

RADE INJAC^{1,2}
KATARINA
KARLJKOVIĆ-RAJIĆ³
BORUT ŠTRUKELJ¹

¹Farmaceutski fakultet, Institut
za farmaceutsku biologiju,
Ljubljana

²Medicinski fakultet, Zavod za
farmaciju, Novi Sad

³Farmaceutski fakultet, Institut
za analitičku hemiju, Beograd

PREGLEDNI RAD

543.544/.545:615.2

UPOTREBA MICELARNE ELEKTROKINETIČKE KAPILARNE HROMATOGRAFIJE U RUTINSKOJ ANALIZI RAZLIČITIH UZORAKA*

Micelarna elektrokinetička kapilarna hromatografija (MEKC) postala je najpopularnija kapilarna elektromigraciona metoda. Na osnovu veoma široke upotrebe metode, većina analiza lekova moguća je uz MEKC. Separacija veoma kompleksnih smeša, određivanje lekova u biološkom materijalu, i analize drugih uzoraka, mogu biti veoma uspešno izvedene upotrebom MEKC tehnike. U okviru ovog preglednog rada prikazana je aplikacija tipičnih MEKC metoda. Noviji pristupi u kombinaciji sa čvrsto-faznom ekstrakcijom i visoko-volumskim injektovanjem su takođe opisani. Teorijski i ekološki pristup, kao i prednosti i nedostaci same metode, prikazani su teorijski i kroz praktične primere.

Pojava usmerenog kretanja koloidnih i drugih naelektrisanih čestica u električnom polju jednosmernog napona naziva se elektroforeza. To je elektromigracijska metoda koja pripada grupi osetljivih metoda separacije. Razdvajanje komponenata iz analiziranog uzorka izvodi se na osnovu različitog naelektrisanje čestica, a ako čestice imaju isto naelektrisanje, onda se razdvajanje izvodi na osnovu različite pokretljivosti, koja zavisi od količine naelektrisanja i veličine čestice [1].

Kapilarna elektroforeza (*capillary electrophoresis*, CE) i kapilarna elektrochromatografija (*capillary electrochromatography*, CEC) jesu metode koje se izvode u kapilari koja je ispunjena puferom, unutrašnji promer kapilare je 10–100 μm , a dužina 40–100 cm. Kapilara je između dva rezervoara za pufer u kojima su uronjene platinske elektrode. Uzorak koji se ispituje, unosi se na jednom kraju kapilare. Napon između dve elektrode je pozitivan ili negativan u rasponu od 5 do 30 kV, i održava se tokom razdvajanja. Razdvojeni analiti se detektuju na kraju kapilare pomoću odgovarajućeg detektora, najčešće UV–DAD ili fluorescentni. Kod CE razdvajanje zavisi od brzine kojom analiti u jonskom obliku migriraju pod uticajem električnog polja. Ova metoda može da se primeni isključivo za analizu jona u kapilari sa puferskim medijumom. Za razliku od CE metode, CEC se primenjuje i za jone i za neutralne molekule. Poslednjih deset godina, u najširoj upotrebi je micelarna elektrokinetička kapilarna hromatografija (*micellar electrokinetic capillary chromatography*, MEKC) [2].

*Rad saopšten na skupu "Šesti seminar mladih istraživača", Beograd, 24.–26. decembar 2007.

Adresa autora: Rade Injac, Fakulteta za farmaciju, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

E-mail: injacrade@gmail.com

Rad primljen: Decembar 24, 2007.

Rad prihvaćen: Februar 25, 2008.

MEKC je modifikacija CE koja omogućava razdvajanje kako naelektrisanih tako i nanaelektrisanih čestica. Prvi put je Terabe opisao 1984. godine kao metodu za razdvajanje aromatičnih fenola i nitro jedinjenja male molekulske mase. Ova tehnika uključuje uvođenje površinski aktivnih materija (PAM; surfaktanti), u medijum za razdvajanje i to u koncentraciji pri kojoj se stvaraju micelle [3].

Surfaktant koji se najčešće upotrebljava, sa visokom HLB (hidrofilno–lipofilni balans) vrednošću, je natrijum–lauril sulfat (*sodium dodecyl sulphate*, SDS). PAM–ovi imaju asimetričnu strukturu, i u vodenom rastvoru na određenoj temperaturi i u količini većoj od kritične micelarne koncentracije (*critical micellar concentration*, CMC) grade takozvane sferne agregate, sačinjene od 40–100 jona, sa hidrofobnim krajevima orijentisanim prema unutrašnjosti agregata, a sa polarnim krajevima okrenutim ka vodenoj fazi. Ovak nastale micelle čine drugu fazu medijuma za razdvajanje (prva je vodeni pufer), koja je stabilna i može da inkorporira nepolarna jedinjenja u svoj unutrašnji ugljovodonični deo, odnosno može da solubilizuje nepolarne komponente. Površina jonske micelle ima negativno naelektrisanje, što joj daje značajnu elektroforetsku pokretljivost. S druge strane, većina pufera pokazuje toliko veliku brzinu elektroosmotičkog protoka (*electroosmotic flow*, EOF) prema negativnoj elektrodi da će i anjonke micelle biti nošene prema katodi, ali znatno manjom brzinom. Kada se uzorak u nanolitarskoj količini unese u sistem za MEKC, njegove komponente se raspodele između vodene faze i ugljovodonične faze u unutrašnjosti micelle. Sistem za MEKC je sličan mobilnoj fazi HPLC metode, ali se u MEKC metodi i "stacionarna faza" kreće, samo manjom brzinom od mobilne faze. Kako će se analit iz uzorka raspodeliti između vodene i micelarne faze, zavisi od distribucionog koeficijenta. Ovaj mehanizam je veoma sličan HPLC metodi [1–3].

Pored SDS kao najčešće korišćenog surfaktanta, u upotrebi su i žučne soli, natrijum–holat, Brij–35,

PAPS (*polyfluoroalkyl phosphate surfactant*), CTAB (*cetyltrimethylammoniumbromide*), polisorbati (*Tween 80*) i tako dalje [3].

CE je savremena metoda za analizu različitih uzoraka, a posebno mesto zauzima u analizi farmaceutskih proizvoda. Evropska [4] i američka [5] farmakopeja sadrže opšta poglavlja za CE, dok najnovija britanska [6] farmakopeja po prvi put uvodi MEKC metodu kao oficinalnu za identifikaciju eritropoetina i levokabastin hidrohlorida. Pored zakonskih i regulatornih podataka kako o MEKC-u tako i o drugim metodama za rutinsku analizu poznatih i novih materijala, odnosno uzoraka, veliki je broj preglednih radova u toku nekoliko poslednjih godina koji daju vrlo značajne informacije za budućnost MEKC-a. Dosađanja istraživanja su pokazala da je MEKC metoda veoma uspešno primenjivana za analizu pesticida, lekova, herbicida, metabolita, biljnih produkata, jona, teških metala, novih materijala, i to iz različitih medijuma kao što su voda, hrana, farmaceutski preparati, pića, kozmetički preparati, biljni proizvodi, biološki uzorci i drugo [7–11]. U poslednje tri godine inovacije na polju CE analitike postavile su MEKC metodu (sa nekim svojim modifikacijama, kao što su injektovanje pod visokim pritiskom, zatim produženo injektovanje pod radnim pritiskom, i/ili prekoncentrisanje uzoraka metodom ekstrakcije kao što je SPE (*solid-phase extraction*)) u rang LC/MS/MS [12–15].

U višegodišnjoj studiji naše istraživačke grupe, razvijen je veliki broj novih MEKC metoda za analizu različitih uzoraka ili materijala, iz različitih medijuma. Cilj rada je da se pregledno prikažu mogućnosti primene novih metoda u rutinskim analizama, potom prednosti u odnosu na postojeće metode kao i potencijal za razvijanje metoda za karakterizaciju novih materijala različitog porekla.

