

Po skončení denní práce byla kapilára na závěr promyta 5 minut 0,1 M NaOH, 10 minut MeOH, 2 minuty vzduchem.

6.2.2 Základní elektrolyt

Na základě dostupné literatury byl vybrán jako základní elektrolyt 40 mM octan amonný v methanolu s přidavkem 10% acetonitrilu. [10]

Navážka octanu amonného potřebná pro výslednou koncentraci 40 mM byla kvantitativně převedena do odměrné baňky pomocí methanolu. Dále bylo přidáno potřebné množství acetonitrilu pro objemovou procentuální koncentraci 10 %. Po rozpuštění a vytemperování roztoku na laboratorní teplotu byla odměrná baňka doplněna methanolem po rysku.

6.2.3 Příprava vzorku ze standardů

Jako vzorek pro optimalizaci a validaci metody sloužila směs dextromethorphanu a jeho metabolitů v methanolu. Jako interní standard se do směsi přidával levallorphan.

Z komerčně dostupných standardů jednotlivých látek se připravila potřebná navážka na přípravu zásobních roztoků o koncentraci 2 mM. Navážka byla pomocí methanolu kvantitativně převedena do odměrné baňky a po rozpuštění a vytemperování doplněna methanolem po rysku.

Připravené zásobní roztoky byly uchovávány zatažené Parafilmem^R M (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

Ředěním z připravených zásobních roztoků byl připravován vzorek pro jednotlivé separace.

6.2.4 Úprava reálného vzorku

Jako reálný vzorek byla použita moč pacienta užívajícího léčivo s obsahem dextromethorphanu.

Vzorek použitý pro analýzu byl získán z moči dle následujícího postupu extrakce:

- 0,5 ml moči pacienta přidat ke 4 ml směsi n-hexan:1-butanol (9:1 (v/v))
- směs intenzivně třepat 10 minut
- centrifugace (2500 rpm) – provádět pouze v případě vzniku mezifáze (nebylo prováděno)
- odebrat horní fázi (asi 3,5 ml, organická fáze)
- přidat 300 µl 10 mM HCl
- směs intenzivně třepat 10 minut
- směs zmrazit na -20 °C
- odebrat kapalnou organickou fázi, vodnou fázi po rozmražení použít pro další úpravu
- vodnou fázi odpařit na vakuové odparce (3 hodiny)

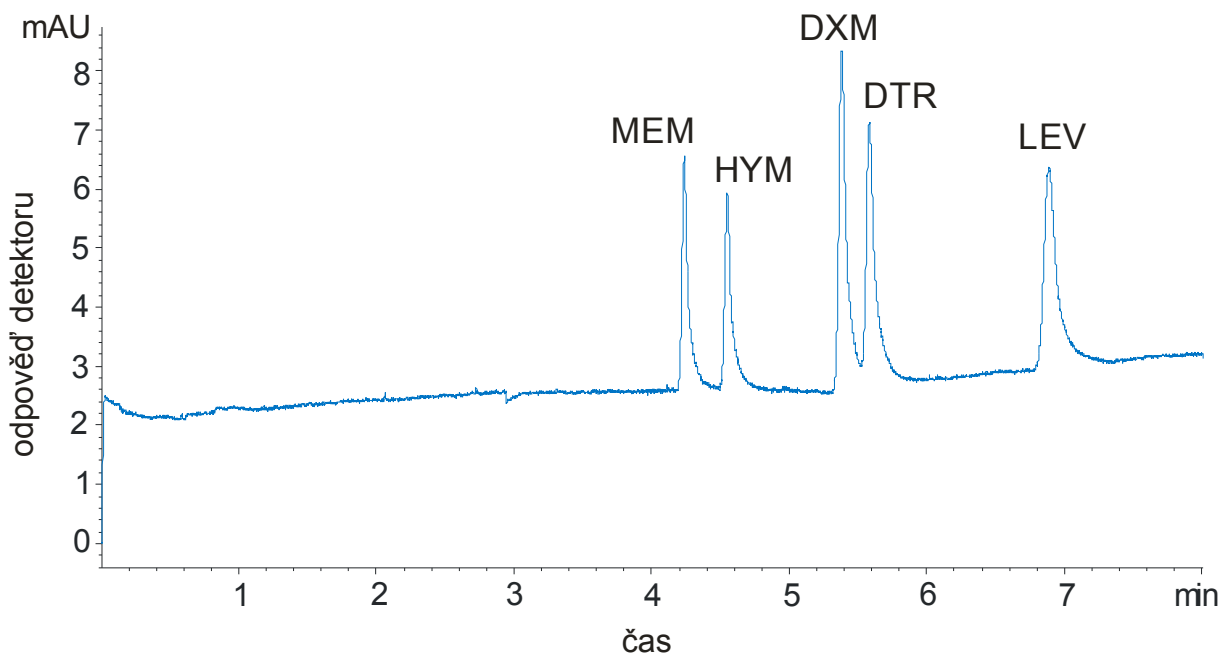
Před vlastní analýzou byl vzorek vhodně naředěn methanolem a byl k němu přidán interní standard levallorphan (výsledná $c = 100 \mu\text{M}$). Poté byla provedena analýza.

6.3 Optimalizace metody

Dle dostupné literatury byly pro analýzu vybrány následující parametry: teplota 25°C, separační napětí 23 kV, základní elektrolyt 40 mM octan amonný v 10% ACN v MeOH. [10]

Jako vzorek byla použita směs dextromethorphanu (DXM), dextrorphanu (DTR), methoxymorphanu (MEM), hydroxymorphanu (HYM) a interního standardu levallorphanu (LEV) rozpuštěná v methanolu. Výsledné koncentrace jednotlivých analytů

byly 100 μM . Za těchto podmínek byla provedena počáteční analýza, její výsledek je zobrazen na Obr. 7.



