

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Ondřej Petrák

## ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ RIVAROXABANU

Electrophoretic determination of rivaroxaban

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D

Praha 2021

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13.1.2021

## **Poděkování**

Rád bych chtěl poděkovat mému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD., za jeho neocenitelné rady, pomoc a trpělivost při tvorbě této práce. Chtěl bych též poděkovat mé rodině, přátelům a přítelkyni za veškerou podporu, kterou mi při psaní této práce poskytli.

## Abstrakt

Kapilární elektroforéza je metoda používaná ve farmaceutické analýze z důvodu nízkých nákladů, rychlosti a šetrnosti k životnímu prostředí. Tato diplomová práce se zabývá vývojem elektroforetické metody pro stanovení rivaroxabanu. V rámci řešení této práce byla po několika optimalizacích vyvinuta metoda vhodná pro stanovení lékových forem rivaroxabanu.

Optimalizace zahrnovaly změnu složení základního elektrolytu, který byl z vodného roztoku nízkomolekulárních organických kyselin změněn v několika krocích až na nevodný roztok kyseliny octové a cetyltrimethylamoniumbromidu v acetonitrilu.

Konečné podmínky zahrnovaly základní elektrolyt složený z 1M kyseliny octové a 40 mM cetyltrimethylamoniumbromid v acetonitrilu, hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 5,0 kPa po dobu 3,0 s a následné vložení separační napětí 30,0 kV po celou dobu analýzy. Obsah kapiláry byl po celou dobu analýzy mobilizován tlakem 0,50 kPa. Tím byla získána selektivní metoda pro stanovení lékových forem rivaroxabanu s mezí detekce 0,0056 mg/ml a mezí stanovitelnosti 0,019 mg/ml, která byla lineární v rozmezí koncentrací rivaroxabanu 0,01 – 0,40 mg/ml s výtěžností 92,3 %.

## Klíčová slova

kapilární elektroforéza, farmaceutická analýza

## Abstract

Capillary electrophoresis is a method used in pharmaceutical analysis because of its low cost, speed and environmental friendliness. This diploma thesis deals with development of electrophoretic method for rivaroxaban determination. After several optimizations, a method suitable for rivaroxaban determination inside its dosage forms was developed. Optimizations involved change of background electrolyte's composition from aqueous solution of low molecular weight organic acids to non-aqueous solution of acetic acid and cetyltrimethylammoniumbromide in acetonitrile in multiple steps.

Final conditions of analysis included background electrolyte composed of 1M acetic acid and 40mM cetyltrimethylammoniumbromide in acetonitrile, sample injection carried out hydrodynamically by pressure of 5,0 kPa for period of 3 s and subsequent insertion of separation voltage of 30,0 kV for entire duration of analysis. Capillary content was mobilized by pressure of 0,50 kPa for entire duration of analysis. With aforementioned optimizations a selective method for determination of dosage forms of rivaroxaban was obtained. This method provides limit of detection 0,0056 mg/ml and limit of quantification 0,019 mg/ml and is linear in 0,01 – 0,40 mg/ml range with a recovery of 93,2 %.

## Keywords

capillary electrophoresis, pharmaceutical analysis

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt .....  | 4  |
| Klíčová slova .....                                       | 4  |
| Abstract .....  | 5  |
| Keywords .....  | 5  |
| Seznam použitých zkratk a symbolů .....                   | 7  |
| 1. Cíl práce .....  | 9  |
| 2. Úvod .....   | 10 |
| 2.1 Rivaroxaban .....                                     | 10 |
| 2.2 Existující metody pro stanovení rivaroxabanu .....    | 11 |
| 2.2.1 Metody separační .....                              | 11 |
| 2.2.2 Metody spektrometrické .....                        | 13 |
| 2.2.3 Metody elektrochemické .....                        | 13 |
| 2.3 Kapilární elektroforéza .....                         | 14 |
| 2.3.1 Historie .....                                      | 14 |
| 2.3.2 Výhody .....  | 14 |
| 2.3.3 Princip .....                                       | 15 |
| 2.3.4 Bezvodá CE .....                                    | 19 |
| 2.3.5 Proč CE? .....                                      | 20 |
| 3. Experimentální část .....                              | 21 |
| 3.1 Použité chemikálie a přístroje .....                  | 21 |
| 3.1.1 Chemikálie .....                                    | 21 |
| 3.1.2 Přístroje a jiné vybavení .....                     | 21 |
| 3.2 Metoda stanovení rivaroxabanu .....                   | 22 |
| 4. Výsledky a diskuse .....                               | 23 |
| 4.1 Optimalizace metody .....                             | 23 |
| 4.2 Kalibrační závislost .....                            | 28 |
| 4.3 Selektivita při analýze tablety Xarelto .....         | 31 |
| 4.4 Opakovatelnost při analýze tablety Xarelto .....      | 32 |
| 4.5 Využití metody při analýze reálného vzorku .....      | 33 |
| 4.6 Využití metody při analýze vzorku krevní plazmy ..... | 34 |
| 5. Závěr .....  | 36 |
| 6. Literatura .....                                       | 37 |

## Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN – acetonitrile, acetonitril

BGE – background electrolyte, základní elektrolyt.

