

Kapilarna elektroforeza u farmaciji

MIRANDA DAMIĆ, BILJANA NIGOVIĆ

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Kapilarna elektroforeza još se uvijek smatra novom separacijskom tehnikom (1). Godine 1981. Jorgenson i Lukacs uvode instrument kakav i danas koristimo. Kapilarna elektroforeza je analitička tehnika koja se nadopunjuje s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ili ju zamjenjuje. Od prednosti treba istaknuti kratko vrijeme analize, visoku učinkovitost, različite mehanizme razdvajanja, mogućnost analize svih vrsta analita, potrebne vrlo male količine uzoraka i otapala, niske troškove, jednostavnost tehnike i ekološku prihvatljivost. Primjenu je našla u analizi velikih molekula, poput proteina, peptida i nukleinskih kiselina, malih organskih molekula, poput lijekova, hormona, biljnih metabolita, sastojaka prehrambenih namirnica te anorganskih iona (1, 2).

Kapilarna elektroforeza je farmakopejska tehnika. Prvi put se javlja u četvrtom izdanju Europske farmakopeje. U 6. izdanju Europske farmakopeje, kapilarna elektroforeza nalazi se u poglavlju opće monografije za monoklonalna antitijela za ljude te za utvrđivanje identiteta i ispitivanje čistoće u monografijama primjerice somatropina, eritropoetina, alteplaze za ljude, faktora zgrušavanja VIII, glutaciona, heparin-kalcija, heparin-natrija, levokabastin-hidroklorida, inhibitora α 1-proteinaze, ropivakapin hidroklorid monohidrata i dr (3).

Unatoč svim prednostima i mogućnostima primjene, kapilarna elektroforeza još se uvijek premalo koristi i istražuje.

KAPILARNO ELEKTROFORETSKE TEHNIKE

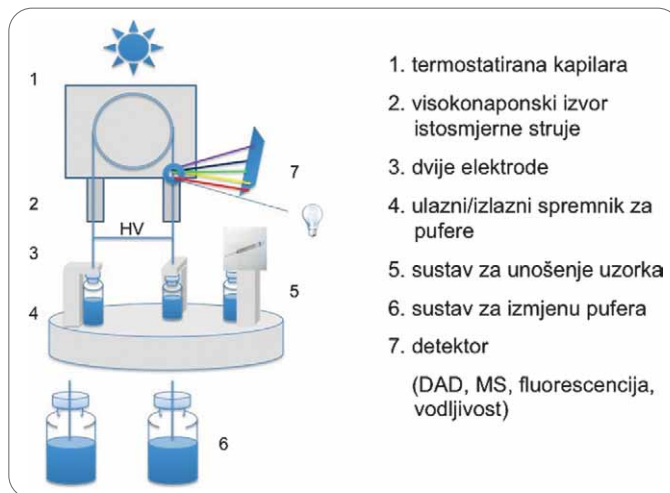
Osnovno načelo tehnike jest putovanje nabijenih čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (do 30 kV) u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda (4). Shema instrumenta prikazana je na slici 1.

Brzina kojom čestice putuju opisana je izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E$$

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} je elektroforetska pokretljivost čestice, a E je jakost primijenjenog električnog polja.

Jakost primijenjenog električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i dužini kapilare:



Slika 1. Shema instrumenta za kapilarnu elektroforezu

$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L je duljina kapilare u cm.

Elektroforetska pokretljivost čestice (μ_{ep}) dana je izrazom :

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

gdje je q naboj čestice, r je polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η viskoznost otopine elektrolita.

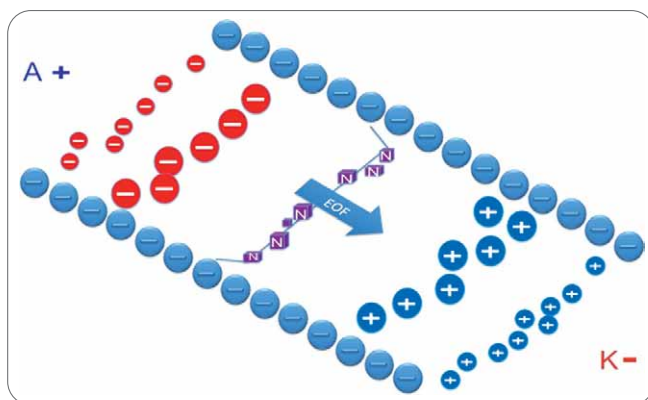
Ako se sve jednadžbe povežu, dobije se izraz za brzinu putovanja analita:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L}$$

Dakle, djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom ovisno o njihovom naboju i ionskom radijusu.