Obr. 7: Elektroferogram separace dextromethorphanu a jeho metabolitů

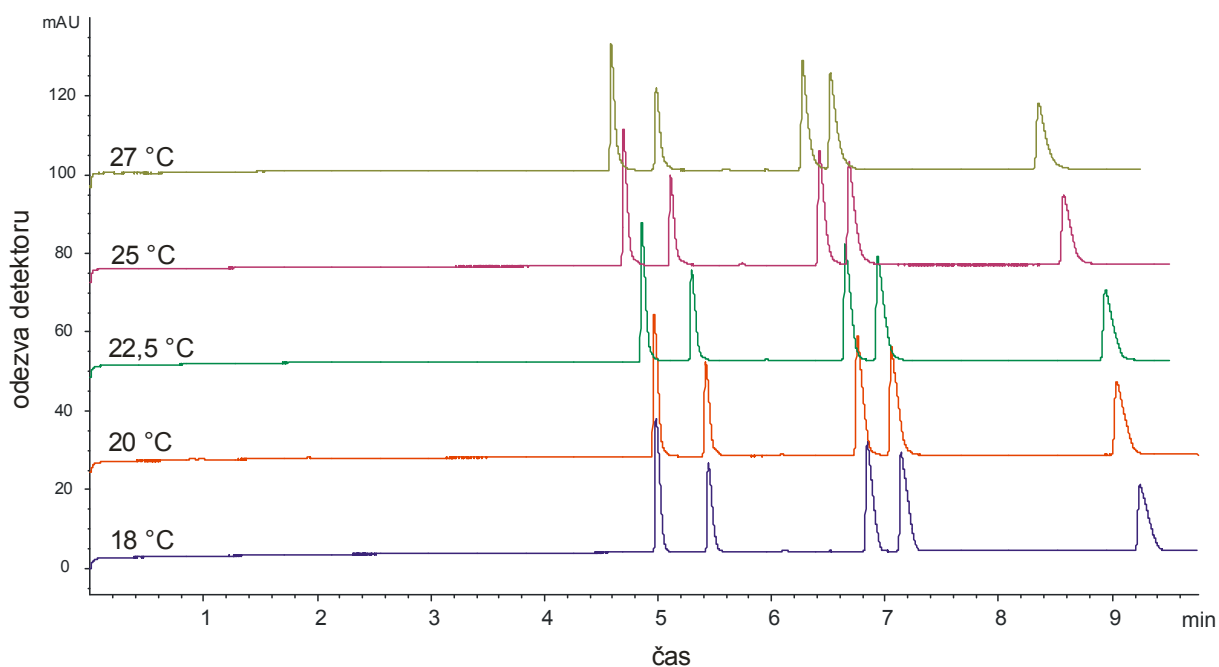
Při optimalizaci bylo nutné především zlepšit rozlišení píků dextromethorphanu a dextrorphanu. Vedlejším hlediskem, ke kterému bylo přihlíženo, byl separační čas.

Optimalizace byla zaměřena na 4 základní parametry: teplotu v separačním prostoru, separační napětí, vliv koncentrace octanu amonného a vliv přídavku acetonitrilu.

6.3.1 Optimalizace teploty

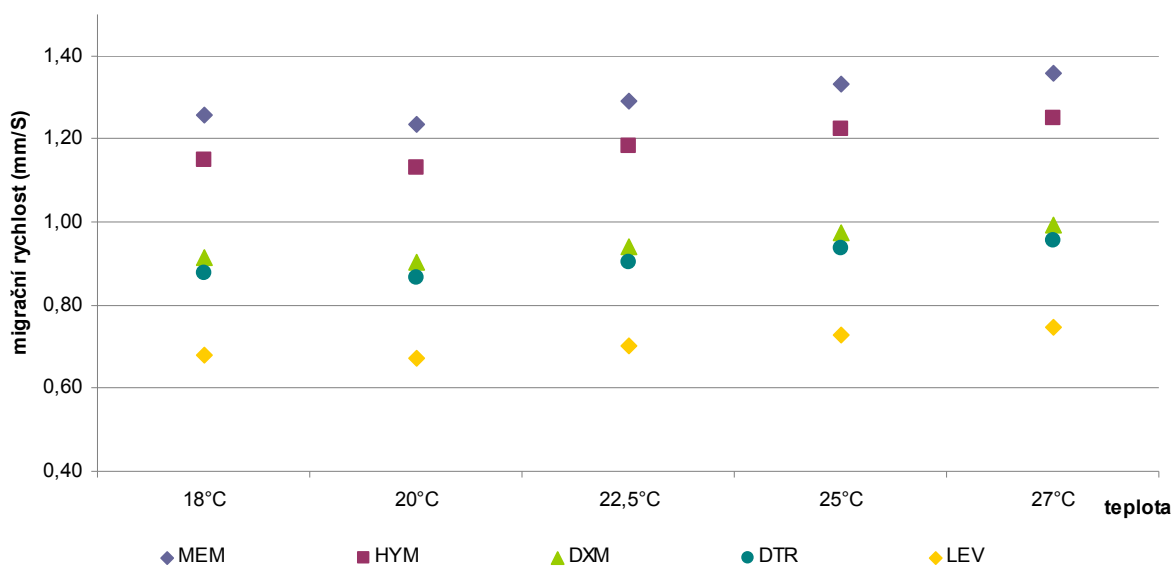
Teplota v separačním prostoru je důležitým parametrem z hlediska odvodu Jouleova tepla (str.6). Pro optimalizaci bylo vybráno pět teplot: 18-27 $^{\circ}\text{C}$.

Záznam elektroferogramů v závislosti na teplotě je zobrazen na Obr. 8.



Obr. 8: Elektroferogram závislosti na teplotě

Z elektroferogramů je patrné, že s rostoucí teplotou se mírně zvyšuje migrační rychlost a rozlišení píků DXM a DTR se příliš nemění. Graf závislosti migrační rychlosti jednotlivých analytů na teplotě je zobrazen na Obr. 9. Rozlišení píků DXM/DTR je shrnuto v Tab. 3.



Obr. 9: Graf závislosti migrační rychlosti jednotlivých analytů při různých teplotách

Tab. 3: Tabulka rozlišení DXM/DTR v závislosti na teplotě

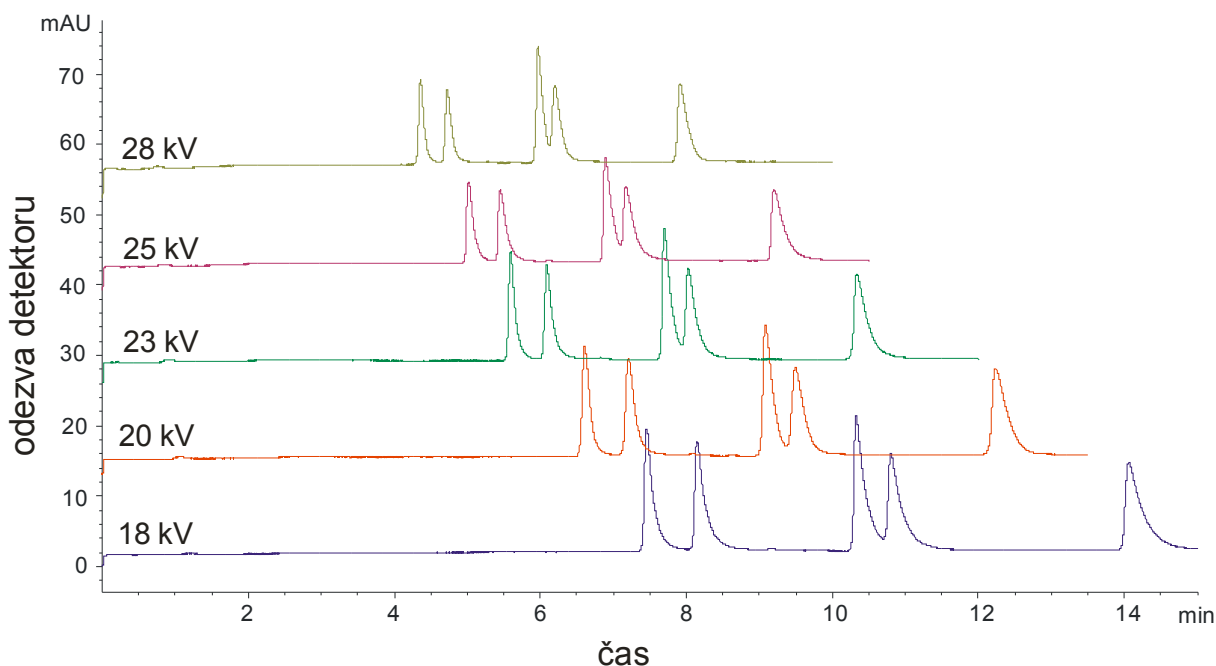
teplota	rozlišení DXM/DTR
18	2,485
20	2,64
22,5	2,515
25	2,46
27	2,355

Změna teploty v daném rozmezí neměla významný vliv na kvalitu separace dextromethorphanu a jeho metabolitů.