CE – capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza

CTAB – cetyltrimethylammonium bromide, cetyltrimethylamoniumbromid

DOAC – direct oral anticoagulants, přímé orální antikoagulanty

EOF – electroosmotic flow, elektroosmotický tok

LOD – limit of detection, mez detekce

LOQ – limit of quantification, mez stanovitelnosti

RIV – rivaroxaban

$F_e$  – elektrostatická síla

$q$  – náboj iontu

$E$  – intenzita elektrického pole

$F_f$  – třecí síla

$\eta$  - viskozita BGE

$R$  – Stokesův poloměr iontu

$v$  – rychlost iontu

$l_d$  – délka kapiláry od počátku po bod detekce

$l_c$  – celková délka kapiláry

$t_m$  – migrační čas analytu

$\mu_{ep}$  – elektroforetická pohyblivost iontu

$V$  – vložené napětí

$\mu_{poz}$  – pozorovaná elektroforetická pohyblivost analytu

$\mu_{eo}$  – pozorovaná elektroforetická pohyblivost neutrálního markeru

$\mu_{sku}$  – skutečná elektroforetická pohyblivost analytu

$\zeta$  – zeta potenciál elektrické dvojvrstvy

$\varepsilon$  – relativní permitivita

$v_{eof}$  – velikost elektroosmotického toku

$\lambda$  – vlnová délka

$c_g$  – hmotnostní koncentrace

$c$  – molární koncentrace

$s_{y,x}$  – směrodatná odchylka



## 1. Cíl práce

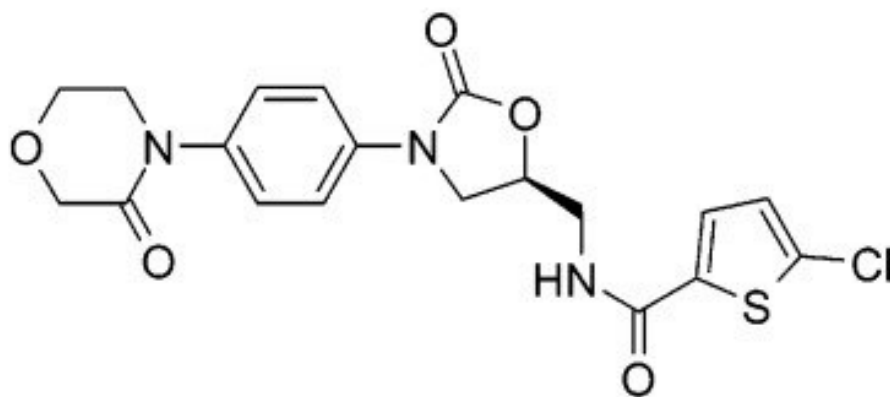
Rivaroxaban je látkou používanou v lékařství, a proto jsou potřeba metody pro jeho rychlé a přesné stanovení. Dosavadní metody jsou nákladné, nebo časově náročné. Proto je cílem mé diplomové práce vývoj elektroforetické metody pro jeho stanovení, protože elektroforetické metody patří mezi nízkonákladové a rychlé metody šetrné k životnímu prostředí.

## 2. Úvod

Protože rivaroxaban (RIV) patří mezi farmaceuticky aktivní látky, je existence metod pro jeho stanovení klíčová. Metody pro stanovení farmaceuticky aktivních látek jsou obecně využívány pro kontrolu kvality ve farmaceutickém průmyslu, ve farmakokinetických studiích při vývoji léčiv a také při sledování hladiny léčiv v krvi pacientů.

### 2.1 Rivaroxaban

RIV je orálně použitelný, přímý inhibitor faktoru Xa koagulační kaskády (1). Inhibuje jak volný, tak i ve sraženinách vázaný faktor Xa. Jedná se o derivát oxazolidonu s relativní molekulovou hmotností 435,88 (1) a strukturou znázorněnou na Obr. 1. Jeho rozpustnost je ve vodných roztocích nízká, do 7 mg/l v závislosti na pH (1). Byl vyvinut společností Bayer HealthCare AG, D-42096 Wuppertal, Německo. Patří do skupiny přímých orálních antikoagulantů (Direct Oral Anticoagulants = DOAC). Do této skupiny patří i další látky, například apixaban a edoxaban (3).



Obr. 1 – Struktura RIV. Převzato z (2). Upraveno.

## 2.2 Existující metody pro stanovení rivaroxabanu.

Protože je RIV používán ve zdravotnictví, existuje potřeba metod pro jeho stanovení. Příliš velká, nebo malá dávka podaná pacientovi může mít fatální následky. Již existující metody jsou především separační, nebo spektrometrické. Elektrochemické metody stanovení RIV nejsou příliš rozšířené.

### 2.2.1 Metody separační

Do této skupiny patří většina laboratorních testů. Například Lagoutte-Renosi a kolektiv (4) využili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC – MS/MS). Tato metoda je využitelná pro stanovení RIV v krevní plazmě. Při této analýze byla použita kolona C18-A Polaris 100,0 × 2,0 mm s velikostí částic 3 μm. Při chromatografii byla využita gradientová eluce a mobilní fáze byla tvořena směsí vody v čistotě pro hmotnostní analýzu a methanolu téže čistoty. Jejich metoda během pětiminutové analýzy vykazovala lineární odezvu v rozsahu 5-1000 μg/ml.

Jako další metodu lze zmínit tu, kterou publikoval Gouveia a kolektiv (5). Tato skupina využila HPLC s detektorem diodového pole (HPLC-DAD). Jejich metoda je použitelná i pro jiné látky ze skupiny DOAC - apixaban, dabigatran a edoxaban. Velkou výhodou této metody je jednoduchost a výše nákladů, například ve srovnání s HPLC - MS/MS. Zároveň již byla použita v klinické praxi. Tuto metodu je možné využít pro stanovení vzorků DOAC v krevní plazmě. Jako mobilní fáze je využita směs ultra čisté vody s kyselinou mravenčí a ACN v čistotě pro gradientovou HPLC. Použitou kolonou je C18 s reverzní stacionární fází, konkrétně LiChroCART Purospher Star C<sub>18</sub> 55,0 mm × 4,0 mm s velikostí částic 3 μm. RIV je detegován při  $\lambda = 249$  nm a poskytuje během šestiminutové analýzy lineární odezvu v rozmezí 0,017 – 5,28 μg/ml.

Jednu z dalších metod publikoval Alam a kolektiv (6). Tento tým využil vysokoúčinnou chromatografii na tenké vrstvě s reverzními fázemi (RP-HPTLC). Její velkou výhodou, oproti dříve existujícím HPTLC metodám (7) je především velikost nákladů vyplývajících z této metody. Zároveň je tato metoda ohleduplná vůči životnímu prostředí, což je samozřejmě výhodné. Jako mobilní fázi využívá směs ethanol: voda v čistotě pro chromatografii v objemovém poměru 70: 30 a jako stacionární fáze byly využity HPTLC destičky „RP-18 silica gel 60 F254S“ (6). Metoda je využitelná pro stanovení RIV ve formě nanočástic i prodáváných tablet. Pro vlastní kvantifikaci RIV posloužila denzitometrie při  $\lambda_{\max} = 253 \text{ nm}$ .

Metoda poskytuje lineární odezvu v rozmezí 50 – 600 ng RIV na jeden proužek HPTLC destičky při využití automatického dávkování.

## 2.2.2 Metody spektrometrické

Jednou z existujících spektrometrických metod je ta, kterou publikoval Sekaran a kol. (8) Tento tým vytvořil velmi rychlou a levnou metodu pro stanovení RIV v hromadných vzorcích lékových forem. Tato metoda pracuje se vzorky rozpuštěnými v dimethylsulfoxidu při  $\lambda = 270$  nm. Je lineární v rozsahu 2 – 20  $\mu\text{g/ml}$  a dosahuje značné selektivity. Může být využita například pro kontrolu kvality.