APARATURA ZA MEKC

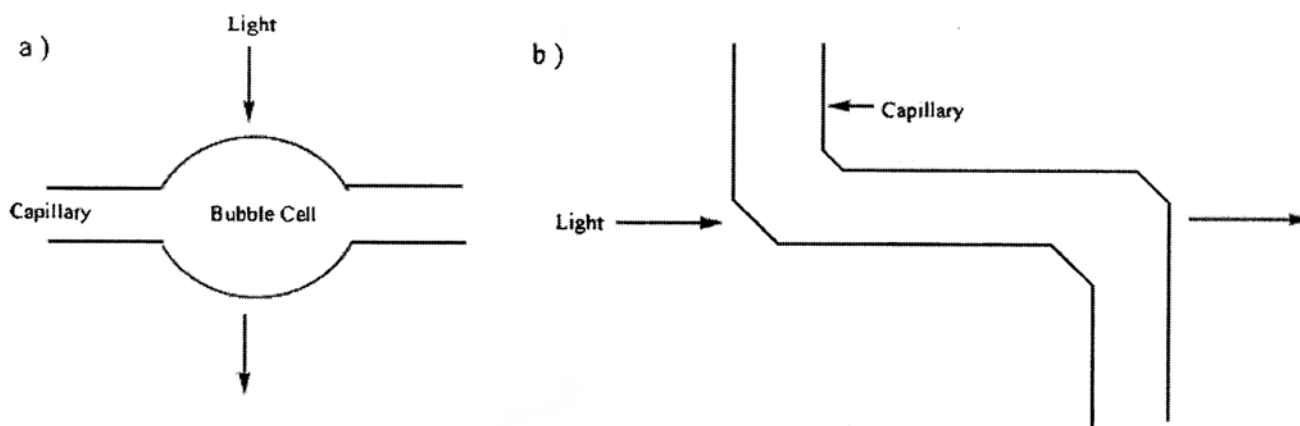
Aparat koji se koristi i za CE i CEC je veoma jednostavan, a sastoji se od izvora visokog napona, dva rezervoara za pufer, dve elektrode, staklene kapilare, injekcionog sistema, detektora, termostatskog sistema i rekordera ili računara. Izvor napona je konstantan tokom analize i može se podesiti do 30 kV. Pored napona i jačina struje je konstantna i u zavisnosti od aparata može biti i do 300 μ A. Pufer koji se koristi za CE analizu, na radnoj pH vrednosti, mora imati odgovarajući kapacitet i takvu pokretljivost, da odgovara pokretljivosti supstanci koje se ispituju. Neki organski rastvarači (metanol, acetonitril, etanol) mogu da se dodaju vodenom rastvoru pufera da bi se povećala rastvorljivost supstanci koje se razdvajaju i/ili da bi se postigao odgovarajući stepen jonizacije komponenata uzoraka. Katoda i anoda su uronjene u dva odvojena rezervoara koji sadrže pufer, propisan za supstance koje se razdvajaju. Rezervoari su povezani sa izvorom visokog napona. Kapilare koje se ko-

riste za analizu metodom CE obično su od stopljenog silikata, sa spoljne strane prevučene poliamidom, unutrašnjeg promera 10–100 μ m. Krajevi kapilare su uronjeni u rezervoare sa puferom tokom analize. Dužina komercijalne kapilare može biti od 23 do 100 cm, ili je pak može analitičar modifikovati sam prema potrebama eksperimenta. Ako je kapilara duža, smanjuje se intenzitet električnog polja, usled čega se povećava migraciono vreme supstanci [1–3].

Injektovanje uzoraka podrazumeva elektromigraciono ili hidrodinamsko injektovanje. Hidrodinamsko injektovanje je uglavnom postupak izbora. Većina CE aparata ima sistem sa primenom pozitivnog pritiska na ulaznom delu kapilare, ili primenom vakuuma na njenom kraju. Injektovanje pod pritiskom vrši se pomoću gasa ili primenom hidrostatskog pritiska (podizanjem ulaznog dela kapilare u odnosu na izlazni deo, naziva se još i gravitaciono injektovanje) [1,2].

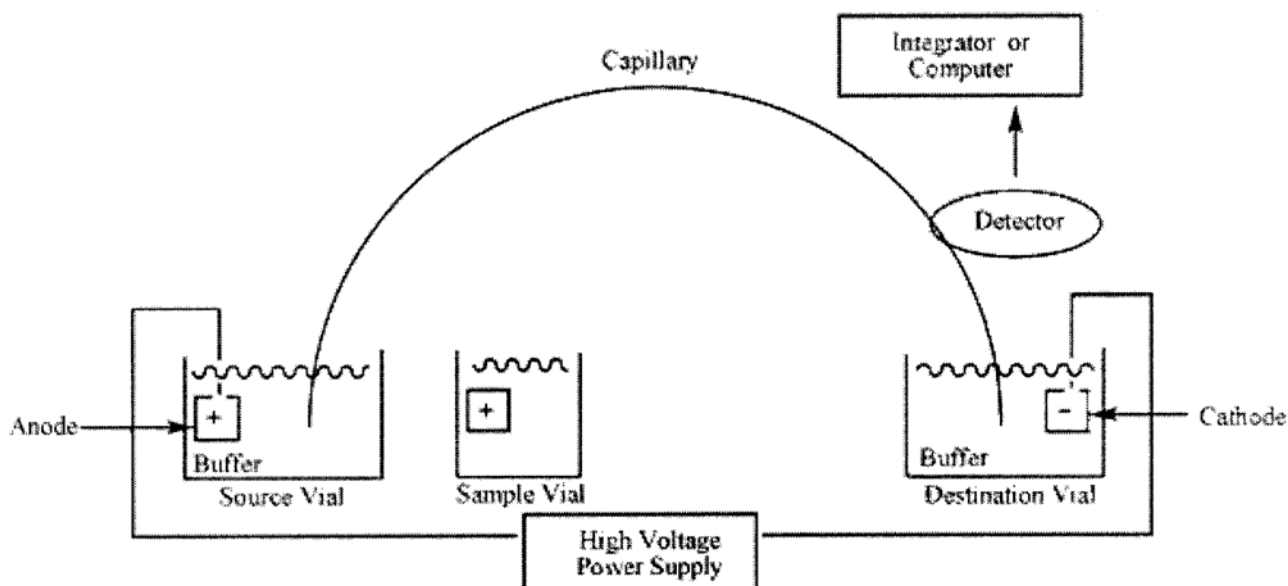
Detektor u CE metodi registruje količinu supstance koja prolazi kroz segment kapilare koji je providan (prozor). Taj deo mora biti postavljen prema optičkom putu da bi se postigla dobra osetljivost. Koriste se spektrometrijski ili elektrohemijski detektori: UV spektrofotometrija, laserski indukovana fluorescencija, "dioda array" (DAD) i masena spektrometrija. Najčešće se koristi DAD detektor zbog svoje velike osetljivosti u spektralnoj analizi u opsegu od 190 do 600 nm, velike brzine i mogućnosti analize čistoće pika jer su moguća preklapanja spektra dva ili više jedinjenja. Apsorpcione metode su najviše zastupljene u praksi. Postoje tri vrste kapilara koje imaju različit izgled i oblik u zavisnosti od mogućnosti puštanja optičkog zraka. Prvi sistem sadrži kapilaru u obliku slova "Z", gde je takav prevoj kapilare da je dužina puta koju svetlost pređe svega 3 mm. Drugi sistem je takav da je na jednom kraju kapilare proširenje u vidu mehura (*bubble cell*). Obično je unutrašnji promer 50 μ m, a u tom proširenom delu je 150 μ m. Ovakvo se dobija trostruko uvećanje puta koji pređe svetlost pri prolasku kroz prošireni deo kapilare (slika 1). Treća metoda za povećanje pređenog puta emitovanog zraka je refleksija. U ovoj kapilari je prisutna srebrna prevlaka sa unutrašnje strane kapilare i to na kraju, i tim sistemom se zrak odbija do dela gde se nalazi detektor [1].