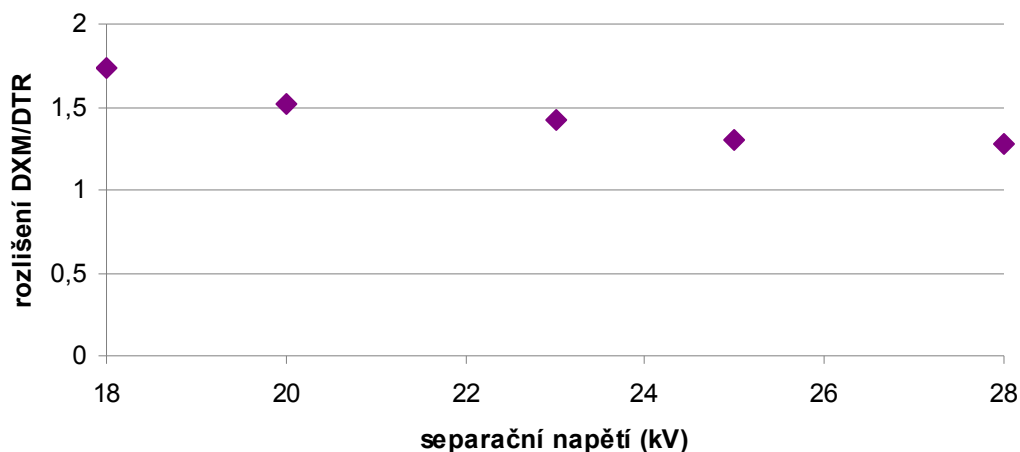
6.3.2 Optimalizace separačního napětí

Pro optimalizaci separačního napětí byl zvolen rozsah hodnot 18-28 kV. Přístrojové vybavení umožňuje použít napětí až do výše 30 kV, ale již při hodnotě 28 kV docházelo k významnému problému s nestabilitou elektrického proudu.

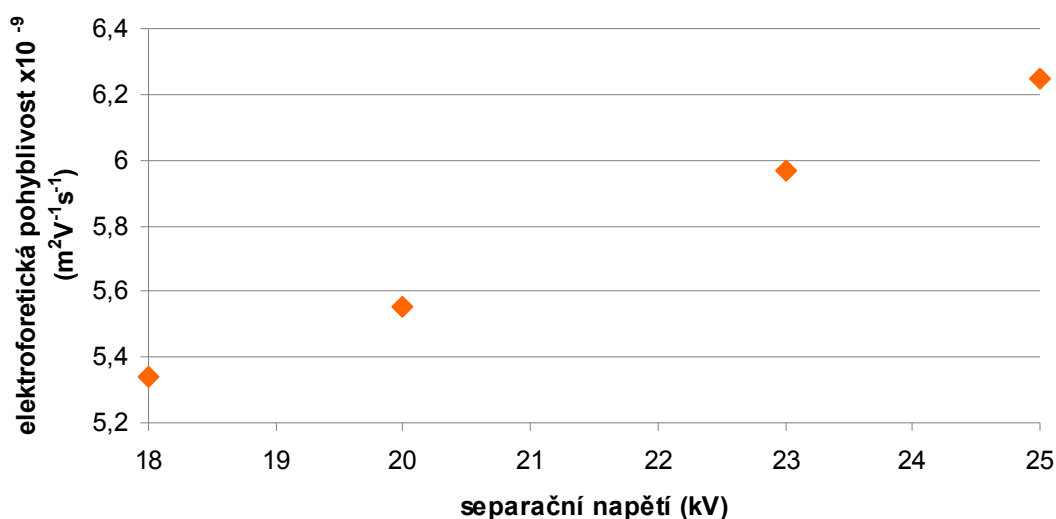
Elektroferogram z měření při jednotlivých napětích je na Obr. 10.



Obr. 10: Elektroferogram v závislosti na separačním napětí



Obr. 11: Graf závislosti rozlišení DXM/DTR na použitém separačním napětí

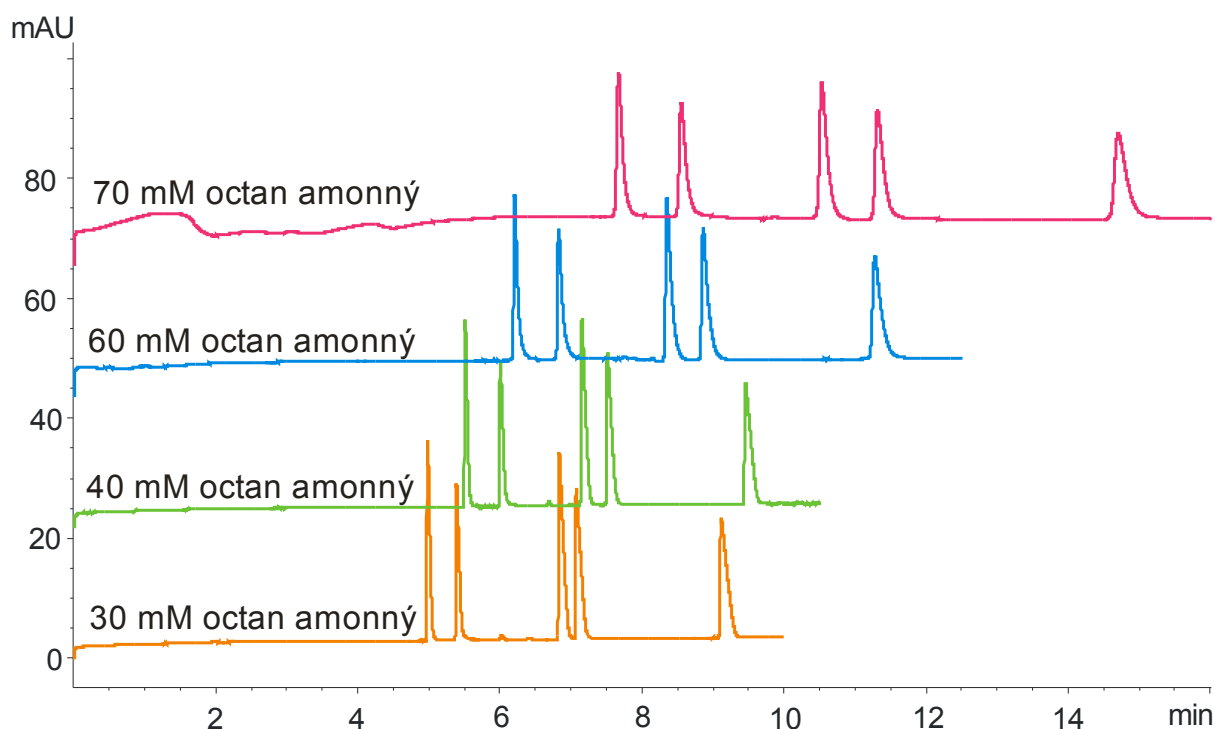


Obr. 12: Graf závislosti elektroforetické pohyblivosti na separačním napětí

S rostoucím separačním napětím se analýza významně urychluje, ale zároveň klesá hodnota rozlišení jednotlivých píků.