Jako další metodu lze zmínit publikaci Loriese a jeho týmu (9). Tento tým se zaměřil na testování vzorků RIV v lékových formách. Tato metoda existuje ve dvou variantách – 1. využívá jednu derivovanou spektra RIV a jeho alkalických degradačních produktů a 2. podíl těchto spekter se spektry alkalických degradačních produktů RIV rozpuštěných v ACN. Toto je dáno několika důvody. V případě varianty 1 je to především značný překryv spektra RIV a jeho alkalických degradačních produktů, který znemožňuje použití klasické UV spektrometrie. Navíc není ovlivněna koncentrací jiných složek vzorku a poskytuje kalibrační závislost procházející velmi blízko 0. Díky využití jednou derivovaných spekter je možné stanovit RIV i v přítomnosti jeho alkalických degradačních produktů.

## 2.2.3 Metody elektrochemické

Elektrochemické metody jsou v případě RIV vzácné, podařilo se mi najít práci publikovanou Süslü a kol. (10). Tento tým použil square-wave voltmetrii s visící rtuťovou kapkovou elektrodou a argentchloridovou referenční elektrodou. Metoda je využitelná pro stanovení RIV v lékových formách a využívá Brittonův- Robinsonův pufr při pH 8,0. Poskytuje lineární odezvu v rozmezí 2,38 – 7,45  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2.3 Kapilární elektroforéza

### 2.3.1 Historie

Historie kapilární elektroforézy (CE) sahá do 50. let 20. století (11), kdy byly využity elektroforetické separace v úzkých trubicích. Jednou z prvních publikací na toto téma je práce Haglunda a Tiselie (12), kde byla využita zónová elektroforéza na koloně naplněné skelným prachem. Kapilární elektroforéza v její dnešní podobě byla popsána Jorgensonem a Lukacsem (13). Práce tohoto týmu popsala základní principy separace pomocí kapilární elektroforézy a vliv elektroosmotického toku na rozlišení (11). Postupem času vznikly různé druhy CE. Například micelární elektrokinetická chromatografie (14), kapilární gelová elektroforéza (15) a isoelektrická fokusace (16). Českou stopu zanechal Hořejší a Kocourek vytvořením afinitní elektroforézy (17).

Silným impulzem pro její rozšíření bylo uvedení komerčně dostupné instrumentace na trh v roce 1989 (11).

### 2.3.2 Výhody

Oproti klasické gelové elektroforéze přináší CE několik výhod. Jedná se o rychlejší a efektivnější separace díky použití vyšší intenzity elektrického pole, což je umožněno lepším odvodem Jouleova tepla z tenké kapiláry. Dostupná literatura uvádí analýzy kratší než 1 s na skleněných čípech (18) a separace odpovídající vlastnostem kolony s jedním milionem teoretických pater (19). Další výhodou je výrazně širší spektrum stanovitelných analytů od malých molekul a iontů až po velmi velké molekuly, jako například glykoproteiny a oligonukleotidy. CE může být využita téměř v každé laboratoři využívající kapalinovou chromatografii (LC) a je komplementární vůči kapalinové chromatografii s reverzními fázemi (RP-LC). Zároveň se jedná o jednoduchou a nákladově příznivou metodu. Protože CE vyžaduje pouze malé objemy vzorků a základního elektrolytu (BGE, background electrolyte), umožňuje využití exotických rozpouštědel / reagensů jako aditiv v BGE pro zlepšení separace, což by u LC bylo kvůli potřebným objemům mobilní fáze příliš nákladné (11). Spotřeba analytu je tak nízká, že umožňuje analýzy jednotlivých buněk, které mají celkový objem několik nl (20).

### 2.3.3 Princip

Dominantní vliv na separaci během CE mají 2 mechanismy – elektroforetická pohyblivost analytu a elektroosmotický tok (EOF) vznikající v křemenné kapiláře (11).

#### *Elektroforetická pohyblivost*

Při elektroforetické separaci působí na analyt 2 protichůdné síly. První z nich je síla elektrostatická, která přitahuje iont k opačně nabitě elektrodě. Tato síla je přímo úměrná součinu náboje iontu a intenzitě elektrického pole. Tento vztah je popsán rovnicí [1], kde  $F_e$  odpovídá elektrostatické síle,  $q$  náboji iontu a  $E$  intenzitě elektrického pole.

$$F_e = q \cdot E \quad [1]$$

Proti této síle působí třecí síly. Jejich velikost závisí na Stokesově poloměru iontu, viskozitě BGE a rychlosti iontu. Tento vztah je popsán rovnicí [2], kde  $F_f$  odpovídá třecí síle,  $\eta$  viskozitě BGE,  $R$  Stokesově poloměru iontu a  $v$  rychlosti iontu.

$$F_f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R \cdot v \quad [2]$$

Elektrostatická síla urychluje pohyb daného iontu, ale s rostoucí rychlostí migrace se zvětšuje i protisměrná třecí síla. V momentě, kdy se velikosti obou sil vyrovnají, je rychlost iontu popsána rovnicí [3], kde  $q$  odpovídá náboji iontu,  $E$  intenzitě elektrického pole,  $\eta$  viskozitě BGE a  $R$  Stokesově poloměru iontu.

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \quad [3]$$

Rychlost iontu v elektrickém poli je tedy přímo úměrná velikosti náboje iontu a nepřímo úměrná jeho Stokesově poloměru. Zároveň bude se zvyšující se viskozitou BGE klesat, pokud vše ostatní zůstane konstantní. Z rovnice [3] zároveň vyplývá přímá úměra mezi intenzitou elektrického pole vloženého na kapiláru a rychlostí iontu. Při zvýšení vloženého napětí se tedy iont bude pohybovat rychleji, bude-li vše ostatní konstantní.

Experimentálně je možné rychlost určit jako podíl délky kapiláry a času migrace analytu. Tento vztah vyjadřuje rovnice [4], kde  $l_d$  odpovídá délce kapiláry od počátku po bod detekce v centimetrech a  $t_m$  času migrace analytu od počátku do tohoto bodu v sekundách.

$$v = \frac{l_d}{t_m} \quad [4]$$

Výsledkem je rychlost daného iontu v cm/s.

Elektroforetická pohyblivost daného iontu  $\mu_{ep}$  je v konkrétním médiu konstantní a je definována jako podíl rovnoměrné rychlosti iontu a intenzity elektrického pole ( $\mu_{ep} = v/E$ ).

Experimentálně ji lze získat výpočtem z následující rovnice [5], kde  $l_d$  odpovídá délce kapiláry k detektoru v centimetrech,  $l_c$  celkové délce kapiláry v centimetrech,  $V$  vloženému napětí ve voltech a  $t_m$  migračnímu času iontu v sekundách.

$$\mu = \frac{l_d \cdot l_c}{V \cdot t_m} \quad [5]$$

Výsledkem je elektroforetická pohyblivost iontu v  $\text{cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$  (11).