Iako se na prvi pogled čini da se kapilarnom elektroforezom mogu razdvajati samo nabijene čestice, neutralni analiti također putuju kapilarnom zbog elektroosmotskog (elektroendoosmotskog) toka. To je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Naime, unutrašnja površina stijenke kapilare (najčešće od izvučenog kvarca) sadrži brojne silanolne grupe koje se ovisno o pH vrijednosti elektrolita mogu nalaziti u anionskoj formi. Stvara se dvostruki električni sloj, čvrsti dio (jedan red iona suprotnog naboja od onog na površini kapilare, dakle kationa) i difuzijski dio u kojem se javljaju i kationi i anioni. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom dijelu dvostrukog sloja privučeni su prema katodi.

Budući da su otopljeni, oni svojim kretanjem prema katodi povlače za sobom i okolnu tekućinu. Elektroosmotski tok prikazan je na slici 2.



Slika 2. Elektroosmotski tok

Elektroosmotski tok pufera utječe na vrijeme zadržavanja čestice u kapilari s obzirom na to da se njegova elektroosmotska pokretljivost pridodaje ili oduzima elektroforetskoj pokretljivosti čestice, što je iskazano u jednadžbi:

$$t = \frac{L}{v_{ep} \pm v_{eo}} = \frac{L^2}{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})V}$$

gdje je t vrijeme putovanja čestice cijelom dužinom kapilare.

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari ovisi o elektroosmotskoj pokretljivosti pufera (odnosno dielektričnoj konstanti pufera, zeta potencijalu na površini kapilare i viskoznosti pufera) i jakosti električnog polja (5).

Jedinstvena odlika elektroosmotskog toka u kapilari je ravan profil toka. To je stoga, jer je sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena uzduž kapilare odnosno uz njene stijenke, nema pada tlaka unutar kapilare i tok je gotovo uniforman cijelom dužinom kapilare. Ravan profil je povoljan, jer direktno ne pridonosi disperziji zona analita. To je u suprotnosti s laminarnim ili parabolnim tokom do kojeg dolazi kod uporabe vanjske pumpe u tekućinskoj kromatografiji uslijed trenja stijenke.

Još jedna prednost elektroosmotskog toka je da uzrokuje kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o naboju. Pod normalnim uvjetima (odnosno uz uvjet da se radi o negativno nabijenoj površini kapilare), elektroosmotski tok je usmjeren od anode prema katodi. Anioni će također putovati prema katodi, jer je veličina elektroosmotskog toka za više od jednog reda veličine veća od njihove elektroforetske pokretljivosti. Zahvaljujući tome, kationi, neutralne molekule i anioni mogu se analizirati istovremeno, jer se svi kreću u istom smjeru. Kationi putuju najbrže, jer su njihovo elektroforetsko privlačenje i EOF (*electroosmotic flow*) usmjereni u istom smjeru tj. prema katodi. Neutralne molekule nošene

su brzinom elektroosmotskog toka, ali se ne razdvajaju jedne od drugih. Anioni putuju najsporije, jer su privučeni prema anodi, ali svejedno putuju prema katodi nošeni elektroosmotskim tokom.

Stoga je prilikom razvoja nove kapilarno elektroforetske metode potrebno optimirati nekoliko parametara koji u prvom redu utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita. To su vrsta i koncentracija pufera, pH pufera, dodatak organskih otapala, vrsta i koncentracija površinski aktivnih tvari, napon i temperatura pri kojima se analiza odvija, te izbor kapilare (produljeni optički put, kemijska modifikacija unutrašnje stijenke kapilare).

Kapilarna elektroforeza može koristiti nekoliko vrsta detektora, ovisno o vrsti analita i cilju analize. Najčešće su korišteni UV detektor, fluorescencijski detektor, maseni spektrometar ili površinski poboljšana raman spektroskopija.

Prema mehanizmu razdvajanja različitih analita postoji više vrsta kapilarno elektroforetskih tehnika prikazanih u tablici 1.

Tablica 1. Vrste kapilarne elektroforeze

Vrste kapilarne elektroforeze	Vrste analita
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)

Kapilarna zonska elektroforeza (CZE) ili kapilarna elektroforeza slobodne otopine je najjednostavniji oblik kapilarne elektroforeze, pretežno iz razloga jer je kapilara ispunjena samo puferom. Do razdvajanja otopljenih tvari dolazi zbog njihove različite elektroforetske pokretljivosti u puferu. Tvari koje imaju različitu elektroforetsku pokretljivost putuju u odijeljenim zonama različitim brzinom. Kapilarnom zonskom elektroforezom moguće je odijeliti i anionske i kationske otopljene tvari zahvaljujući elektroosmotskom toku (EOF). Neutralne otopljene tvari se ne mogu međusobno razdvojiti ovom metodom, već one koeluiraju s elektroosmotskim tokom (4).

Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)

Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) kombinacije je elektroforeze i kromatografije (4). To je jedina elektroforetska tehnika koja se može primijeniti za razdvajanje ne samo nabijenih, već i neutralnih analita.