6.3.3 Optimalizace koncentrace octanu amonného

Octan amonný výrazně ovlivňuje elektroosmotický tok a viskozitu elektrolytu. Počáteční koncentrace octanu amonného 40 mM byla vybrána na základě literatury [10]. V rámci optimalizace byly proměřeny elektroferogramy pro hodnoty koncentrací 30-70 mM. Vliv koncentrace na migrační čas, tvar a rozlišení píků zobrazuje Obr. 13. Z porovnání elektroferogramů je patrné, že s rostoucí koncentrací octanu amonného se zlepšuje rozlišení píků dextromethorphanu a dextrophanu (třetí a čtvrtý pík), ale významně se prodlužuje separační čas.



Obr. 13: Optimalizace koncentrace octanu amonného

Hodnoty rozlišení píků DXM a DTR a dobu migrace interního standardu Levallorphanu přehledně shrnuje následující tabulka:

Tab. 4: Rozlišení DXM a DTR a migrační čas LEV a účinnost LEV v závislosti na koncentraci octanu amonného

Koncentrace octanu amonného (mM)	Rozlišení DXM a DTR	Migrační čas Levallorphanu (min)	účinnost separace pro LEV (N/m)
30	1,84	9,2	98 000
40	3,13	9,5	136 000
60	3,83	11,5	129 000
70	4,25	15,6	74 000

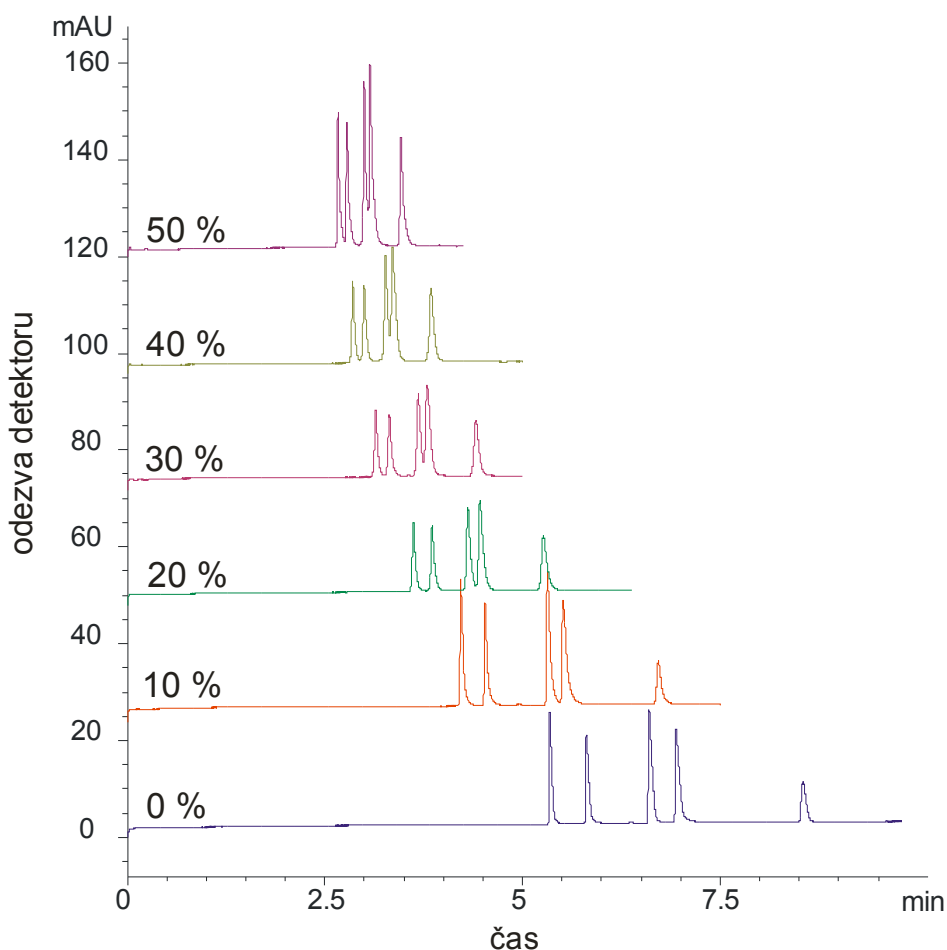
Z výše uvedené tabulky je patrné, že hodnoty rozlišení píků DXM a DTR jsou přijatelné pro koncentrace od 40 mM, s ohledem na separační čas byla jako optimální hodnota zvolena koncentrace octanu amonného 40 mM.

Při koncentraci octanu amonného 40 mM byla zjištěna i nejvyšší účinnost separace. Účinnost separace byla stanovena pro interní standard Levallorphan a přepočtena na délku kapiláry 1 m.

6.3.4 Optimalizace koncentrace acetonitrilu

Se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu (ACN) v základním elektrolytu se snižuje migrační čas. Toto chování je především důsledkem modifikace poměru dielektrické konstanty a viskozity. Citlivost detekce byla nejvyšší, když koncentrace ACN byla 10% (v/v). [10]

V rámci optimalizace metody byla provedena série měření se základním elektrolytem obsahujícím 0-50% ACN v 40mM octanu amonném v MeOH. Elektroferogramy z měření jsou zobrazeny na obrázku:



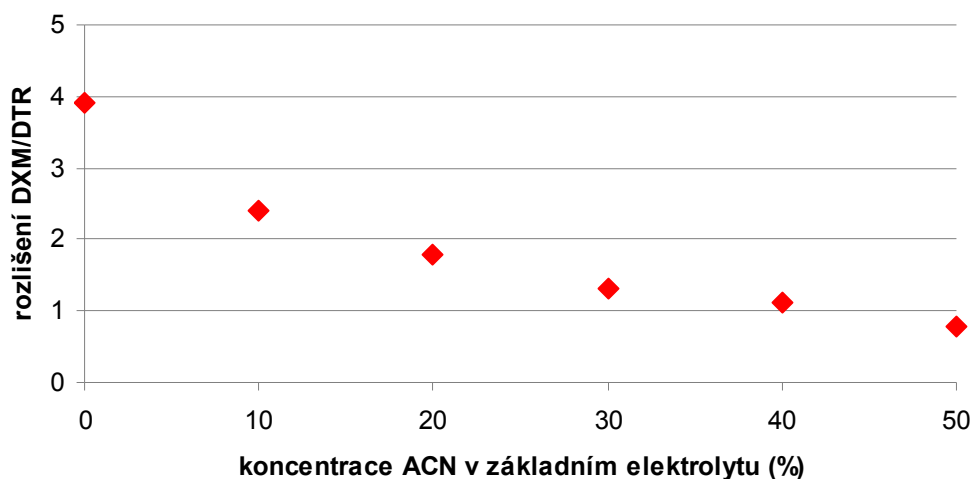
Obr. 14: Elektroferogram v závislosti na obsahu ACN