Da bi reproduktivnost metode bila zadovoljavajuća, potrebno je da temperatura kapilare bude konstantna. U suprotnom to bi uticalo na elektroforetsku pokretljivost i migraciono vreme supstanci. Kada se temperatura povećava – migraciono vreme se skraćuje, a samim tim i vreme trajanja analize. Međutim, to povećava rizik da se termolabilna jedinjenja promene. Povećanje temperature može uticati na viskozitet pufera, kao i na gustinu gela kod kapilarne gel elektroforeze. Pri MEKC metodi sa SDS-om u puferu, veoma je bitno da radna temperatura kapilare nije is-



Slika 1. Kapila pri detektoru je proširena dajući (a) "bubble cell" sistem ili (b) "Z cell" sistem.

Figure 1. The capillary tube itself can be expanded at the detection point, creating a (a) "bubble cell" with a longer path length or (b) additional tubing ("Z" cell) can be added at the detection point.



Slika 2. Shema sistema za kapilarnu elektroforezu

Figure 2. Diagram of capillary electrophoresis system

pod 16 °C, jer je to takozvani *Kraft point* za taj PAM. Pri nižim temperaturama SDS daje viskozne koloidne rastvore koji mogu začepiti kapilaru tokom analize [1,3].

U svim eksperimentima naše istraživačke grupe, korišteni su HP^{3D} CE Hewlett Packard ili Agilent 3D-CE sistem i programski paket HP Chem Station (shema aparature je prikazana na slici 2). Uzorci su hidrodinamski injektovani na termostatisane kapilare sa *bubble cell* sistemom, uz DAD detektor i pozitivan radni napon.

MEKC U RUTINSKOJ ANALIZI

Tokom poslednjih par godina, objavljen je veliki broj radova sa novim aplikativnim MEKC metodama

i to prvenstveno za analizu kako novih tako i već poznatih lekova (tabela 1) [16–38]. U daljem tekstu su pregledno prikazani rezultati naše istraživačke grupe kao i specifični primeri za aplikaciju razvijenih metoda [19,21, 31–38].

Analiza hrane za životinje

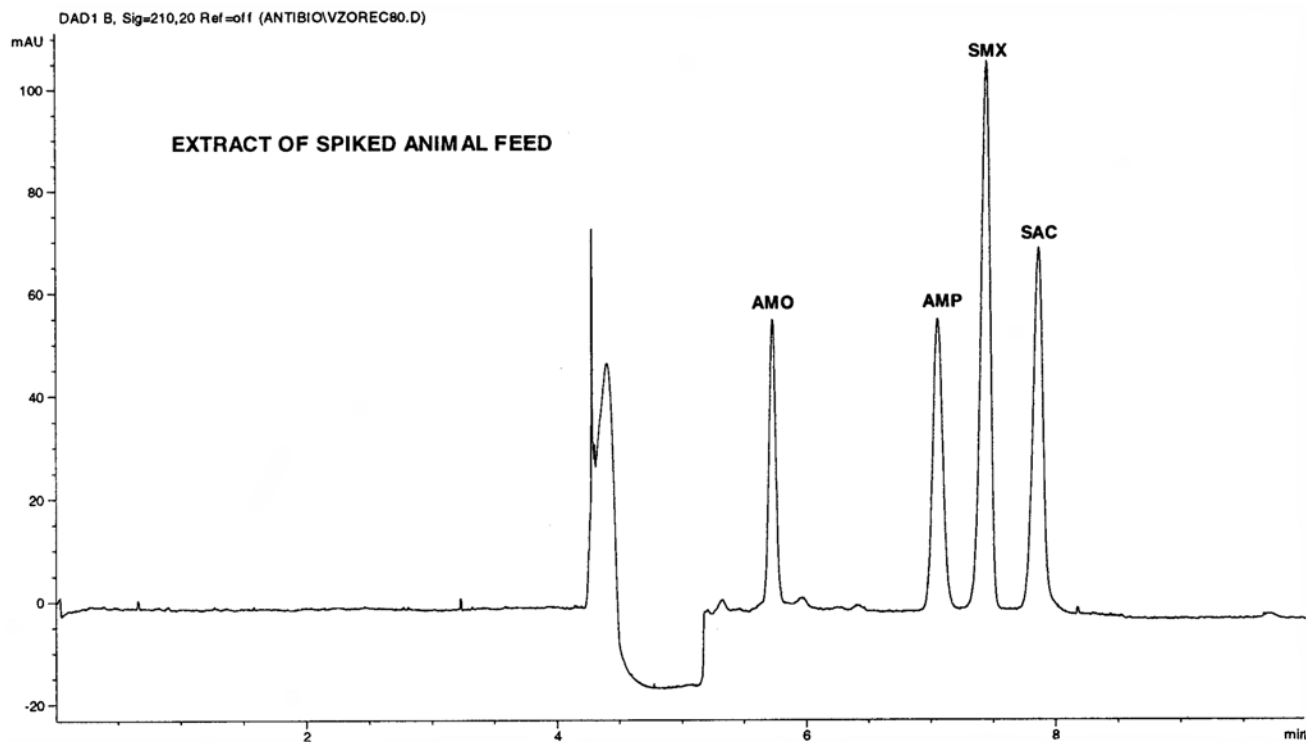
Analiza hrane kako za humanu, tako i za životinjsku upotrebu, poslednjih godina je veoma popularna oblast istraživanja i na nivou regulatornih organa, a i zvaničnih literaturnih baza. S obzirom na to da je sve veća zloupotreba od strane proizvođača na polju proizvodnje i distribucije hrane, a potražnja za zdravom hranom veoma velika, potrebne su brze i efikasne analize za potencijalne aditive u različitim

Tabela 1. Najnovije primene MEKC metode za različite analize
Table 1. Recent applications of MEKC for different analysis

Analiti	Uzorak	Detekcija	Referenca
Celekoksib, meloksikam i rofekoksid	Farmaceutski oblici	UV	[16]
Vitamini rastvorljivi u vodi	Farmaceutski oblici	UV	[17]
Omeprazol, hidroksimeprazol i omeprazol sulfon	Farmaceutski oblici i humana plazma	UV	[18]
Antibiotici	Farmaceutski oblici i hrana za životinje	UV	[19]
β -laktamski antibiotici	Farmaceutski oblici	UV	[20]
Doksiciklin	Farmaceutski oblici i humani urin	UV	[21]
Izoniazid i piridoksin	Farmaceutski oblici	UV	[22]
Paracetamol, kofein, propifenazon	Farmaceutski oblici	UV	[23]
Steroidni hormoni	Humani serum i urin	UV	[24]
Fenetilamin	Humani urin	LIF	[25]
Salbutamol	Sirup	Konduktomertija	[26]
Heroin, amfetamin i njihove nečistoće	Mešavina standarda	UV	[27]
Galijum kompleksi	Mešavina standarda	UV	[28]
Dopa, valin, serin, alanin, cistein	Amino kiseline	UV	[29]
Aspartatna kiselina	Farmaceutski oblici	UV	[30]
Kofein i uobičajeni prateći analiti	Farmaceutski oblici, kozmetika, hrana, piće, prirodni proizvodi	UV	[31]
Doksiciklin	Standard i farmaceutski oblici – termostabilnost	UV	[32]
Cink–bacitracin i nistatin	Hrana za životinje	UV	[33]
Cink–bacitracin, polimiksin B, oksitetraciklin, sulfacetamid	Hrana za životinje	UV	[34]
Sulfametoksazol i trimetoprim	Farmaceutski oblici	UV	[35]
Amoksicilin, ampicilin, sulfametoksazol i sulfacetamid	Hrana za životinje	UV	[36]
Kofein	Pića	UV	[37]
Doksiciklin	Biološke tečnosti	UV	[38]