Odjeljivanje neutralnih molekula MEKC-om postiže se dodatkom površinski aktivnih tvari (surfaktanata) u radni pufer. Pri koncentracijama surfaktanta iznad kritične micelarne koncentracije formiraju se nakupine molekula surfaktanta, koje nazivamo micle. Micle imaju sferičan oblik, njihovi hidrofobni repovi okrenuti su prema središtu da bi izbjegli kontakt s hidrofilnim puferom, a polarne glave su na površini u kontaktu s puferom.

Neutralne spojeve je moguće razdvojiti MEKC-om zahvaljujući njihovoj različitoj interakciji s micelama. Micle najčešće imaju određen naboj, jer su molekule surfaktanta koje ih tvore, u najvećem broju slučajeva, nabijene. Stoga micle putuju u istom ili suprotnom smjeru u odnosu na EOF, ovisno o njihovom naboju. Micle anionskih surfaktanata, poput natrijevog dodecil sulfata (SDS), putuju prema anodi, odnosno u suprotnom smjeru od elektroosmotskog toka. Budući da je elektroosmotski tok pri neutralnom ili bazičnom pH brži od brzine putovanja micela, ukupno kretanje će biti usmjereno u smjeru anode. Za vrijeme migracije, micle mogu ulaziti u interakcije s analitima putem hidrofobnih i elektrostatskih interakcija, kao u kromatografiji pa kažemo da one tvore pseudo-stacionarnu fazu.

Brzina kretanja nabijenih čestica ovisi o koeficijentu distribucije između micle i vodene otopine, te o elektroforetskoj pokretljivosti bez micle, dok brzina kretanja neutralnog analita ovisi samo o njegovom koeficijentu distribucije između micle i vodene otopine. Što analit u većoj mjeri ulazi u interakcije s micelom, dulje je njegovo vrijeme zadržavanja, s obzirom da ga micela vuče u smjeru suprotnom od EOF-a. Analit koji ne ulazi u interakciju s micelom nošen je elektroosmotskim tokom. Što su analiti hidrofobniji, to jače ulaze u interakcije s micelom, pa se i duže zadržavaju u kapilari.

Kapilarna gel elektroforeza (CGE)

To je tradicionalna gel elektroforeza unutar kapilare. Otopina polimera stvara gel koji djeluje kao molekularno sito, razdvajajući analite na temelju njihove veličine. Najčešće korišteni gelovi su linearno povezani (poliakrilamid ili metilceluloza), kovalentno unakrsno povezani (bis-poliakrilamid) ili gelovi vezani vodikovim vezama (agaroza).

Tehnika se prvenstveno rabi za analize DNA i RNA, peptida i proteina. Iznimno je važna za karakterizaciju rekombinantnih proteina prilikom njihove proizvodnje te u stabilitetnim studijama (6).

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF) je gel elektroforetska tehnika s visokim razlučivanjem koja se upotrebljava za razdvajanje peptida i proteina na osnovi njihovih izoelektričnih točki. U odnosu na uobičajeno gel izoelektrično fokusiranje, CIEF je brži i jednostavniji za primjenu. Primjenom amfolita unutar kapilare se postiže pH gradijent. Amfoliti su molekule koje sadrže i kisele i bazične dijelove (zwitterioni) i nakon što se kapilara napuni mješavinom analita i amfolita, formira se pH gradijent. Bazična otopina nalazi se na katodi, a kiselina otopina na anodi, pa primjenom električnog polja nabijeni amfoliti i proteini putuju kroz medij dok ne dosegnu područje u kojem gube svoj naboj

(pri njihovom pI) i zaustavljaju se. Ovaj proces je poznat kao izoelektrično fokusiranje. Završetak tog procesa može se prepoznati po tome što struja više ne teče kada je postignuto stabilno stanje. Nakon fokusiranja, odijeljene uske vrpce analita pokreću se prema detektoru primjenom tlaka ili dodatkom soli.

CIEF može razdvojiti proteine koji se u izoelektričnoj točki razlikuju za svega 0,004, dok se u kapilari od 65 cm uspješno može razdvojiti čak oko 1000 analita (7).

Kapilarna izotahoforeza (CITP)

Kod kapilarne izotahoforeze (CITP) rabe se dvije elektrolitske tekućine različite pokretljivosti. Vodeća elektrolitska tekućina ima veću pokretljivost nego ioni analita, dok zadnja ima manju pokretljivost od iona analita. Primjenom električnog polja nastaju odijeljene zone analita između vodećeg i terminalnog elektrolita.

Svi analiti u odijeljenim zonama putuju istom brzinom, koja je definirana brzinom vodećeg elektrolita. Da bi se održala ravnotežna brzina, unutar svake zone mijenja se električno polje. Električno polje je stoga najslabije u zoni s najvećom elektroforetskom pokretljivošću. Ovaj fenomen održava vrlo oštre granice među zonama.

Kapilarna izotahoforeza je standardna metoda u analizi seruma, plazme, urina i cerebrospinalne tekućine, a kombinira se i s drugim tehnikama za ukoncentriravanje uzorka (5).

Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)

To je tehnika kapilarne elektroforeze u kojoj se u otopinu elektrolita dodao kiralni selektor (5). Kao kiralni selektori rabe se ciklodekstrini, krunski eteri, žučne soli, kompleksi bakar(II)-aspartata, itd. Odjeljivanja kiralnih spojeva se danas obično provode tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ili plinskom kromatografijom. Te analize mogu biti složene i zahtjevne glede optimizacije. Uz to koriste i kiralne stacionarne faze koje su uglavnom skupe. U usporedbi s kiralnom kromatografijom koja koristi čitav niz kiralnih faza za mijenjanje selektivnosti, kod kapilarne elektroforeze visoka učinkovitost postiže se primjenom relativno malog broja kiralnih selektora.

Selektivnost se može podesiti uporabom odgovarajuće vrste i koncentracije kiralnog selektora, a također i dodatkom modifikatora kao što su alkoholi, površinski aktivne tvari, urea i metalni ioni.

Kiralna kapilarna elektroforeza uspješno se rabi za razdvajanje i analizu aminokiselina i kiralnih lijekova.

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)

MEEKC je kapilarno elektroforetska tehnika u kojoj dolazi do razdvajanja analita između dviju faza emulzije – vodene i uljne (8). Mikroemulzija se može sastojati od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi ili kapljica ulja u vodenoj fazi. Osim vode i organskog otapala (najčešće heptan ili oktan), u otopinu se dodaje surfaktant (najčešće SDS) i kosurfaktant u svrhu stabilizacije emulzije. Odabirom otapala i mijenjanjem koncentracije surfaktanata i organskih otapala postiže se odgovarajuće razdvajanje između analita.

MEEKC se prvenstveno rabi u analizi lijekova, teško topljivih ili netopljivih u vodi.

Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)

NACE je kapilarno elektroforetska tehnika koja koristi samo organska otapala (9). Viskoznost i dielektrična konstanta otapala utječu izravno na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita pa se odabirom odgovarajućih organskih otapala u određenim udjelima postiže razdvajanje. Tehnika je svakako odgovarajući izbor kod lijekova netopljivih u vodi, a pruža i dodatnu selektivnost pri razvoju metode.

Kapilarna elektrokromatografija (CEC)

Kapilarna elektrokromatografija je nova vrsta kapilarne elektroforeze, koja se odlikuje vrlo visokom učinkovitošću, a objedinjuje kapilarnu elektroforezu i klasičnu kromatografiju. Naime, u kapilarnoj elektrokromatografiji kapilara je ispunjena kromatografskom stacionarnom fazom. Do razdvajanja analita dolazi zbog različite elektroforetske pokretljivosti i na temelju razlike u koeficijentu razdijeljena između mobilne i stacionarne faze. Kapilara se puni *in situ* polimerizacijom (primjerice hidrolizom tetrametoksi silana) ili silanizacijom, ali postoje i komercijalno dostupne punjene kapilare (4).

PRIMJENA KAPILARNE ELEKTROFOREZE U FARMACEUTSKOJ ANALITICI

Kapilarna elektroforeza ima široku primjenu u farmaciji. Zahvaljujući različitim vrstama tehnike moguće je analizirati sve vrste analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula, do velikih biomakromolekula, poput DNA i proteina. Osim u uvodu spomenutih prednosti, kapilarna elektroforeza ne zahtjeva znatniju predobradu uzoraka. Rabi se u analizi lijekovitih oblika, tableta, kapsula, krema, injekcijskih otopina, ali i složenih uzoraka poput bioloških tekućina i tkiva, otpadnih voda, stočne hrane i biljnih materijala, a samo neki primjeri odabrani su u tablici 2.

U analitici lijekova kapilarna elektroforeza primjenjuje se prvenstveno kao brza i jednostavna metoda za točno i precizno određivanje sadržaja lijeka u svim vrstama lijekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja rabi se za određivanje profila čistoće lijekova. Uspješno se primjenjuje u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (urin, plazma, serum, likvor) i tkivima. Najveću prednost kapilarna elektroforeza pokazuje u analizi peptidnih lijekova i proteina. Zahvaljujući jednostavnoj primjeni kiralnih selektora, to je selektivna i djelotvorna tehnika u odjeljivanju enantiomera i određivanju enantiomerne čistoće. Primjenom afinitetne kapilarne elektroforeze, moguće je proučavati biomolekularne interakcije i odrediti stupanj vezanja lijeka za proteine plazme, što je važno u farmakokinetici i bioraspoloživosti lijeka.

Najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza i micelarna elektrokinetička kromatografija. Kapilarna zonska elektroforeza koristi se za određivanje djelatne tvari u lijekovitom obliku (26), za provjeru čistoće (30), određivanje onečišćenja (13), farmakokinetičke studije (31), identifikaciju i određivanje metabolita lijekova u biološkim uzorcima (32) i drugo. Često se primjenjuje za analizu peptida i proteina. Značajan uspjeh postignut je upravo u peptidnom mapiranju. Tehnika je također primjenjena i za razdvajanje anorganskih iona i organskih kiselina, za što se tradicionalno koristila ionska kromatografija.

Tablica 2. Primjena kapilarne elektroforeze u analitici lijekova

Ljekovita tvar	Uzorak	Tehnika	LOD	Ref.
Alendronat	urin	CITP	4,1 μM	10
Angiotenzin II	standard	CIEF	0,22 μM	11
Antisense oligonukleotidi	plazma	CGE	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12
Atorvastatin	ljekoviti oblik	MEKC	18,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$	13
Citalopram	ljekoviti oblik, serum	CITP	5,73 μM	14
Diazepam, oxazepam	kosa	CZE	5,3 μM , 1,3 μM	15
Flumetazon	urin	CZE	2,7 ng/mL	16
Ibuprofen	serum	CCE	0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$	17
Ketokonazol	ljekoviti oblik	CCE	0,25 mg/L	18
Ketoprofen	ljekoviti oblik	CCE	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	19
Ibuprofen	serum	CITP	0,008 mmol/L	20
Naproxen	ljekoviti oblik	MEEKC	0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	21
Omeprazol	plazma	MEKC	3,6 ng/mL	22
Oseltamivir	ljekoviti oblik	CZE	0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$	23
Paracetamol	ljekoviti oblik, urin	CZE	$5,6 \times 10^{-10} \text{M}$	24
Pravastatin	ljekoviti oblik	CZE	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25
Pseudoefedrin	ljekoviti oblik	NACE	11,0 $\mu\text{g}/\text{L}$	26
Rosuvastatin	ljekoviti oblik	MEKC	0,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$	27
Terbutalin	ljekoviti oblik, urin	CZE	$3,0 \times 10^{-8} \text{M}$	28
Venlafaxin	plazma	CEC	0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$	29

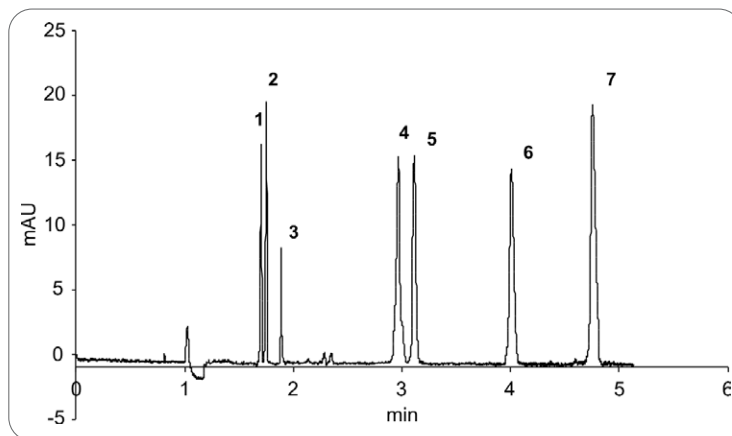
Micelarna elektrokromatografija se upotrebljava za analizu nabijenih i nenabijenih analita i za široki raspon tvari s hidrofilnim ili hidrofobnim karakteristikama (aminokiseline, nukleotidi, vitamini, veliki broj lijekova, aromatski ugljikovodici, eksplozivne tvari...). U farmaciji se MEKC uspješno rabi za određivanje aktivnih tvari i onečišćenja u tabletama (13, 26), kremama i injekcijskim formulacijama (33). Primjenjuje se za određivanje lijeka (vrlo često hidrofobnog) i njegovih polarnih metabolita u biološkim uzorcima (34) te za stabilitetne studije (35).

Kapilarna elektroforeza primjenjuje se u biotehnologiji, gdje je zamijenila tradicionalnu elektroforezu u gelu za analizu DNA, RNA, proteina i ugljikohidrata. U analizi biomakromolekula rabi se najčešće kapilarna gel elektroforeza. Obzirom na specifičnost analita, koristi se osim u farmaciji i u molekularnoj biologiji, genetici, biokemiji, mikrobiologiji, virologiji, forenzici. Primjenjuje se za određivanje slijeda nukleotida, utvrđivanje mutacija, u proizvodnji antisense oligonukleotida i analizi dijagnostičkih i terapijskih DNA molekula (36).