### *Elektroosmotický tok*

EOF vzniká v křemenných kapilárách díky přítomnosti volných silanolových skupin na stěně kapiláry. Záporně nabitá stěna kapiláry přitahuje kationty z BGE a vytváří tak elektrickou dvojrstvu přilehlou ke křemennému povrchu. Tyto hydratované kationty migrují ke katodě a unášejí s sebou kapalný obsah kapiláry. Takto vzniklý EOF je poměrně silný a obvykle je významnější než elektroforetické pohyblivosti jednotlivých analytů. Dochází tedy k pohybu všech analytů, bez ohledu na jejich náboj, směrem ke katodě. Základní separační mechanismus v CE je zobrazen na Obr. 2, str. 18.

Protože záporně nabitě analyty vykazují elektroforetickou pohyblivost v opačném směru než EOF, opouštějí kapiláru jako poslední. Neutrální látky migrují společně s EOF a nejsou tak separovány. Kladně nabitě analyty vykazují elektroforetickou pohyblivost ve stejném směru jako EOF a eluují tedy nejdříve.



Díky existenci EOF je rovnice [5] platná pouze v případě, kdy je EOF zredukován na nulu. Toto nastává u pokrytých kapilár, nebo nízkých pH. Jinak je hodnota získaná z rovnice [5] pozorovanou elektroforetickou pohyblivostí analytu  $\mu_{poz}$ . Pro zjištění skutečné elektroforetické pohyblivosti musí být pohyblivost EOF odečtena od  $\mu_{poz}$ . Hodnota pohyblivosti EOF je zjištěna pomocí přidání neutrálního markeru a změření jeho pozorované elektroforetické pohyblivosti  $\mu_{eof}$ . Ta je následně odečtena od pozorované elektroforetické pohyblivosti analytu pro získání skutečné elektroforetické pohyblivosti analytu  $\mu_{sku}$ . Toto je popsáno rovnicí [6].

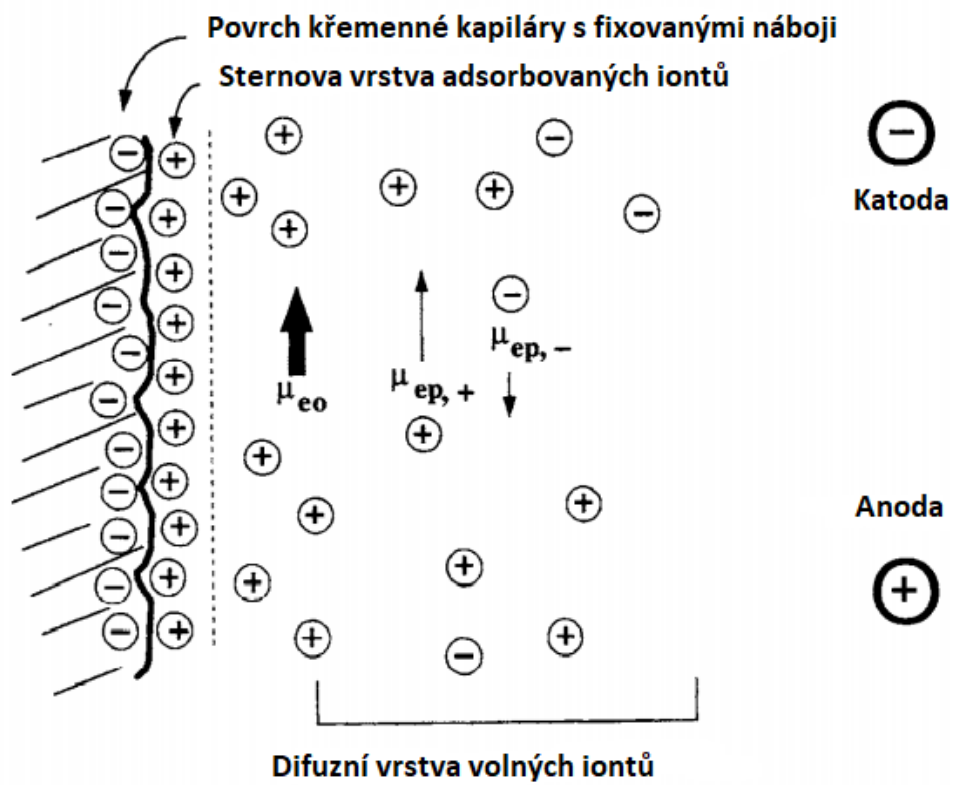
$$\mu_{sku} = \mu_{poz} - \mu_{eof} \quad [6]$$

Velikost EOF je závislá na zeta potenciálu elektrické dvojvrstvy na rozhraní kapiláry a kapaliny  $\zeta$ , relativní permitivitě BGE  $\varepsilon$ , intenzitě elektrického pole  $E$  a viskozitě BGE  $\eta$ . Tato závislost je znázorněna v rovnici [7].

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta} \quad [7]$$

EOF je ve většině případů přínosný, jelikož umožňuje rychlou, efektivní separaci a průchod všech analytů, bez ohledu na jejich náboj, skrze detektor. Velikost EOF může být upravena změnou zeta potenciálu. Jelikož je povrchový náboj křemenné kapiláry spjat s hodnotou pH, dochází ke změně rychlosti EOF v závislosti na pH. Zvýšení pH znamená zvýšení rychlosti EOF a naopak.

Další možností, jak ovlivnit velikost EOF je změna koncentrace BGE, nebo změna jeho viskozity. Zvýšení těchto parametrů znamená snížení rychlosti EOF (11).



Obr. 2 – Mechanismus separace při kapilární zónové elektroforéze. Převzato z (11).  
 Upraveno.

### 2.3.4 Bezvodá CE

Historie bezvodé CE sahá do roku 1984, kdy Walbroehl a Jorgenson publikovali první práci využívající CE v bezvodém prostředí (21). Od této doby došlo ke značnému rozšíření bezvodé CE (22).

Hlavní výhodou bezvodé CE oproti vodné variantě je značné rozšíření stanovitelných analytů i o ty, které nejsou ve vodných roztocích rozpustné. Díky tomu je CE využitelná i pro stanovení takových látek, jako například polycyklické aromatické uhlovodíky, což publikoval Miller a kol. (23). Mnoho terapeuticky využitelných látek je hydrofobních a mohou tedy být pomocí bezvodé CE stanoveny.

Mimoto využití organických rozpouštědel snižuje riziko nežádoucích interakcí analytu se stěnou kapiláry (24).