uzorcima i materijalima. Razvojem novih metoda, kontrolne laboratorije mogu veoma brzo da provere da li je neki proizvod ispravan za upotrebu u prehrani ljudi i domaćih životinja, i ako ima aditive, da li su u granicama dozvoljenog. Od januara 1999. godine, Evropska Unija je postavila nova pravila na području upotrebe aditiva u životinjskoj prehrani, koji kao reziduali u mesu, mleku, jajima, i drugim životinjskim produktima, mogu ugroziti zdravlje ljudi koji iste proizvode konzumiraju. Na osnovu trenda i potrebe društva, naša istraživačka grupa je razvila nekoliko metoda za identifikaciju i kvantifikaciju aditiva koji su najčešće u upotrebi, odnosno antibiotika u hrani za životinje, koji su kao takvi štetni za ljude [19,33,34,36]. Među analiziranim antibioticima su cink–bacitracin, polimiksin B, oksitetraciklin, sulfacetamid, nistatin, amoksicilin, ampicilin i sulfametoksazol. Proizvođači veoma često kombinuju više različitih materijala za dodatke hrani, kako bi dobili sinergistički efekat, i u isto vreme smanjili količine dodataka uz donekle prisutnu kamuflažu. Tipičan primer kombinacije antimikotika, tetraciklina i/ili sulfonamida sa nekim od sinergista (bacitracin, polimiksin) prikazan je u dva naša rada [33,34]. Naime,

razdvajanje i analiza cink–bacitracina i nistatina iz hrane za životinje, MEKC metodom moguća je uz upotrebu 15 mM boratnog i 19 mM fosfatnog pufera koji ima pH vrednost 8,2 i sadrži 20 mM SDS kao surfaktant uz 10% (V/V) metanola kao organskog modifikatora. Metoda je specifična, tačna, ponovljiva i linearna pod optimalnim uslovima uz radni napon od 25 kV, pri temperaturi kapilare od 25 °C, i uz dodatni radni nadpritisak od 5 mbara [33]. Pored pomenute metode koja je za uzorak imala binarnu smešu aditiva, mnogo zahtevnija je analiza kvaternerne smeše cink–bacitracina, oksitetraciklina, polimiksina B i sulfacetamida. Optimizacija metode je obuhvatala promenu pH radnog pufera (6–11), zatim sastav pufera (borat i fosfat), koncentracija pufera (10–60 mM), koncentraciju SDS-a (20–80 mM), kao i tip i količinu organskog modifikatora (metanol i acetoni-tril od 3 do 12%). Pod optimalnim uslovima (20 mM borata, 20 mM fosfata, pH 8,4, 20 mM SDS-a, 10% (V/V) metanola, 25 °C, 25 kV, nadpritisak 10 mbar) metoda je ispunjavala sve validacijske kriterijume za rutinsku analizu četiri antibiotika u hrani za krave, muznice, svinje, kokoške i goveda [34].



Slika 3. 0,1 mg/mL AMO (amoksicilina), AMP (ampicilina), SMX (sulfametoksazola) i SAC (sulfoacetamida) iz uzorka opterećene hrane za životinje pod optimalnim uslovima na 210 nm. Radni elektrolit je 25 mM fosfatnog pufera, pH 8,0, koji sadrži 70 mM SDS-a i 10% (V/V) metanola, dok su temperatura i radni napod 25 °C odnosno 30 kV, uz nadpritisk od 15 mbar.

Figure 3. 0.1 mg/mL of AMO (amoxicillin), AMP (ampicillin), SMX (sulfamethoxazole) and SAC (sulfacetamide) from spiked animal feedstuff, under the optimized conditions, at 210 nm. The BGE (background electrolyte) was 25 mM phosphate buffer, pH 8.0, containing 70 mM SDS and 10% (v/v) methanol, and the temperature and voltage were 25 °C and 30 kV, respectively with applied pressure of 15 mbar.

Pored pomenuta dva rada, veoma je popularna kombinacija sulfonamida sa penicilinima ili cefalosporinima i na slici 3 je tipičan elektroferogram za amoksicilin, ampicilin, sulfametoksazol i sulfacetamid u uzorku hrane [36].

U prethodno opisanim metodama [33,34,36] dodatni radni nadpritisk od 5–15 mbara (maksimalno je moguće do 30 mbara) po prvi put je upotrebljen u MEKC analizi i veoma uspešno dokazan pozitivan uticaj pritiska tokom analize na oblik i simetriju pikova. Pri većim pritiscima 8više od 15 mbara), zapaženo je da dolazi do veoma izraženog šuma bazne linije, što posledično utiče na kvalitet dobijenih rezultata, a i na određivanje limita detekcije i kvantifikacije.

Analiza hrane, pića i prirodnih proizvoda

Kao što je već prethodno napomenuto kod hrane za životinje, danas je veoma mnogo regulativa za kontrolu kvaliteta životnih namirnica i vode. Posebna pažnja je posvećena namirnicama za široku javnu upotrebu kao što su mleko, meso, voda, osvežavajuća pića i hrana za decu. Na osnovu potreba savremenog društva, razvijena je univerzalna metoda za analizu

farmaceutskih i kozmetičkih preparata, kao i hrane, pića i prirodnih proizvoda koji sadrže kofein i prateće komponente kao što su teobromin, teofilin, paracetamol, propifenazon, acetilsalicilna kiselina, salicilna kiselina i kodein-fosfat. Relativna standardna devijacija, za svih tridesetak realnih uzoraka koji su analizirani pod optimalnim uslovima (25 °C, 25 kV, 20 mM fosfatni pufer, pH 9,0, 80 mM SDS, 7,5% (V/V) acetonitril, 210 nm) bila je manja od 2,1% za migraciono vreme i površinu pika, što potvrđuje preciznost i primenljivost metode za rutinsku analizu različitih uzoraka [31]. Realni uzorci koji su analizirani sa tačnošću od 98,9 do 101,2% su: kakao prah, hladan čaj na bazi zelenog čaja, Cockta™, Coca-Cola™, Coca-Cola light™, Red Bull™, Shark™, Pepsi™, čokoladno mleko, čokolada za kuvanje, kafa, bezkofeinska kafa, zeleni, crni, mate čaj i tako dalje.

Iz pomenute metode, razvijena je nova metoda za analizu kofeina u osvežavajućim pićima iz grupe karamelisanih proizvoda i to u cilju da se razvije novi metodološki pristup za definiranje robustnosti MEKC-a, kao i poređenje sa najzastupljenijom analitičkom HPLC metodom, [37].

Ispitivanje standarda i studije stabilnosti

S obzirom na manju osetljivost CE metoda u odnosu na standardne LC (*liquid chromatography*) tehnike, nema mnogo publikacija koje se bave tematikom analize standarda i potencijalnih nečistoća. Problem je da se nečistoće najčešće nalaze u toliko niskom procentu, u okviru standarda čija je čistoća farmakopejski definisana, identifikacija to jest sama detekcija nečistoća je vrlo često ispod granice detekcije (LOD – *limit od detection*). Wen i saradnici [27] i Timerbaev i saradnici [28] u svojim nedavno objavljenim radovima veoma uspešno su razvili MEKC metode za analizu standarda heroina, amfetamina, kompleksa galijuma kao i njihovih nečistoća. Pored pomenutih radova, i naša istraživačka grupa je razvila uporedne HPLC i MEKC metode za analizu doksiciklina u standardu kao i njegovih glavnih nečistoća metaciklina i 6-epidoksiciklina. Obe metode [32] jesu primenjene za analizu stabilnostnih uzoraka koji su podvrgnuti visokim temperaturama. MEKC metoda se pokazala kao veoma dobra alternativa HPLC metodi jer je relativna standardna devijacija za tačnost obe metode manja od 1,5%, što potvrđuje mogućnost primene MEKC-a i za analizu nečistoća samih standarda pod dobro definisanim uslovima [32].