Analiza statina u ljekovitim oblicima micelarnom elektrokromatografskom kromatografijom

Statini su danas jedni od najpropisivanijih lijekova u razvijenim zemljama svijeta, a njihova upotreba u terapiji hiperlipidemije i prevenciji kardiovaskularnih bolesti je u

stalnom porastu. Stoga, postoji stalna potreba za razvojem novih analitičkih metoda za njihovo određivanje. U Europskoj farmakopeji još uvijek ne postoje monografije za atorvastatin, fluvastatin i rosuvastatin, a skoro sve postojeće metode u literaturi temelje se na HPLC tehnici. Razvijena je nova metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije za simultanu analizu lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina i rosuvastatina u ljekovitim oblicima. Razvijena metoda upotrebom iznimno alkalnog medija (25 mM boratni pufer pH 9.5) omogućila je analizu svih šest statina u vrlo kratkom vremenu (5 minuta). Iako su svi statini bili u ioniziranom obliku hidroksi kiselina, dodatak 25 mM SDS-a i metanola (10% v/v) kao organskog modifikatora, omogućili su povećanje selektivnosti i dobro razlučivanje. Metoda je validirana i zatim uspješno primijenjena na komercijalno dostupnim ljekovitim oblicima. Predložena metoda je jednostavna, brza, jeftina i univerzalna analiza bilo kojeg od šest statina registriranih u Republici Hrvatskoj.



Slika 3. Elektroferogram simultane analize statina: (1) ketoprofen (unutarnji standard), (2) rosuvastatin, (3) pravastatin, (4) atorvastatin, (5) fluvastatin, (6) lovastatin i (7) simvastatin. Uvjeti analize: 25 mM boratni pufer pH 9,5, 25 mM SDS, 10 % (v/v) metanola, napon 23 kV, 30 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 30 mbar, 4 s.

Određivanje pravastatina kapilarnom zonskom elektroforezom

Razvijena je i validirana metoda kapilarne zonske elektroforeze za analizu pravastatina. U alkalnom mediju (boratni pufer pH = 9,3) i upotrebom jakog električnog polja (30 kV) razvija se snažni elektroosmotski tok koji omogućuje određivanje pravastatina unutar 2,5 min. Metoda je primijenjena na ljekovitom obliku, te je određen sadržaj djelatne tvari uz visoku preciznost, točnost i selektivnost. Metoda predstavlja uspješnu alternativu postojećim, uglavnom, HPLC metodama. Prednost je posebice u iznimno kratkom vremenu analize (vrijeme analize farmakopejskom HPLC metodom je približno 21 min), kao i malim količinama otapala i uzorka te jednostavnosti metode (25).

Određivanje onečišćenja atorvastatina micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom

Terapija atorvastatinom je svakodnevna i dugotrajna, stoga je čistoća lijeka vrlo važna. Kontrola kakvoće, određivanje sadržaja te identifikacija i određivanje onečišćenja su važan dio farmaceutske analize.

Razvijena je metoda koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i određivanje atorvastatina i četiri njegova onečišćenja: diastereomera atorvastatina, desfluoro atorvastatina, metilnog estera atorvastatin i atorvastatin laktone. Budući da su metilni ester atorvastatina i atorvastatin laktone neutralni analiti, upotreba micelarne elektrokinetičke kromatografije bila je nužna. Natrijev dodecil sulfat (SDS) odabran je kao anionski surfaktant. Najbolji oblici pikova uz kratko vrijeme razdvajanja dobiveni su u 10 mM boratnom puferu pH 9.5 sa 50 mM SDS-a. Da bi se postiglo odgovarajuće razdvajanje u otopinu pufera dodan je i organski modifikator, 20% (v/v) metanol. Upotrebom tzv. »bubble cell« kapilare, koja na mjestu detektora ima tri puta veći optički put, povećana je osjetljivost metode, što je iznimno važno kod određivanja onečišćenja koja se u uzorku nalaze u malim količinama (<0,1% djelatne tvari).

Metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama (International conference on harmonization) te je pokazano da je metoda selektivna, precizna i točna. Metoda je primijenjena na dvama ljekovitim oblicima različitih proizvođača, a pronađeni su diastereomer atorvastatina kao glavno onečišćenje (0,1%) i desfluoro atorvastatin (<0,1%) (13).

Određivanje sadržaja antivirusika oseltamivira u Tamiflu kapsulama

Razvijena je CZE metoda za određivanje sadržaja oseltamivira u kapsulama komercijalno dostupnima na tržištu. Injektiranjem uzorka na detektorskom kraju, duljina kapilare je svega 10 cm, i primjenom negativnog napona (-15 kV), omogućena je vrlo brza analiza (1,5 minuta). Korišten je 50 mM fosfatni pufer, pH 6,3 pri temperaturi 25 °C. Metoda je validirana s obzirom na specifičnost, linearnost, preciznost i točnost. Dobiveni rezultati se u potpunosti slažu s onima dobivenim postojećim HPLC metodama, ali metoda kapilarne elektroforeze je mnogo brža, jeftinija i ekološki prihvatljiva, budući da se uopće ne rabe organska otapala (23).