Zvýšená rozpustnost je důležitá nejen pro analyty, ale také pro různé typy selektorů, které mohou být použity. Například cyklodextriny se lépe rozpouštějí v organických rozpouštědlech než ve vodě. Díky tomu může být chirální separace vylepšena zvýšením použité koncentrace chirálně selektivní látky. Zároveň je maximální enantioselektivita dosahována v širším rozmezí koncentrace cyklodextrinů oproti analýzám ve vodném prostředí. To umožňuje snazší vývoj metod (25).

Další výhodou použití organických rozpouštědel je zvýšení selektivity v porovnání s vodnými separacemi (26). Pro tento rozdíl existují dva hlavní důvody. Zaprvé, acidobazické vlastnosti analytu se liší v rozpouštědlech z různých skupin. Je tedy možné separovat i látky, které mají ve vodném prostředí velmi podobné hodnoty  $pK_a$  a nebylo by možné je v tomto prostředí separovat. Zadruhé vykazují organická rozpouštědla různě silné solvatační síly vůči jiným organickým rozpouštědlům a vodě.

Pro bezvodou CE je možné využít různá rozpouštědla, například methanol, formamid, *N,N*-dimethylformamid, acetonitril a jiná (22).

### 2.3.5 Proč CE?

Výhodou CE oproti plynové chromatografii, vysokoúčinné kapalinové chromatografii, chromatografii na tenké vrstvě i gelové elektroforéze je její využitelnost pro separaci široce odlišných látek, anorganických iontů, organických molekul a velkých biomolekul při využití jediného přístroje a často pouze za změny složení BGE. To u ostatních metod možné není. Navíc má CE ze všech kapalinových separačních metod nejvyšší rozlišovací schopnost díky plochému profilu EOF a minimální difuzi.

CE je šetrná k životnímu prostředí, neboť při ní vzniká minimální množství obvykle nepříliš nebezpečného odpadu (27).

Stručný přehled stanovitelných analytů

- Anorganické ionty
- Organické kyseliny
- Aminokyseliny
- Peptidy
- Proteiny
- Nukleové kyseliny
- Léčiva
- Drogy

## 3. Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

- Kyselina octová, 100% pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Rivaroxaban (Zentiva, Praha, Česká republika), číslo šarže 130212
- Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), pro syntézu (Merck, Schuchardt, Německo)
- Acetonitril (ACN), HPLC gradient grade (Honeywell, Charlotte, USA)
- Xarelto tablety 20 mg (Bayer Pharma AG, Berlín, Německo), šarže BXGL2E1
- Krevní plazma

#### 3.1.2 Přístroje a jiné vybavení

- Kapilární elektroforéza CE 1600 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S15, Elma Schmidbauer (Singen, Německo)
- Křemenná kapilára: délka 50,0/41,5 cm, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- Centrifuga MiniSpin, Eppendorf (Hamburg, Německo)

## 3.2 Metoda stanovení rivaroxabanu

Teplota kazety s kapilárou: 25°C.

Příprava nové kapiláry: promytí ACN po dobu 20 minut.

Příprava kapiláry před začátkem série měření: promytí kapiláry ACN po dobu 5 minut do odpadní vialky.

Příprava kapiláry před každým jednotlivým měřením: promytí kapiláry BGE do odpadní vialky po dobu 1 min, poté do vialky s BGE další 1 min.

Injektáž vzorku byla realizována pomocí hydrodynamického dávkování. Vzorek byl dávkován tlakem 5,0 kPa po dobu 3,0 s. Následně bylo vloženo separační napětí 30,0 kV po celou dobu analýzy. Během celé doby analýzy byl obsah kapiláry mobilizován tlakem 0,50 kPa a detegován UV detektorem při  $\lambda = 200$  a 254 nm. Metoda byla optimalizována – viz kapitola 4.1.

Složení BGE: 1M CH<sub>3</sub>COOH a 40 mM CTAB v ACN.

Roztoky vzorků čistého RIV byly připravovány zředěním zásobního roztoku RIV v ACN o  $c = 1,0$  mg/ml pomocí BGE.

Tablety Xarelto byly rozdrceny a rozetřeny v třecí misce s tloučkem. Následně byly rozpuštěny v ACN v ultrazvukové lázni a takto získaný roztok o  $c_g = 1,0$  mg/ml byl zfiltrován přes stříkačkový filtr z polyvinylidenfluoridu s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

Krevní plazma byla smíchána s trojnásobným objemem ACN a následně byla centrifugována. Pro vlastní měření byl vždy používán získaný supernatant.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Optimalizace metody

V průběhu měření bylo vyzkoušeno několik variant metody. Díky snaze o co nejjednodušší provedení, co nejmenší nežádoucí vliv na životní prostředí a co nejnižší náklady byla jako první uvažována metoda velmi jednoduchá, kdy bylo použito 1M vodných roztoků nízkomolekulárních organických kyselin – kyseliny mravenčí a kyseliny octové - jako BGE. Tato metoda se neosvědčila, jejím problémem byla nereprodukovatelnost výsledků. Navíc RIV při této metodě nemigroval, protože nedošlo k nabití jeho molekuly. Ani přidání různých podílů nevodné složky (ACN) do BGE při této metodě nepřineslo zlepšení.