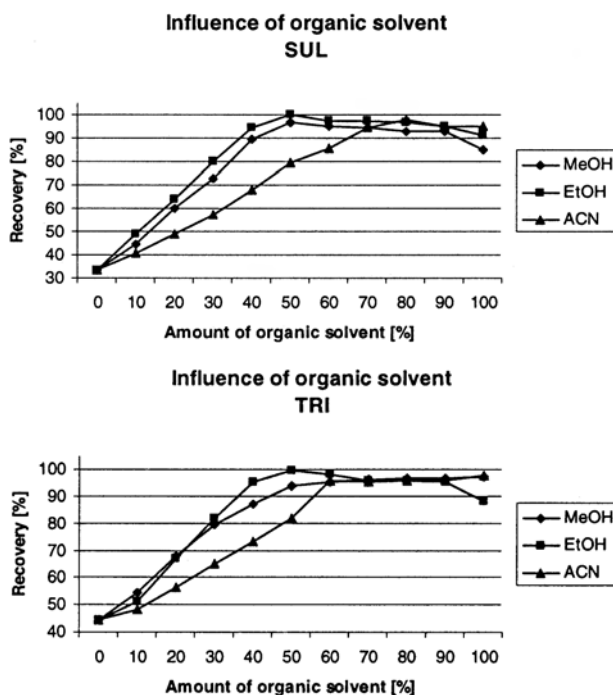
Farmaceutski i kozmetički preparati

Farmaceutska i kozmetička industrija imaju veoma široku paletu proizvoda koji se različito klasifikuju i samim tim moraju ispunjavati određene uslove kako bi bile distribuirane na tržište. Prethodno je bilo govora o novim regulativama za hranu za životinje, potom namirnice za humanu upotrebu, dok je farmaceutska legislativa ili propisi, zapravo deo normalne rutinske, kontrolne i proizvodne procedure već decenijama. Ne samo da je potrebna i validacija samih postupaka kako bi se dobili što tačniji i precizniji rezultati. U farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji analiziraju se, pored gotovih lekova i preparata i sirovine, ambalaža, radne površine, razne mašine i drugo. Industija kao veliki korisnik kontrolnih protokola, zahteva brze, ekonomične i efikasne metode. U tu svrhu je na tržište poslednjih godina zakoračila nova metoda UPLC (*ultra pressure liquid chromatography*) i sa dosta velikim obećanjima skratila standardne HPLC analize sa 20–30 minuta na manje od 2 minuta. Pored vremena, prednost je i sa ekonomske strane, zbog manje potrošnje organskih rastvarača, što je posledično imalo u najavi i smanjenje zagađenja čovekove okoline. Nažalost, pored svih prednosti UPLC metode, jedna veoma bitna stvar se pokazala kao ključna da metoda ne zaživi i postane broj jedan u kontroli lekova, a to je loša robustnost. Koliko god su kolone za hromatografiju bile prilagođene visokom pritisku, isti je vrlo brzo kolone ošteti, što je imalo za posledicu variranje vrednosti za retenciono vreme i površinu pika.

Kao veoma dobra alternativa, koja polako ali sigurno ulazi u regulatorne dokumente, je zapravo MEKC metoda, koja ispunjava sve potrebe korisnika, kao i ekološke standarde, ali nije uvek dovoljno osetljiva i to ograničava njemu primenu. Naravno, i za to postoje rešenja, i o njima će biti reč u nastavku rada.

U okviru naših eksperimenata različiti kozmetički i farmaceutski preparati analizirani su upotrebom direktnog injektovanja uzorka u CE sistem ili pak prethodnom primenom tečne ekstrakcije. Tako je recimo pri analizi BactrimaTM, koji je sulfonamidski antibiotik (sulfoametoksazol i trimetoprim) dokazan i prikazan uticaj same metode ekstrakcije iz čvrstih oralnih i dermalnih preparata na rezultat, odnosno na tačnost metode. Metanol (MeOH), etanol (EtOH) i acetonitril (ACN) su, svaki pojedinačno u različitim odnosima sa destilovanom vodom dali veoma zanimljive rezultate pri analizi oba antibiotika pod optimalnim uslovima za novu MEKC metodu (25°C, 30 kV, nadpritisak 15 mbara, 30 mM boratni pufer pH 9,0, 60 mM SDS-a, 10% (V/V) etanola, 205 nm) [35]. Pri izuzetno niskom procentu organskog rastvarača, tačnost metode je bila daleko ispod prihvatljivog (slika 4), dok je sa visokim sadržajem organske komponente došlo do variranja rezultata i opet pada vrednosti oporavka za tačnost.

Optimalni uslovi ekstrakcije su postavljeni izborom etanola/voda za ekstrakcioni medij u odnosu 1:1 (V/V).



Slika 4. Uticaj organskog rastvarača na tačnost pri ekstrakciji sulfametoksazola (SUL) i trimetoprima (TRI) iz farmaceutskih preparata.

Figure 4. Influence of organic solvent on recovery of SUL (sulfamethoxazole) and TRI (trimethoprim), for extraction from pharmaceuticals.

Pored pomenutog primera, postupak ekstrakcije se pokazao kao izuzetno važan i pri analizi kofeina i pratećih aktivnih principa iz tableta, gelova, kremova i drugih farmaceutsko–kozmetičkih preparata. Posebno je zanimljiv pristup obaranja gel stukture kozmetikog proizvoda za mršavljenje primenom ultrazvuka, povišene temperature i organskog rastvarača [31].

Pored primene metode ekstrakcije za pripremu kao i prekoncentrisanje uzoraka, postoji mogućnost direktnog injektovanja gotovih lekova, kao što je to slučaj sa ampulama BactrimaTM. Izgleda veoma jednostavno, ali takav oblik skriva druge probleme, a to su sami rastvarači koji predstavljaju ekscipijens za tečni preparat sa svim svojim mikrobiološkim i fizičko–hemijskim parametrima vezanim za stabilnost. Zbog toga je moguć problem pH uzorka, sastav rastvarača, kompatibilnost sa komponentama pufera za analizu i tako dalje. Zbog toga je veoma bitno da je matriks samog analiziranog materijala jasno definisana i ponovljiva kako ne bi uticala na samu tačnost, preciznost i robustnost metode. Primer da male promene u radnom medijumu, mogu drastično promeniti tok analize, jeste upravo analiza antibiotika iz preparata BactrimTM (slika 5) [35].

Pomenuti primeri i problemi su samo neki od velikog broja publikovanih radova kako drugih autora, tako i našeg istraživačkog tima [19,21,31,32,35]. Naravno kontrola farmaceutsko–kozmetičkih preparata je veoma bitna, ali je danas za sudsku medicinu, kao i za kliničke i bioekvivalentne studije jednako bitno pored sastava leka, kako ga otkriti i dokazati u biološkim uzorcima, i ne samo aktivne principe, već i