Následující tabulka porovnává vybrané parametry posuzované při optimalizaci:

Tab. 5: Parametry optimalizace obsahu ACN

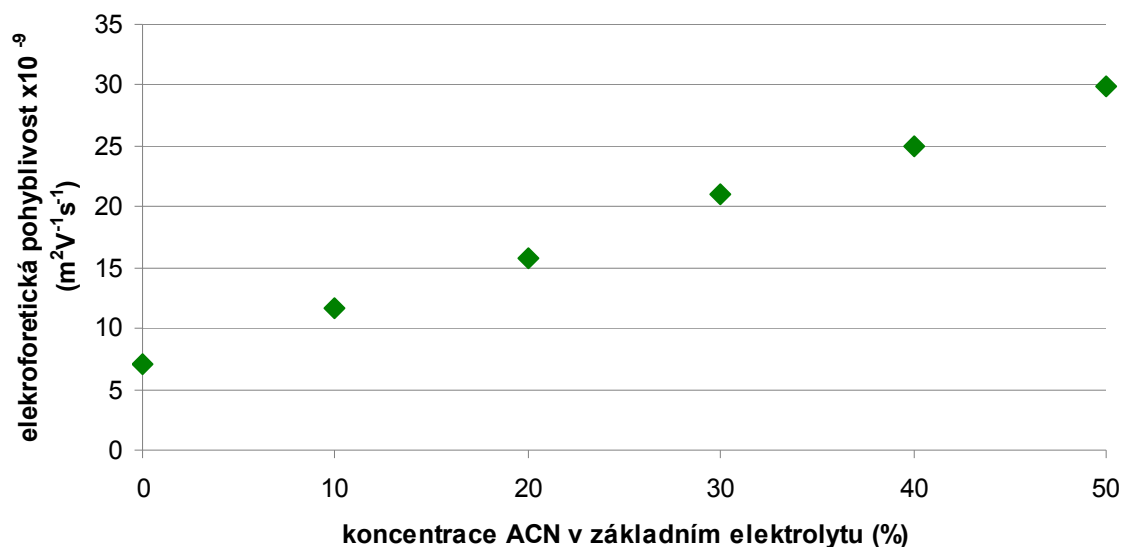
obsah ACN (%)	Rozlišení DXM a DTR	Migrační čas levallorphanu (min)	účinnost separace pro LEV (N/m)
0	3,9	8,6	279 000
10	2,4	6,7	165 000
20	1,8	5,3	87 000
30	1,3	4,4	72 000
40	1,1	3,9	65 000
50	0,8	3,5	17 000

Následující graf přehledně zobrazuje závislost rozlišení DXM a DTR v závislosti na obsahu ACN vycházející z hodnot v tabulce Tab. 5. Z grafu je patrná silně klesající tendence rozlišení s rostoucí koncentrací ACN v základním elektrolytu.



Obr. 15: Graf závislosti rozlišení DXM a DTR v závislosti na koncentraci ACN

Přestože na rozlišení píků DXM a DTR měl přídavek ACN negativní vliv, z hlediska migračních časů působil přídavek ACN pozitivně. S přídavkem ACN se výrazně snižovaly migrační časy, tedy zvyšovala elektroforetická pohyblivost.



Obr. 16: Závislost elektroforetické pohyblivosti na koncentraci ACN

Na základě dostupných výsledků z procesu optimalizace byl jako nejvhodnější základní elektrolyt zvolen 40 mM octan amonný bez přídavku ACN. Přídavek ACN zhoršoval rozlišení píků DXM a DTR a účinnost separace. Urychlení separace nevyvážilo zhoršení výše uvedených parametrů.

6.3.5 Shrnutí optimálních separačních podmínek

Optimální separační podmínky jsou přehledně shrnuty v následující tabulce:

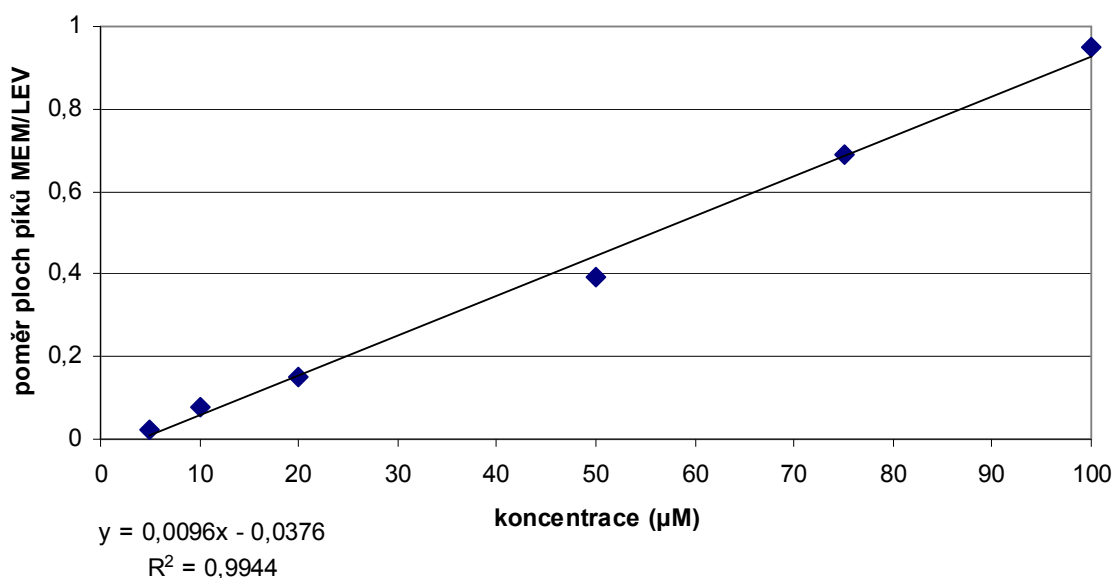
Tab. 6: Optimální separační podmínky

Přístroj	Agilent 3DCE System	
Kapilára	Křemenná kapilára vnitřní průměr 75 µm, 48.5/40 cm L _{tot} /L _{eff} , nepotažená	
Teplota	karusel kapilára	okolní 25°C
Detekce	Pomocí diodového pole, 214 nm	
Napětí	23 kV	
Základní elektrolyt (BGE)	40 mM octan amonný V methanolu, pH* 8.0,	
Promytí kapiláry	Před analýzou Po analýze	3 min BGE 1.5 min 0,1 M NaOH, 1 min methanol, 2 min BGE