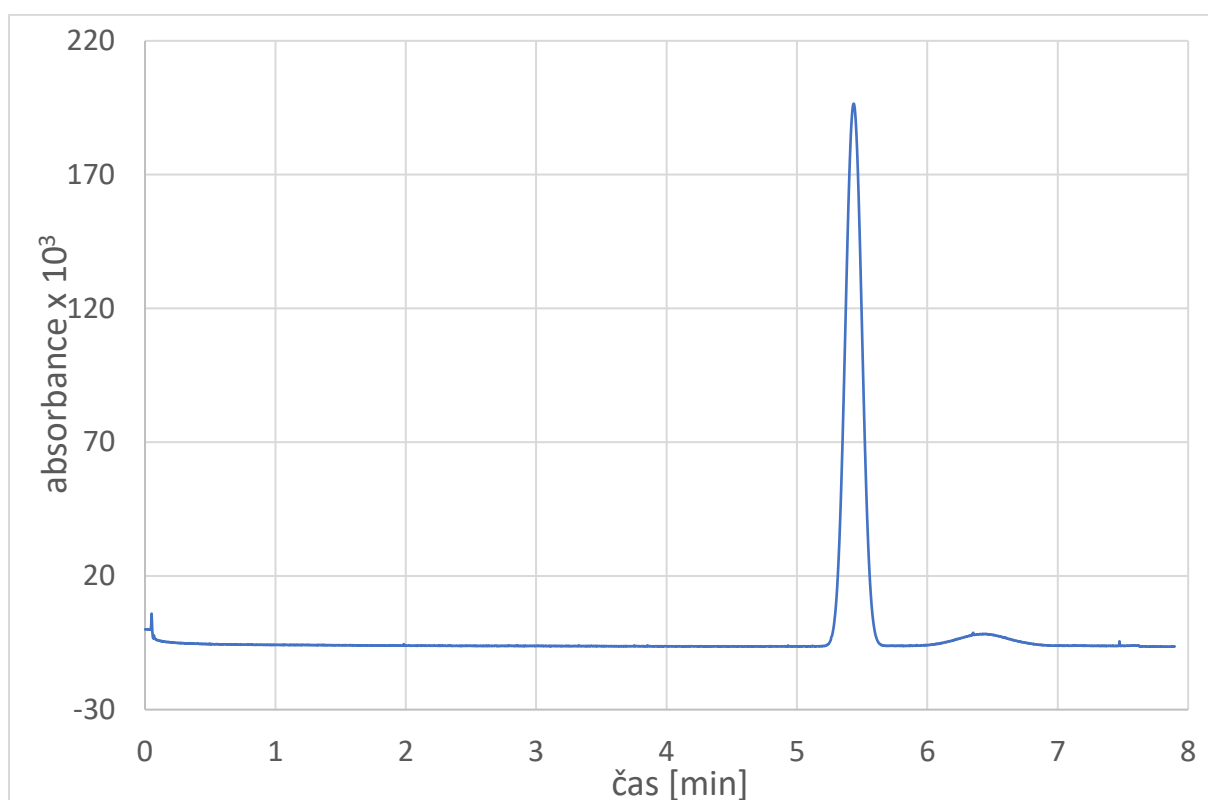
Další uvažovanou variantou byl 20mM vodný roztok dodecylsírany sodného (SDS) v 10mM vodném tetraboritanu sodném. Tato varianta byla uvažována, protože SDS jakožto surfaktant tvoří micely, které jsou schopné pomoci s migrací neutrálních, jinak nepohyblivých látek. Zároveň má vliv na EOF, který je díky němu posílen, což by mělo přinést zkrácení migračních časů. Navíc má příznivý vliv na rozpustnost některých látek. Ani v tomto případě však nedošlo k migraci RIV, což bylo prokázáno nerozlišitelností píku RIV od píku thiomčoviny, jakožto ukazatele EOF. Toto je znázorněno na Obr. 3, str. 24. I v tomto případě bylo testováno přidání nevodné složky (ACN) do směsi s BGE, ale bez výsledku. Byl testován podíl ACN 20 a 50 objemových %.

Následně proběhl přechod k nevodnému prostředí, kde jako BGE posloužila 1M kyselina octová s CTAB v ACN, kde byly využity vlastnosti CTAB jako surfaktantu. CTAB má opačný vliv na EOF než SDS. EOF je v závislosti na koncentraci CTAB oslaben, případně může být i obrácen jeho směr. CTAB umožňuje mobilizaci RIV pomocí tvorby micel, které unášejí molekuly RIV s sebou. Jako první byla testována 20mM koncentrace CTAB, která již dokázala RIV rozpohybovat, ale takto získaná pohyblivost nebyla dostatečná pro dokonalé rozlišení píku RIV od píku markeru EOF. Toto je možné vidět na Obr. 4, str. 25.

Poslední úpravou složení BGE bylo zvýšení koncentrace CTAB z 20mM na 40mM. Díky tomu již došlo k úplnému rozdělení píků RIV a markeru EOF. Toto je vidět na Obr. 5, str. 26. Toto však mělo nepříznivý vliv na dobu trvání analýzy, protože byl díky zvýšení koncentrace CTAB posílen EOF v opačném směru a RIV byl tedy více zpomalován při průchodu kapilárou, respektive byl silněji mobilizován směrem k anodě. Byl proto přidán stálý hydrodynamický tlak, díky kterému došlo k výraznému zkrácení času analýzy.

Zároveň měl stálý hydrodynamický tlak příznivý vliv na stabilitu migračních časů RIV a tedy reprodukovatelnost měření.

Toto je znázorněno na Obr. 6, str. 27.

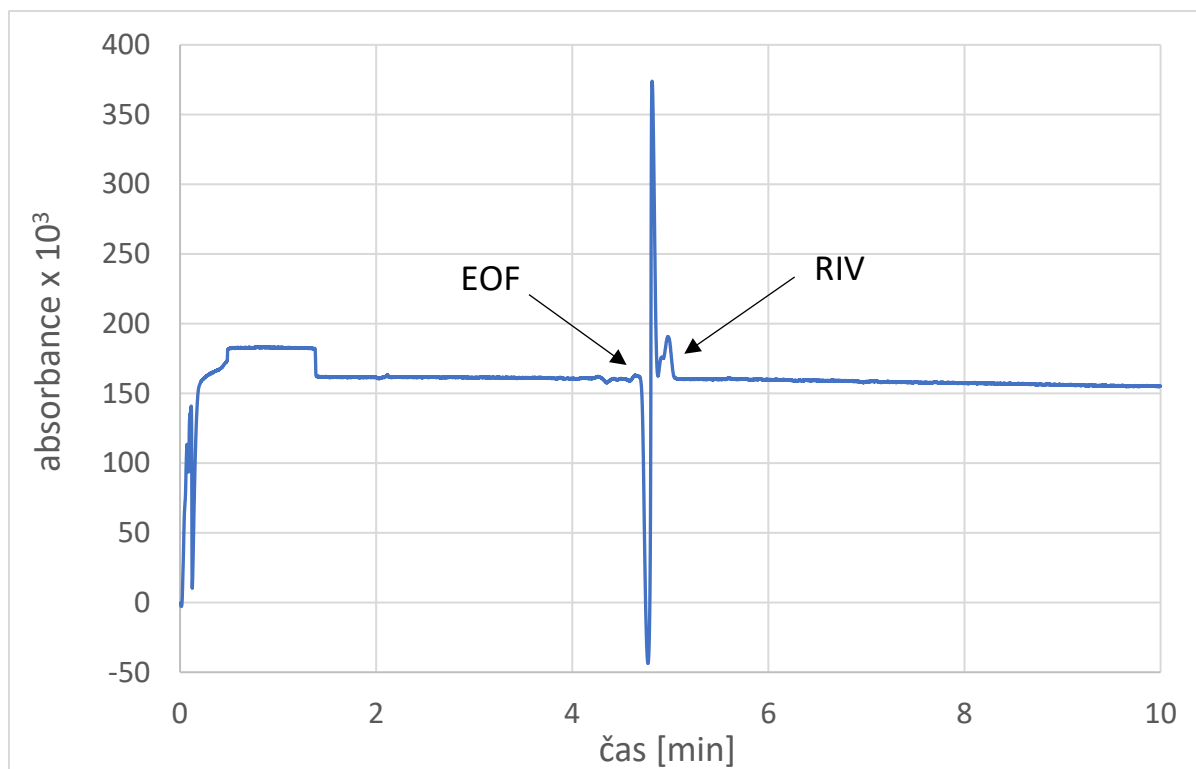


Obr. 3 – Elektroforeogram směsi RIV a thiomocoviny o  $c_g = 0,1$  mg/ml. Jak je zde vidět, nedošlo k rozdělení píků RIV a thiomocoviny, RIV tedy nemigroval.  $\lambda = 200$  nm. Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 minutu do odpadní vialky a pak 1 minutu do vialky s BGE.