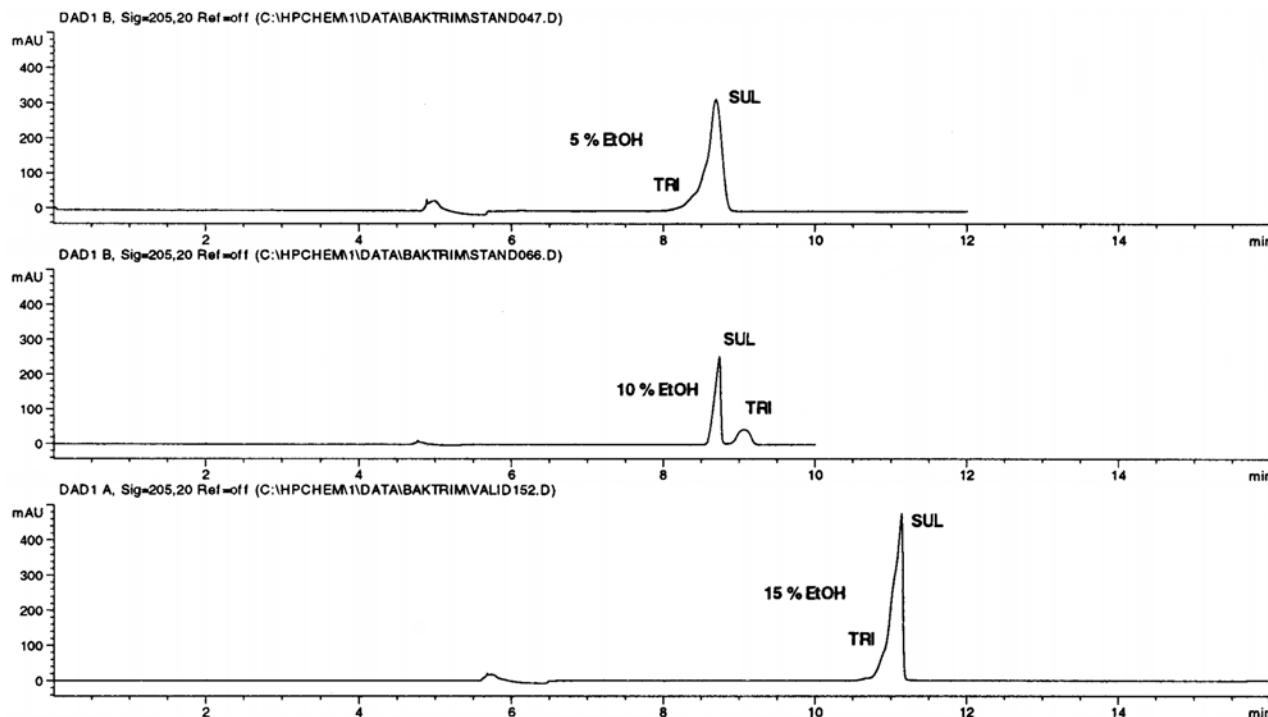
njihove metabolite. Biološki uzorci i MEKC metoda poslednjih godina dobijaju na značaju na osnovu primene raznih modifikovanih i savremenih pristupa MEKC analizi uzoraka dobijenih iz in vivo sistema humanog ili životinjskog porekla.

MEKC metoda i biološki uzorci

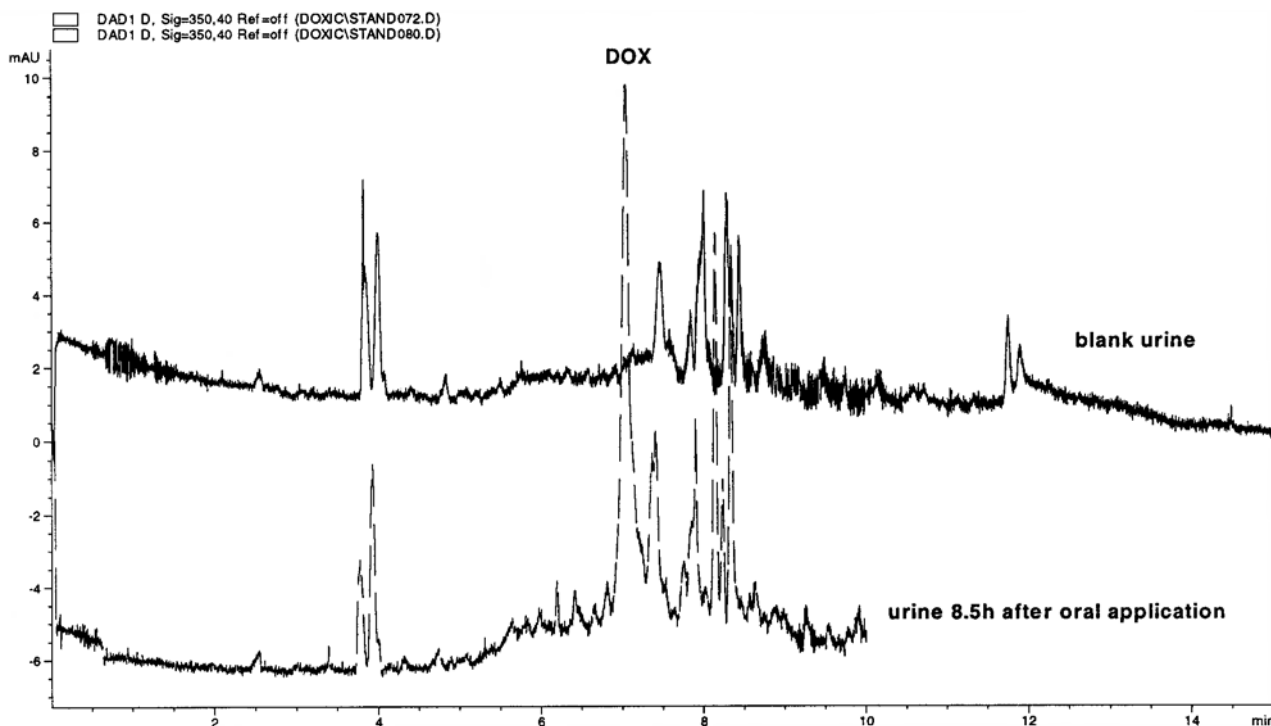
Tehnologija i savremeni tokovi iz oblasti nauke su doveli većinu analitičkih tehnika do vrhunca. Naravno sa svakim novim materijalom i uzorkom, postavlja se novi izazov tehnologiji i analitičarima koji istim procesima vladaju.

Analiza bioloških uzoraka je zapravo vrsta predvidivo – nepredvidivog materijala. Vrlo često se za biološke tečnosti kaže biološki materijal, jer je zapravo to skup trenutnih potencijalnih analita koji se nikada kao takvi u tom obliku, količini, kombinaciji i slično, neće moći naći ni u jednom drugom uzorku, pa čak i kada su uzeti od iste osobe u drugom vremenskom intervalu. Živi sistem postavlja analitiku u vrlo nezgodnu situaciju, a pogotovo metode koje se koriste u kliničkim, forenzičkim i bioekvivalentnim ispitivanjima. U praksi se u te svrhe najviše koristi metoda LC/MS/MS koja je veoma zahtevna i sa ekonomske tačke gledišta, a i sa vidika razvijanja metoda. Takođe je problem interferencija različitih komponenata iz uzorka koji se selektivno i specifično mogu sprečiti nekom CE metodom [12–14].

U okviru naših istraživanja, sprovedeno je određivanje doksiciklina u humanom urinu nakon oralne aplikacije doze od 200 mg. Zdravi volonteri su posle jednokratne doze u toku 48 sati davali urin i izvedena



Slika 5. Uticaj koncentracije etanola (5, 10 i 15% V/V) na separaciju pod optimalnim uslovima.
Figure 5. Effect of ethanol concentration (5, 10 and 15%, v/v) on separation under optimal condition.



Slika 6. Elektroferogram dobijen analizom humanog urina dobijenog između 7,5 i 8,5 sati nakon oralne aplikacije, pod optimalnim uslovima na 350 nm.

Figure 6. Electropherograms obtained for human urine collected between 7.5 h and 8.5 h after oral application, under the optimized conditions, at 350 nm.