Analiza humanog eritropoetina kapilarnim izoelektričnim fokusiranjem

Eritropoetin je hematopoetski čimbenik rasta koji regulira eritrocitopoezu stimulirajući proliferaciju i diferencijaciju nezrelih stanica eritrocita. Primjenjuje se prvenstveno u terapiji anemije, ali se nažalost i zloupotrebljava kao doping sredstvo kod sportaša.

Humani eritropoetin je glikoproteinski hormon koji se sintetizira u bubrezima. Rekombinantni humani eritropoetin dobiva se rekombinantnom tehnologijom iz stanica jajnika kineskog hrčka. S obzirom na vrstu stanica domaćina u kojima nastaje, eritropoetin se razlikuje u glikozilaciji. Profiliranje različitih glikoziliranih formi omogućuje kontrolu kvalitete u farmaceutskoj industriji ili pak anti doping kontrolu u sportu.

Službena farmakopejska metoda za analizu eritropoetina je kapilarna zonska elektroforeza. Razvijena je metoda kapilarnog izoelektričnog fokusiranja koja u iznimno kratkom vremenu daje dobro razlučivanje, uz visoku ponovljivost. Uspješno razdvajanje smjese različitih glikoziliranih oblika postignuto je unutar svega šest minuta (37).

Određivanje farmakokinetike i bioraspoloživosti (+)-S-enantiomera ketoprofena kiralnom kapilarnom elektroforezom

Iako ketoprofen na tržište dolazi kao racemat, terapijsko djelovanje ima isključivo (+)-S-enantiomera. Razvijena je metoda kiralne kapilarne elektroforeze za razdvajanje te određivanje sadržaja oba enantiomera. Dodatkom heptakis-2,3,6-tri-O-metil β ciklo-dekstrina (TM β CD) u visokoj koncentraciji (50 mM) u otopinu elektrolita, postignuto je razdvajanje između dva enantiomera te je metoda optimirana i validirana. Zdravim dobrovoljcima vađena je krv u odgovarajućim vremenskim intervalima nakon oralne primjene lijeka. Određivanjem (+)-S i (-)-R-enantiomera određeni su farmakokinetički parametri ketoprofena. Potvrđena je bioinverzija inaktivnog (-)-R-enantiomera u aktivnu (+)-S formu. Brzina i doseg te bioinverzije je različita, a o tome ovisi bioraspoloživost ketoprofena.

Metoda je primjenjiva i na ibuprofen, flurbiprofen, indobufen i druge derivate 2-aril-propionske kiseline (38).

Određivanje fenolnih kiselina u biljnim uzorcima *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Vrlo često nositelji farmakološke aktivnosti u biljnim uzorcima su fenolne kiseline, sekundarni biljni metaboliti. Stoga se vrlo često upravo analiza fenolnih kiselina primjenjuje za identifikaciju i određivanje kvalitete biljnih proizvoda. Postoji niz metoda za analizu ovih složenih uzoraka, većinom HPLC metoda. Međutim, razvijena je metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije za razdvajanje i određivanje deset fenolnih kiselina u uzorcima biljne vrste *Echinacea purpurea*. Predobrada uzorka je vrlo jednostavna i brza. Uporabljen je 40 mM boratni pufer pH 9,2 i 70 mM natrijev deoksikolat kao biosurfaktant omogućujući bolju selektivnost i razdvajanje nego uobičajeno upotrijebljen natrijev dodecil sulfat. Nakon optimizacije, metoda je validirana, te primjenjena na ekstraktu korijena biljne vrste *Echinacea purpurea* i komercijalno dostupnim tabletama (39).

Capillary electrophoresis in pharmacy

by M. Damić, B. Nigović

A b s t r a c t

Capillary electrophoresis is a new separation technique. It is an analytical technique that usually complements or replaces high performance liquid chromatography. Basic principle of the technique is the migration of charged species under applied electric field towards one of the electrodes through a narrow capillary filled with electrolyte solution. Main advantages over other chromatographic methods are short analysis time, high efficiency, small sample and solvent volumes, low costs, simplicity and ecological acceptability. Capillary electrophoresis has several modes of separation which allows analysis of different types of analytes.

Capillary electrophoresis has found its application in the drug analysis of large molecules like proteins, peptides and nucleic acids, small organic molecules such as drugs, hormones, plant metabolites, food product ingredients, small inorganic ions etc. It is a

method of choice when rapid results are needed. Capillary electrophoresis has become the predominant technique for the analysis of both basic and chiral pharmaceuticals, it is unavoidable in biotechnology and promises to be a valuable tool in troubleshooting in proteome-wide analysis, DNA sequencing and genotyping.

Despite of all advantages and application possibilities, capillary electrophoresis is still not enough explored and used in routine analysis.

A review of different capillary electrophoresis techniques principles and applications in pharmacy is presented in this article.