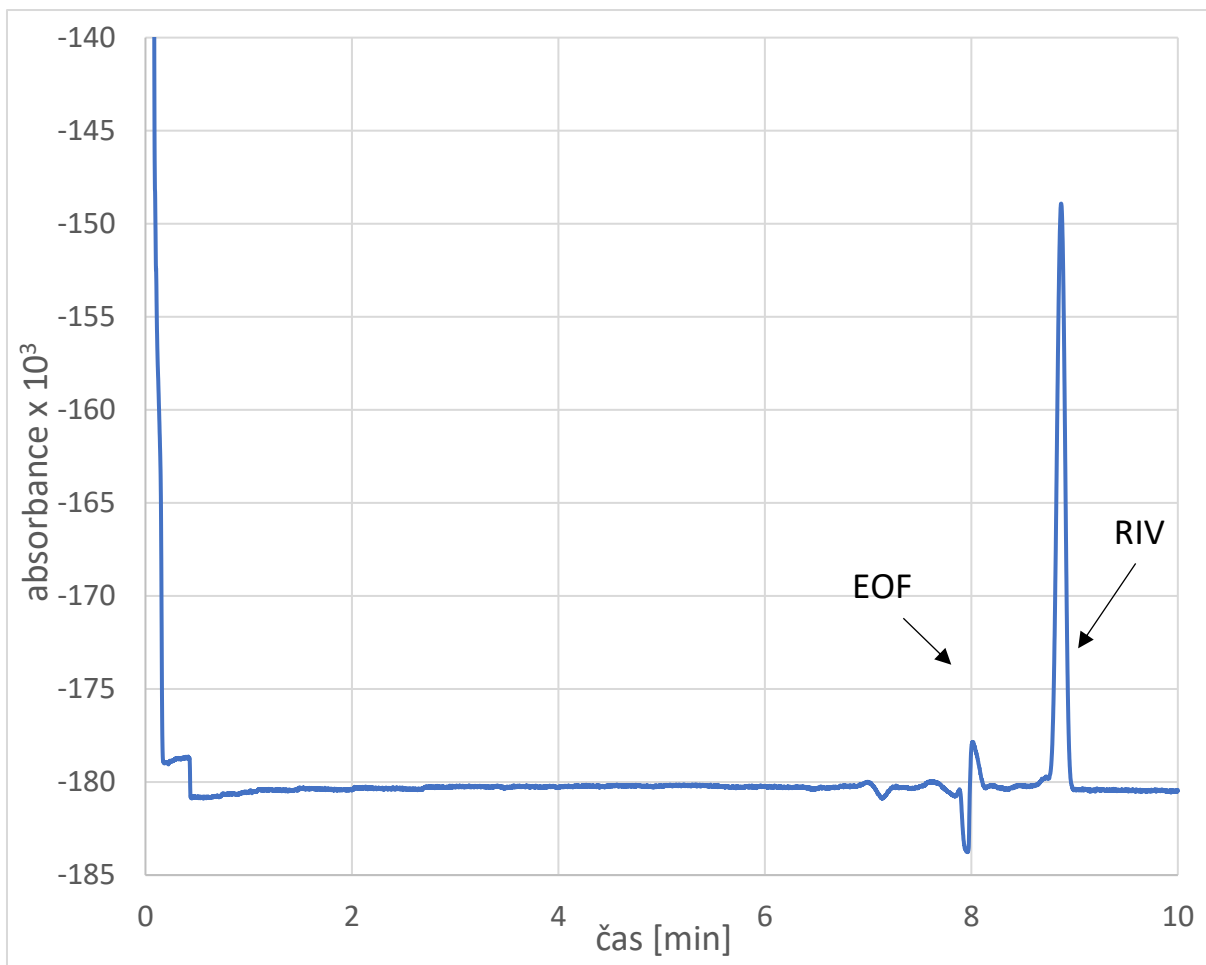
Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí

30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu$ m.