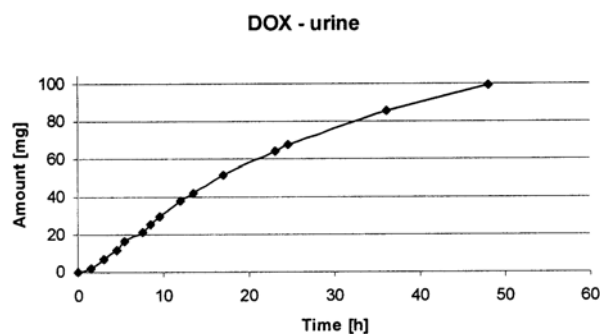
je direktna analiza bez ekstrakcije ili prečišćavanja uzorka. Optimalni uslovi pod kojima je interferencija bila najmanja i detekcija drugim bioloških molekula na minimumu je uz 30 mM boratni pufer pH vrednosti 9,0 uz dodatak 60 mM SDS-a i 5% (V/V) metanola. Radni napon, temperatura i nadpritisak su bili 30 kV, 25°C i 15 mbara, a detekcija je izvedena na 350 nm. Elektroferogram pod optimalnim uslovima za analizu doksiciklina u urinu je prikazan na slici 6.

Nakon optimizacije i validacije metode, kumulativna eliminacija doksiciklina urinom je praćena tokom dva dana i prihvatljivost metode je na osnovu poznatih farmakokinetičkih parametara, mogla biti ocenjena. Na osnovu literature je utvrđeno da je poluvreme eliminacije doksiciklina 18 sati i da se jednostavnim proračunom nakon oralne aplikacije 200 mg leka uz 95% resorpcije i 55% eliminacije nepromenjenog leka preko urina dobije vrednost od približno 52.25 mg doksiciklina. Znači, zdrava osoba sa normalnim metabolizmom posle uzimanja jednokratne doze od 200 mg doksiciklina, u toku 18 sati izluči 52,25 mg, a rezultati su pokazali da je prosečna kumulativna masa za praćene volontere $54,5 \pm 0,5$ mg. Na taj način je dokazano, da uz dobro optimizirane uslove moguće je nezavisno od izvora uzorka ($n = 6$) odrediti doksiciklin u urinu (slika 7).

Pored ispitivanja doksiciklina prethodno opisanom metodom direktnog injektovanja u CE sistem, razvijena je i nova, bolja metoda direktnog injektovanja biološkog materijala kao što je humani serum i

urin. Nova metoda je bazirala na već publikovanoj metodi za doksiciklin u farmaceutskim preparatima i urinu [21], s tim da je pod novim uslovima moguća analiza oba veoma zahtevna biološka uzorka bez prisustva interferencije na 350 nm. Ostale komponente ispitivanog materijala pod datim uslovima (80 mM SDS-a, 10% (V/V) metanola i 40 mM boratnog pufera (pH 9,3; 30 s \times 50 mbar; 25 °C; 30 kV) ne pokazuju specifične pikove i ne interferiraju sa komponentom koja se određuje [38].

Problem sa biološkim materijalom, kao što je znoj, majčino mleko, suze, semena tečnost, cerebrospinalna tečnost, pljuvačka, i različiti eksudati, upravo je niska koncentracija leka u uzorku ili čak i mala količina uzorka. S obzirom na to da se u MEKC metodi



Slika 7. Kumulativna kriva ekskrecije nepromenjenog oblika DOX (doksiciklina) urinom.

Figure 7. Cumulative excretion of unchanged DOX (doxycycline) in urine.

injektuje nanolitarska količina uzorka, taj deo nije problem, ali je zato limit detekcije i limit kvantifikacije, ili bolje rečeno osetljivost metode veliki je problem za tehniku kao što je MEKC.

PREDNOSTI I NEDOSTACI MEKC METODE

S obzirom na to da je kroz prethodna poglavlja napomenuto u nekoliko navrata da je MEKC metoda veoma efikasna, selektivna, specifična i robustna metoda, ali da nema dovoljnu osetljivost, preostaje samo da na neki način dokažemo da li je to prednost ili mana, i kako se može prevazići takav problem. Prednost nedovoljne osetljivosti MEKC metode u odnosu na recimo HPLC metodu je širi opseg linearnosti na račun osetljivosti. Ograničenje primene MEKC metode je u detekciji analita u tragovima. Danas postoje načini pomoću kojih se osetljivost MEKC-a može povećati i do 1000 puta. Naime, kombinacijom nekih od modela pripreme i injektovanja, može se postići nivo osetljivosti koji važi i za LC/MS/MS sisteme. Čvrsto-fazna ekstrakcija (SPE) je zapravo metoda ekstrakcije koja se koristi za prečišćavanje i povećanje koncentracije iz uzoraka kao što su voda, uzorci zemljišta, biološki materijal, hrana, prirodni proizvodi i slično. Procesom nanošenja uzorka na aktiviranu kolonu (reverzno faznu, katjonsku, anjonsku, kombinovanu), prečišćavanjem-ispiranjem i eluiranjem kolone uz uparavanje rastvarača pod strujom azota, dobija se suvi ekstrakt koji se rekonstituiše sa optimalnom količinom radnog pufera za MEKC i injektuje u sistem. Pored takvog vida povećanja koncentracije analita, može se i dužim visoko-volumskim injektovanjem pod maksimalnim pritiskom od 50 mbara povećati količina analita u kapilari (veći volumen se injektuje) i na taj način se dobije veći signal detektora i bolja osetljivost metode. Takođe postoji opcija da se bez klasičnog injektovanja na kraju procesa pre-kondicioniranja kapilare pod visokim pritiskom (900 do 1000 mbar) neko duže vreme (dva do tri minuta, zavisi od dužine i volumena same kapilare) injektuje uzorak. U okviru naših eksperimenata primenjen je sistem čvrsto-fazne ekstrakcije i visoko-volumensko injektovanje (30 sekundi pod pritiskom od 50 mbar; uobičajeno je 5-10 sekundi pod pritiskom od 15-25 mbara). Upotrebom ekstrakcije, modifikovanog injektovanja i MEKC metode, dobili smo osetljivost nivoa 1 µg/L za doksiciklin u humanom urinu, serumu, suzama, salive i semennoj tečnosti (tabela 2) [38].

Pored glavnog nedostatka koji se odnosi na osetljivost i koja se može korigovati, MEKC metoda ima veoma mnogo prednosti. Kao što je već napomenuto može se koristiti za anлізу kako naelektrisanih tako i neutralnih analita. Potom je veoma efikasna metoda koja pod otimalnim uslovima daje pikove karakterističnih oblika i simetrije. U poređenju sa hromatografijom na tankom sloju i HPLC metodom, ekološki je prihvatljivija i rutinski brže izvodljiva. Što se tiče ekološkog aspekta, za MEKC metodu je poznato da zahteva samo 2 mL radnog pufera koji sadrži za okolinu prihvatljive hemikalije (surfaktanti, fosfati, borat, citrat)

Tabela 2. Statistički parametri za kalibracionu krivu za DOX (linearna regresija), sa LOD, LOQ, tačnošću, dnevnom i među dnevnom ponovljivošću

Table 2. Statistical parameters of the calibration curve for DOX (linear regression), with LOD, LOQ, accuracy, within and between day repeatability

Analit	DOX	
	DI-LVSS-MEKC	SPE-LVSS-MEKC
Metoda*		
Uslovi injektovanja	30 s, 50 mbar	30 s, 50 mbar
Koeficijent korelacije (r)	0,9991	0,9990
Opseg linearnosti (mg/L)	0,1-100,0	0,005-10,0
LOD (mg/L)	0,030	0,001
LOQ (mg/L)	0,100	0,005
Tačnost ± SD (%)	98,3 ± 1,5	97,5 ± 2,4
Preciznost – u okviru dana %RSD		
– migraciono vreme	0,4	0,2
– površina pika	1,1	2,4
Preciznost – među danima %RSD		
– migraciono vreme	1,2	0,4
– površina pika	2,1	3,5
Tačnost uzorka ± SD (%):		
– opterećen urin	99,1 ± 2,5	99,4 ± 2,6
– opterećen serum	96,8 ± 3,1	98,1 ± 3,0
– opterećena sperma	Nemoguće	98,7 ± 3,2
– opterećena saliva	Nemoguće	99,3 ± 2,1
– opterećene suze	99,0 ± 1,5	99,8 ± 1,9

*(DI-LVSS-MEKC = direct injection large-volume sample stacking micellar electrokinetic capillary chromatography; SPE-LVSS-MEKC = solid-phase extraction large-volume sample stacking micellar electrokinetic capillary chromatography).

i u malom procentu organske rastvarače. Sa 2 mL pufera razdeljenog u dve viala, može se uraditi 30 do 40 analiza (u zavisnosti od kapaciteta pufera) dok za isti broj analiza HPLC metoda prosečno potroši litar veoma toksičnih organskih rastvarača kao što su metanol i acetonitril. Pored svega navedenog, dokazano je i da je MEKC metoda robustnija od HPLC metode, a i da je sama kapilara stabilniji sistem neko kolona, a istovremeno i ekonomičniji.