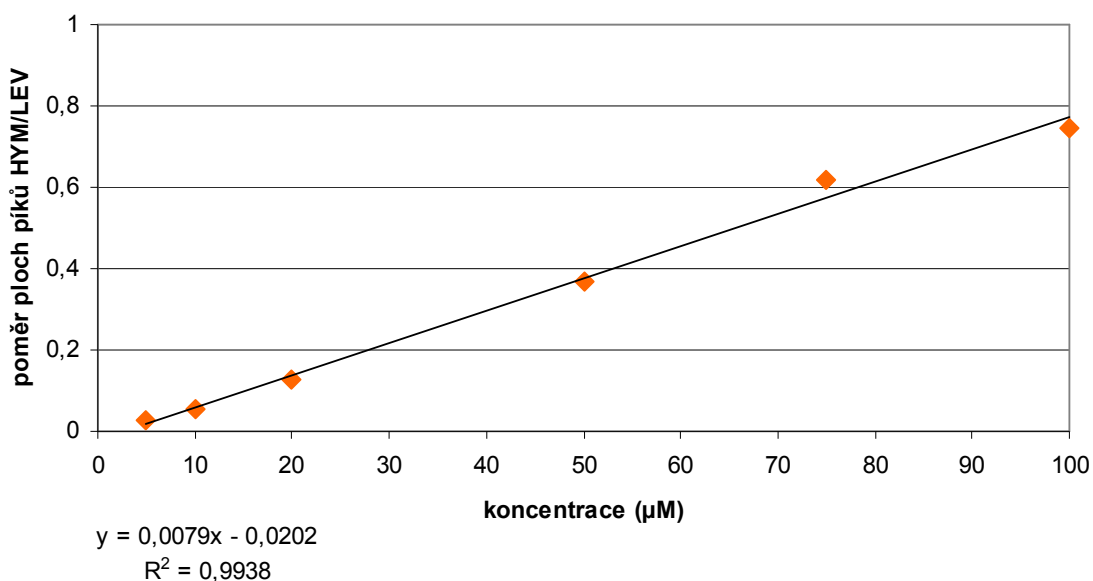
6.4 Základní validace metody

V rámci statistického testování metody byla provedena základní validace. Byla změřena kalibrační závislost pro jednotlivé analyty, stanoven rozsah linearity, limity detekce a kvantifikace a opakovatelnost.

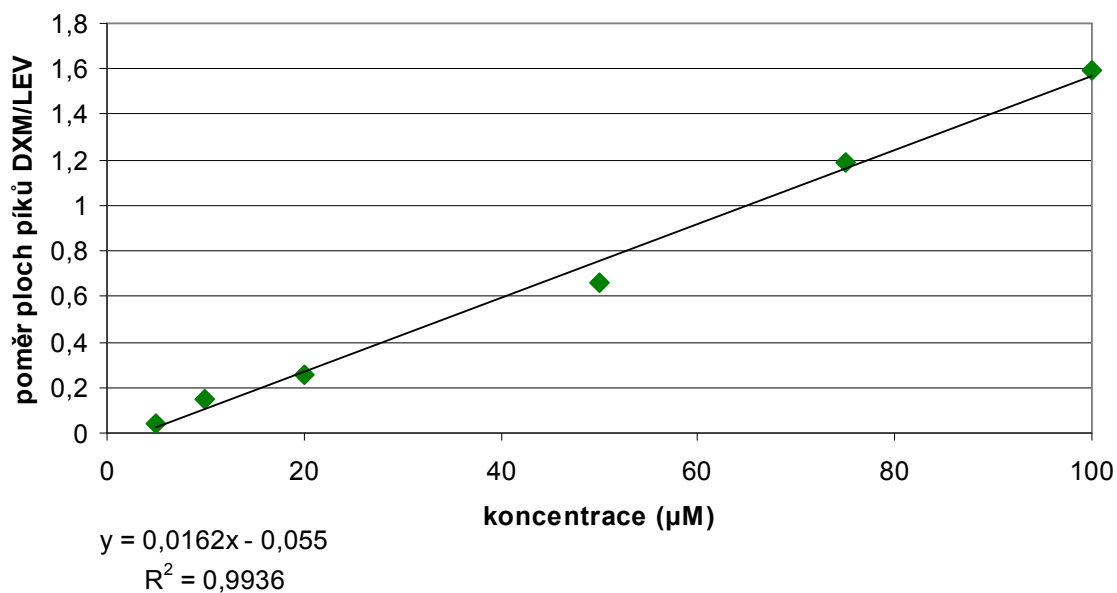
Kalibrační závislost byla měřena pro rozsah koncentrací 5–100 μM . Na základě výsledků kalibrace shrnutých v následujících grafech bylo stanoveno, že metoda je lineární na tomto rozsahu koncentrací. Pro sestrojení kalibračních závislostí bylo použito kalibrace z poměrů ploch pík požadovaného analytu příslušné koncentrace a interního standardu (levallorphan, 100 μM).



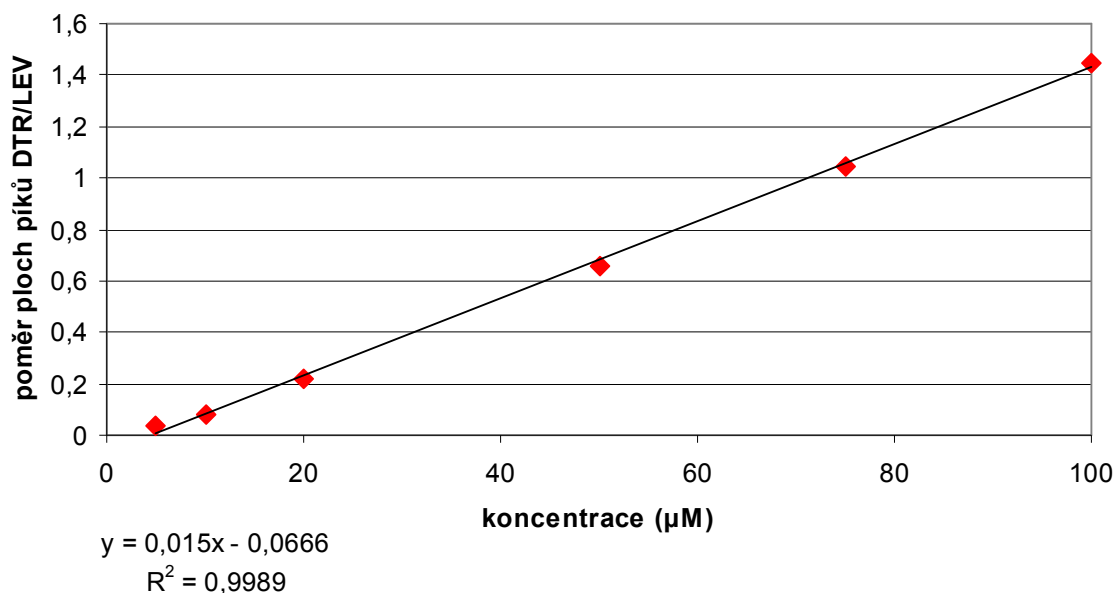
Obr. 17: Kalibrační křivka: poměr ploch MEM/LEV



Obr. 18: Kalibrační křivka: poměr ploch HYM/LEV



Obr. 19: Kalibrační křivka: poměr ploch DXM/LEV



Obr. 20: Kalibrační křivka: poměr ploch DTR/LEV

Stanovení **opakovatelnosti** bylo provedeno na 10 měřeních. Z výsledků 10 měření byla stanovena relativní směrodatná odchylka pro hodnoty migračních časů jednotlivých analytů a pro poměr ploch jednotlivých analytů vůči ploše píku interního standardu. Hodnoty standardních odchylek jsou shrnuty v Tab. 7.