Literatura – References

1. D. N. Heiger, M. Herold, R. Grimm, Applications of the HP^{3D} Capillary Electrophoresis System, Hewlett-Packard Cp., Waldbronn 1994.
2. European Pharmacopoeia 5th ed., Council of Europe, Strasbourg 2004.
3. European Pharmacopoeia 5th ed., Council of Europe, Strasbourg 2007.
4. D. G. Watson, Pharmaceutical Analysis, Elsevier Limited, 2005.
5. H. Shintani, J. Polonsky, Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic and Professional, London 1997.
6. Z. Xu, T. Esumi, N. Ikuta, T. Hirokawa, J. Chromatogr. A **17** (2009) 3602–3605.
7. <http://www.targetdiscovery.com>, datum pristupa: 24.01.2010.
8. M. Broderick, S. Donegan, J. Power, K. Altria, J. Pharm. Biomed. Anal. **37** (2005) 877–884.
9. J. Tjornelund, S. H. Hansen, J. Biochem. Biophys. Methods **38** (1999) 139–153.
10. D. Bexheti, E. I. Anderson, A. J. Hutt, M. Hanna-Brown, J. Chromatogr. A **1130** (2006) 137–144.
11. Y. Kuroda, H. Yukinaga, M. Kitano, T. Noguchi, M. Nemati, A. Shibukawa, T. Nakagawa, K. Matsuzaki, J. Pharm. Biomed. Anal. **37** (2005) 423–428.
12. A. K. Palm, G. Marko-Varga, J. Pharm. Biomed. Anal. **35** (2004) 415–423.
13. B. Nigović, M. Damić, R. Injac, N. Kočevar-Glavač, B. Štrukelj, Chromatographia **69** (2009) 1299–1305.
14. E. Satina, Ü Dilek Uysal, N. Göger, M. Tuncel, Chromatographia **64** (2006) 317–320.
15. S. McClean, E. O'Kane, J. Hillis, W. F. Smyth, J. Chromatogr. A, **838** (1999) 273–291.
16. C. Felli, G. Carrea, M. Chiari, M. De Amici, C. De Micheli, J. Chromatogr. A **741** (1996) 287–294.
17. P. T. Thanh Ha, J. Hoogmartens, A. V. Schepdael, J. Pharm. Biomed. Anal. **41** (2006) 1–11.
18. M. Castro-Puyana, A. L. Crego, M. Luisa Marina, Electrophoresis **26** (2005) 3960–3968.
19. M. Blanco, J. M. Gonzales, E. Torras, I. Valverde, Anal Bioanal Chem **375** (2003) 157–163.

20. A. Hercegova, J. Sadecka, J. Polonsky, *Electrophoresis* **21** (2000) 2842–2847.
21. P. E. Mahuzie, B. J. Clark, A. J. Crumpton, K. D. Altria, *J. Sep. Sci.* **24** (2001) 784–788.
22. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, R. Galera, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006) 100–106.
23. E. Laborde-Kummer, K. Gaudin, J. Joseph-Charles, R. Gheyouche, H. Boudis, J. P. Dubost, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 544–546.
24. S. Zhao, W. Bai, H. Yuan, D. Xiao, *Analytica Chimica Acta* **559** (2006) 195–199.
25. B. Nigović, I. Vegar, *Croatica Chemica acta* **81** (2008) 615–622.
26. Y. Dong, Y. Chen, X. Chen, Z. Hu, *Biomed. Chromatogr.* **20** (2006) 1150–1156.
27. M. Damić, B. Nigović, *Chromatographia* (2010), u tisku, DOI: 10.1365/s10337-009-1432-1.
28. S. Li, J. Wang, S. Zhao, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 155–158.
29. S. Fanali, S. Rudaz, J. L. Veuthey, C. Desiderio, *J. Chromatogr. A* **919** (2001) 195–203.
30. M. A. Firestone, J. P. Michaud, R. H. Carter, W. Thormann, *J. Chromatogr. A* **407** (1987) 363–368.
31. F. K. Glowka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002) 1035–1045.
32. J. A. Prieto, U. Akesolo, R. M. Jimenez, R. M. Alonso, *J. Chromatogr. A* **916** (2001) 279–288.
33. K. D. Kuhn, C. Weber, S. Kreis, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **348** (2008) 612–618.
34. J. Rodríguez Flores, A.M. Contento Salcedo, M.J. Villaseñor Llerena, L. Muñoz Fernández, *J. Chromatogr. A* **1185** (2008) 281–290.
35. K. R. Sedo, C. W. Demarest, M. Liu, P. B. Wright, *J. Chromatogr. A* **988** (2003) 297–307.
36. <http://www.beckmancoulter.com>, datum pristupa: 24.01.2010.
37. P. Dou, Z. Liu, J. He, J. J. Xu, H. Y. Chen, *J. Chromatogr. A* **1190** (2008) 372–376.
38. F. K. Glowka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002) 1035–1045.
39. R. Pomponio, R. Gotti, M. Hudaib, V. Cavrini, *J. Chromatogr. A* **945** (2002) 239–247.

Priljeno 29. siječnja 2010.