ZAKLJUČAK

MEKC metoda je poslednjih deset godina dobila značajno mesto u publikacijama i polako ulazi u regulatorne protokole. S obzirom na opšti trend "zelenih laboratorija" koje su značajne za zaštitu životne sredine i ne zagađuju je, MEKC metoda sa svim svojim prednostima i manama će postati lider među tehnikama za karakterizaciju novih materijala. Kombinacijom pripremnih postupaka ekstrakcije i načinom injektovanja će vrlo brzo MEKC metoda postati alternativna LC/MS/MS sistemima za analizu bioloških uzoraka, jer je svaki *in vivo* materijal novi sistem koji čeka da bude analiziran uz punu validaciju. Izborom

MEKC metode biće moguća analiza različitih uzoraka na efikasan, selektivan, robustan i ekološki prihvatljiv način.

ZAHVALNICA

Istraživanja predstavljena u ovom radu su realizovana u okviru naučnih projekata broj 142072 Ministarstva za nauku Republike Srbije i P4-0127 Agencije za istraživačku delatnost Republike Slovenije.

LITERATURA

- [1] D. Scoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytical Chemistry, An Introduction, 7th ed., Philadelphia, 2000.
- [2] H. Nishi, S. Terebe, J. Chromatogr. A **735** (1996) 3–27.
- [3] M. G. Khaledi, J. Chromatogr. A **780** (1997) 3–40.
- [4] European Pharmacopoeia V, 5th ed., Strasbourg, France, 2005.
- [5] The USP Pharmacopoeia 30: The National Formulary 25. Rokvil, SAD, 2007.
- [6] The British Pharmacopoeia, London, Great Britain, 2001.
- [7] L. K. Amundsen, Electrophoresis **28** (2007) 99–113.
- [8] T.J. Pappas, M. Gayton-Ely, L.A. Holland, Electrophoresis **26** (2005) 719–734.
- [9] P.T.T. Ha, J. Hoogmartens, A.V. Schepdael, J. Pharm. Biomed. Anal. **41** (2006) 1–11.
- [10] C. Garcia-Ruiz, M.L. Marina, Electrophoresis **27** (2006) 266–282.
- [11] L. Suntornsuk, J. Chromatogr. Sci. **45** (2007) 559–577.
- [12] C.P. Palmer, Electrophoresis **28** (2007) 164–173.
- [13] M. Silva, Electrophoresis **28** (2007) 174–192.
- [14] M. C. Breadmore, Electrophoresis **28** (2007) 254–281.
- [15] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, TrAC Trends Anal. Chem. **26** (2007) 133–153.
- [16] Y.-H. Hsieh, S.-J. Lin, S.-H. Chen, J. Sep. Sci. **29** (2006) 1009–1017.
- [17] A.V.C. Simionato, F.M. Lancas, M.A. Ruggiero, J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech. **29** (2006) 349–363.
- [18] T. Perez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, R. Galera, J. Pharm. Biomed. Anal. **42** (2006) 100–106.
- [19] R. Injac, N. Kocevar, S. Kreft, Anal. Chim. Acta **594** (2007) 119–127.
- [20] M.I.B. Perez, L.C. Rodriguez, C.C. Blanc, J. Pharm. Biomed. Anal. **43** (2007) 746–752.
- [21] R. Injac, J. Kac, S. Kreft, B. Strukelj, Anal. Bioanal. Chem. **387** (2007) 695–701.
- [22] E. Nemetlu, M.C. Elebier, B. Uyar, S. Altinoz, J. Chromatogr. B **854** (2007) 35–42.
- [23] D. Emre, N. Ozaltin, J. Chromatogr. B **847** (2007) 126–132.
- [24] L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, J. Anal. Chem. **62** (2007) 68–75.
- [25] C.C. Tsai, Y.R. Shu, P.H. Chan, C.H. Lin, J. Chromatogr. A **1101** (2006) 319–323.
- [26] F.S. Felix, M.S.M. Quintino, A.Z. Carvalho, L.H.G. Coelho, C.L. do Lago, L. Angnes, J. Pharm. Biomed. Anal. **40** (2006) 1288–1292.
- [27] T. Wen, X. Zhao, G.A. Luo, J. Wang, Y.M. Wang, B. Yao, J.Y. Zhao, J. Zhu, Z.S. Yu, Talanta **71** (2007) 854–860.
- [28] A.R. Timerbaev, O.O. Vasylenko, L.S. Foteeva, A.V. Rudnev, O. Semenova, B.K. Keppler, J. Sep. Sci. **30** (2007) 399–406.
- [29] H. Wang, R. Zhang, S. Zhao, L. Tang, Y. Pan, H. Pan, Anal. Chim. Acta **560** (2006) 64–68.
- [30] Y. Cheng, L. Fan, H. Chen, X. Chen, Z. Hu, J. Chromatogr. A **1072** (2005) 259–265.
- [31] R. Injac, B. Srdjenovic, M. Prijatelj, M. Boskovic, K. Karljickovic-Rajic, B. Strukelj, J. Chromatogr. Sci. **46** (2008) 137–143.
- [32] R. Injac, V. Djordjević-Milić, B. Srdjenović, J. Chromatogr. Sci. **45** (2007) 623–628.
- [33] R. Injac, J. Kac, A. Mlinarić, K. Karljicković-Rajić, J. Sep. Sci. **29** (2006) 1288–1293.
- [34] R. Injac, A. Mlinarić, V. Djordjević-Milic, K. Karljickovic-Rajic, B. Strukelj, Food Add. Contam. **25** (2008) 424–431.
- [35] R. Injac, J. Kac, K. Karljicković-Rajic, B. Strukelj, J. Food Drug Anal. **16** (2008) 18–25.
- [36] R. Injac, N. Kocevar, B. Strukelj, Croat. Chem. Acta, In production.
- [37] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, Anal. Chim. Acta, In press.
- [38] R. Injac, K. Karljicković-Rajić, B. Strukelj, Electrophoresis, In production.

SUMMARY

APPLICATION OF MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY FOR ROUTINE ANALYSIS OF DIFFERENT MATERIALS

(Review paper)

Rade Injac^{1,2}, Katarina Karljicković-Rajić³, Borut Štrukelj¹

¹Faculty of Pharmacy, The Chair of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

²Medical Faculty, Department of Pharmacy, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia

³Faculty of Pharmacy, Institute of Analytical Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) has become a popular mode among the several capillary electro-migration techniques. Most drug analysis can be performed by using MEKC because of its wide applicability. Separation of very complex mixtures, determination of drugs in the biological materials, etc., can be successfully achieved by MEKC. This review surveys typical applications of MEKC analysis. Recent advances in MEKC, especially with solid-phase extraction and large-volume sample stacking, are described. Modes of electrokinetic chromatography including MEKC, a separation theory of MEKC, environmental friendly analysis, and selectivity manipulation in MEKC are also briefly mentioned.

Key words: Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) • Material characterization • Validation • Application •

Ključne reči: Micelarna elektrokinetička kapilarna hromatografija (MEKC) • Karakterizacija materijala • Validacija • Aplikacija •