Stanovení limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ) bylo provedeno z hladiny šumu na základě vztahů (1) a (2):

$$\text{LOD: } S/N = 3 \quad (1)$$

$$\text{LOQ: } S/N = 10 \quad (2)$$

(S – hodnota signálu posuzovaného píku, N – hodnota šumu v okolí posuzovaného píku)

Shrnutí základních validačních parametrů je v následující tabulce:

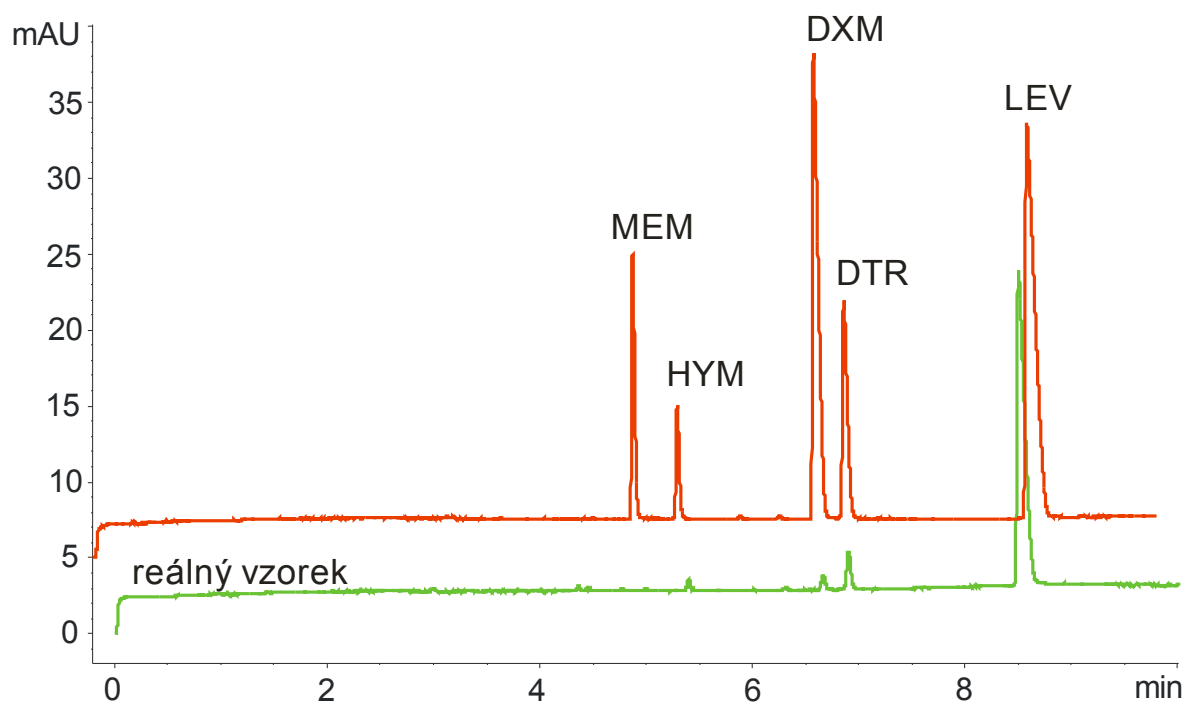
Tab. 7: Základní validační parametry

Validační parametry		MEM	HYM	DEX	DTR
		50 μM	25 μM	50 μM	50 μM
Opakovatelnost	t_m	0.3	0.5	0.7	0.5
(n = 10)	A_I/A_{IS}	3.0	3.1	1.0	5.3
Linearita	rozsah	4 - 100 μM			
	R^2	0.994	0.994	0.994	0.999
Citlivost	LOD	1 μM			
	LOQ	4 μM			

6.5 Analýza reálného vzorku

Reálný vzorek byl získán z moči pacienta užívajícího léčivo s obsahem dextromethorphanu. Moč byla upravena extrakcí popsanou na str. 17.

Analýza reálného vzorku byla provedena za optimálních separačních podmínek (viz Tab. 6).



Obr. 21: Elektroferogram analýzy reálného vzorku s porovnáním analýzy komerčních standardů

Na základě kalibrační závislosti byly stanoveny koncentrace jednotlivých analytů v reálném vzorku. Pro názornost byly hodnoty koncentrací přepočteny na obsah jednotlivých analytů v neupravené moči. Výsledné hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Stanovené hodnoty koncentrací jednotlivých analytů v reálném vzorku

analyt	stanovená koncentrace (μM)	přepočtená koncentrace na obsah v reálném vzorku (μg/l)
MEM	pod LOD	
HYM	4 μM	144 μg/l
DXM	pod LOQ (cca 2,5 μM)	
DTR	10,5 μM	510 μg/l

7 Diskuze

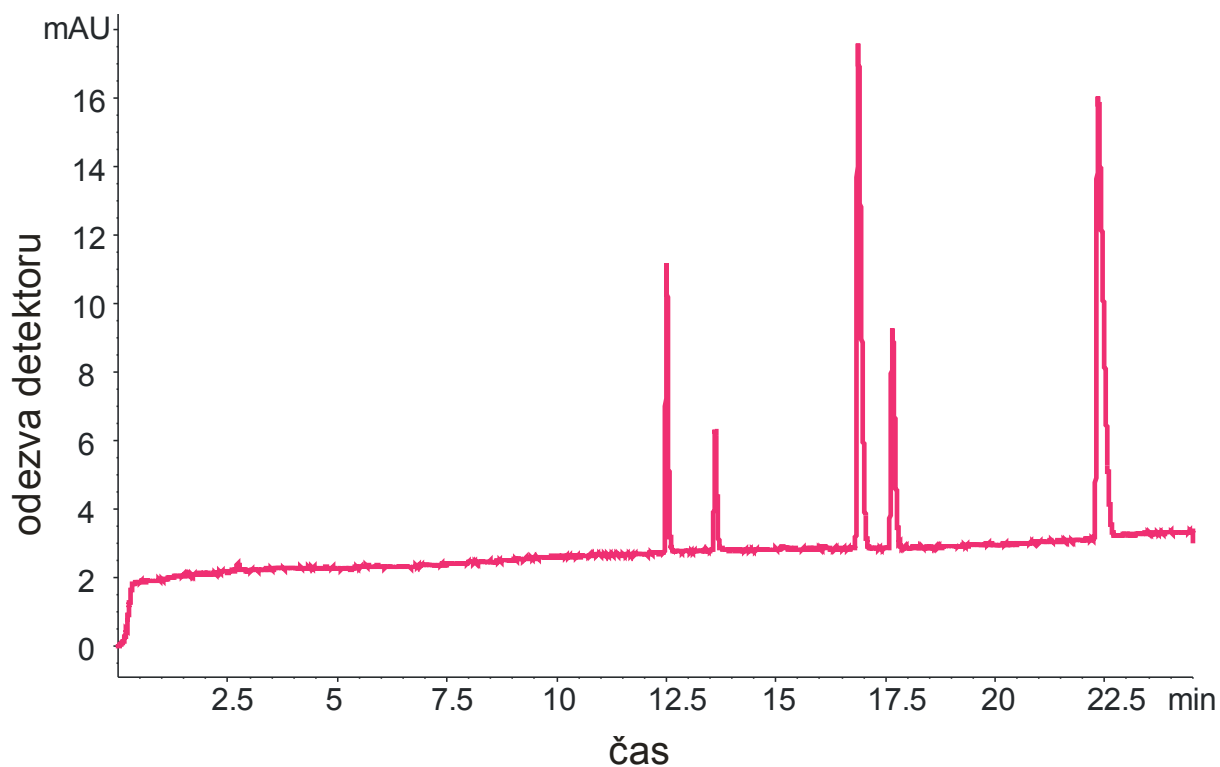
V rámci optimalizace byly stanoveny ideální podmínky pro separaci dextromethorphanu a jeho metabolitů (viz Tab. 6). Tyto podmínky neodpovídají plně publikovaným pracem, z kterých jsme v experimentální části vycházeli [10]. Hlavní příčina tohoto nesouladu je volba složení vzorku. V publikovaných pracech nebyl dextromethorphan separován společně s dextrorphanem, ale s jinými složkami léků při nachlazení. Vzhledem k chemické podobnosti obou látek a podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem bylo nutné se na rozlišení píků DXM a DTR více zaměřit. Pomocí optimalizace podmínek se nám povedlo dosáhnout velmi dobrých výsledků.

Kvalitu separace nejvíce ovlivňovalo složení základního elektrolytu, teplota a separační napětí neměly příliš významný vliv. Základní elektrolyt obsahoval octan amonný rozpuštěný v methanolu, s případným přídavkem acetonitrilu. Octan amonný významně ovlivňuje elektroosmotický tok a viskozitu elektrolytu. S jeho rostoucí koncentrací významně roste migrační čas a zlepšuje se rozlišení píků DXM/DTR. V rámci optimalizace bylo tedy nutné najít nejvhodnější poměr mezi rozlišením a dobou separace. Této podmínce odpovídala hodnota koncentrace 40 mM. Přídavek acetonitrilu způsobuje změnu poměru ϵ/η . V publikované práci [10] byla jako optimální hodnota vybrána koncentrace 10% (v/v). Při separaci DXM a jeho metabolitů tato koncentrace významně snižovala účinnost separace i rozlišení píků DXM/DTR. Jako optimální elektrolyt byl navržen roztok 40 mM octanu amonného v methanolu bez přídavku acetonitrilu.

Metoda dosahuje za optimálních separačních podmínek velmi dobrých validačních parametrů. Při analýze reálného vzorku se projevilo, že hodnoty koncentrací jednotlivých analytů v reálných vzorcích jsou velmi nízké. Před použitím metody v klinické praxi by bylo vhodné doplnit kalibrační křivku o hodnoty nižších koncentrací (4–20 μM) a provést kompletnější validaci.

Metoda je v současné době připravena pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro toto spojení bude nutné použít delší kapiláru. Nyní byla použita kapilára délky 48,5/40 cm, předpokládaná délka kapiláry pro spojení CE-MS je 80/71,5 cm. Při použití delší kapiláry bude nutné upravit stávající separační podmínky (především hodnotu separačního napětí). Při přímém spojení CE-MS je doporučována ionizace pomocí elektrospreje (ESI) [3,11]. Při spojení CE-MS bude nutné optimalizovat složení přídavné kapaliny [3]. Jako vhodná přídavná kapalina je často doporučována kyselina octová nebo kyselina mravenčí [12].

Na Obr. 22 je záznam separace při použití kapiláry s délkou 80/71,5 cm, vhodné pro spojení CE s MS. Při použití delší kapiláry, se prodlouží separační čas, alelepší se rozlišení jednotlivých píků.



Obr. 22: Elektroferogram separace při použití kapiláry délky 80/71,5 cm.

8 Závěr

Pomocí nevodné kapilární elektroforézy byl separován dextromethorphan a jeho metabolity. Metoda byla optimalizována a jako nejvhodnější byly stanoveny tyto hodnoty jednotlivých parametrů: teplota 25 °C, separační napětí 23 kV, koncentrace octanu 40 mM, obsah ACN 0%. Hodnoty přibližně odpovídají hodnotám výchozím, získaným na základě studia dostupné literatury. Pro metodu byly stanoveny základní validační parametry.

Metoda je připravena pro spojení s hmotnostní spektrometrií.

Metoda byla aplikována na reálný vzorek moči pacienta a je připravena pro následné využití v klinické praxi.

9 Seznam zkratk

ACN	acetonitril
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DTR	dextrorphan
DXM	dextromethorphan
EOF	elektroosmotický tok
ESI	elektrosprej
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HYM	hydroxymorphinan
LEV	levallorphan
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEM	methoxymorphinan
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NACE	nevodná kapilární zónová elektroforéza
NaOH	hydroxid sodný
UV	oblast ultrafialového záření
VIS	oblast viditelného záření

10 Použitá literatura

- [1] PLAČEK, L. Nezapomeňte na kapilární elektroforézu!. *CHEMAGAZÍN*. 2011, XXI, 2, s. 11.
- [2] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. uprav. a dopl. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 8086369072.
- [3] SCRIBA, G. K. E. Nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2007, 1159, s. 28-41.
- [4] *High Performance Capillary Electrophoresis*. Germany : Agilent Technologies, 2010. 174 s. ISBN 5990-3777EN.
- [5] SUNTORNSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 398, s. 29-52.
- [6] PAVLÍKOVÁ, Lucie, et al. Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2007, 21, s. 79-83.
- [7] JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K.D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*. 1981, vol. 53, no. 8, s. 1298-1302.
- [8] WAHLBROEL, Y; JORGENSEN, J. W. *Journal of Chromatography*. 1984, vol. 315, s. 135-143.
- [9] LI, S., et al. Determination of Dextromethorphan and Dextrophan in Urine by Capillary zone Electrophoresis: Application to the determination of Debrisoquin-Oxidation Metabolic Phenotype. *Chromatographia*. 1993, 35, s. 216-222.
- [10] DONG, Y., et al. Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, 39, s. 285-289.
- [11] KLAMPFL, CH. W. CE with MS detection: A rapidly developing hyphenated technique. *Electrophoresis*. 2009, 30, s. 83-91.
- [12] ROSS, G. A. Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry: Practical Implementation and Applications. *LC GC Europe*. 2001, January