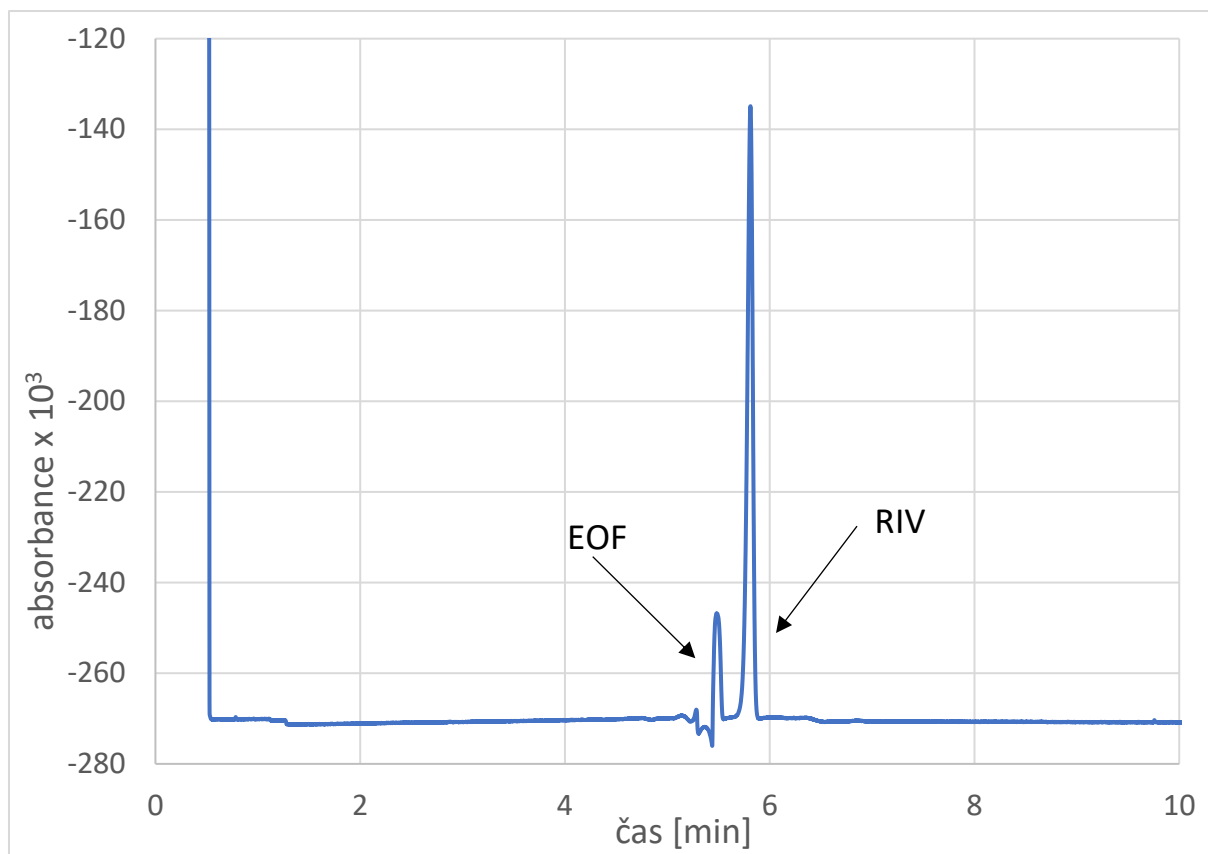




Obr. 4 – Elektroforeogram směsi RIV a thiomocoviny o  $c_g = 0,1 \text{ mg/ml}$ . Je zde vidět nedokonalé rozdělení piku RIV od piku markeru EOF. BGE byl tvořen 1M kyselinou octovou a 20mM CTAB v ACN.  $\lambda = 200 \text{ nm}$ . Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ .



Obr. 5 – Elektroforeogram směsi RIV a thiomocovinyo  $c_g = 0,1 \text{ mg/ml}$  v BGE tvořeným 1M kyselinou octovou a 40mM CTAB v ACN. Je zde vidět prodloužení doby analýzy.  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ .



Obr. 6 – Elektroforeogram RIV o  $c_g = 0,5 \text{ mg/ml}$  v BGE tvořeném 1M kyselinou octovou a 40mM CTAB v ACN. Obsah kapiláry byl mobilizován po celou dobu analýzy hydrodynamickým tlakem 0,50 kPa. Díky tomu došlo ke zkrácení času analýzy.  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Obsah kapiláry byl mobilizován tlakem 0,50 kPa po celou dobu analýzy.

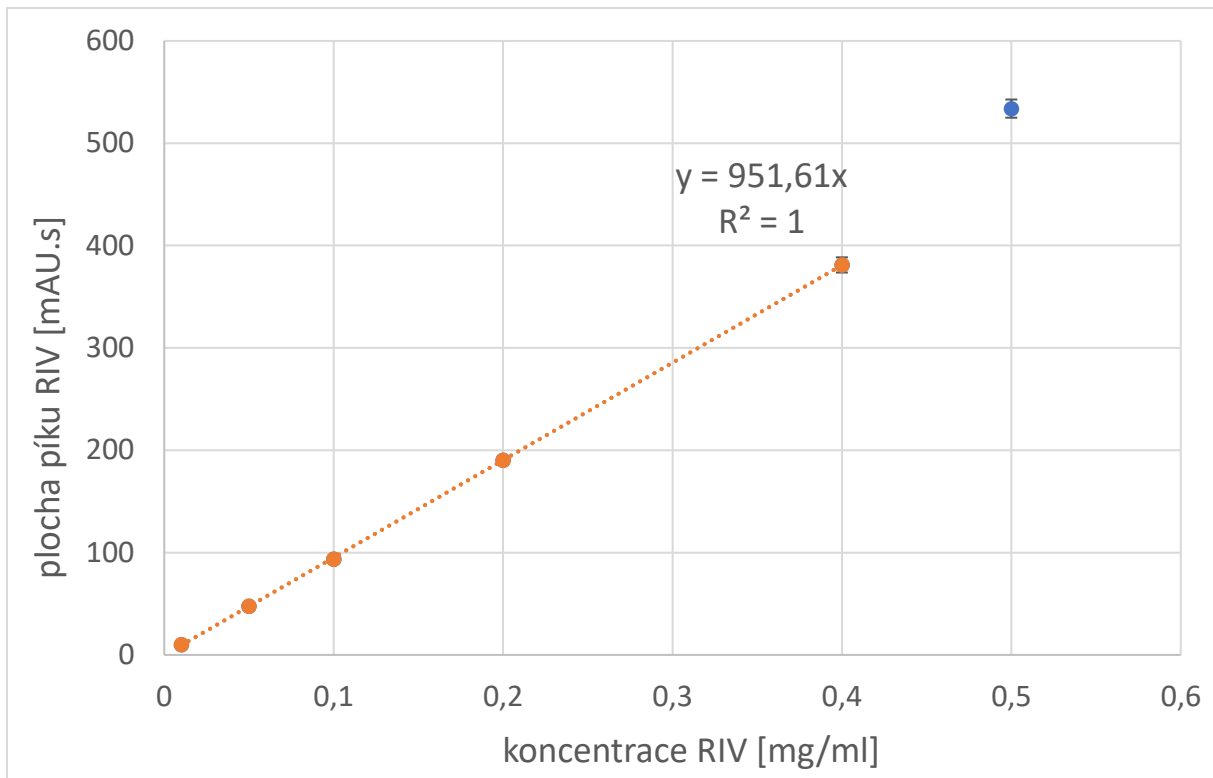
## 4.2 Kalibrační závislost

Pro měření kalibrační závislosti plochy píku RIV na jeho koncentraci ve vzorku byl použit čistý RIV, který byl laskavě poskytnut společností Zentiva. Takto získaný RIV byl rozpuštěn v ACN, aby byl získán zásobní roztok RIV o koncentraci 1 mg/ml. Bylo ověřeno jeho chování v rozmezí koncentrací 0,01 – 0,5 mg/ml. Chování RIV nevykazovalo žádné odchylky od očekávání, s rostoucí koncentrací RIV docházelo k zvětšování plochy píku RIV při  $\lambda = 254$  nm. Toto je zobrazeno v Tab. 1. Veškerá měření byla provedena 3×, získané výsledky byly podrobeny Deanovu a Dixonovu testu pro vyřazení případných odlehlých hodnot a následně byla plocha píku RIV získána jako medián.

Tab. 1 – Naměřené plochy piků RIV při analýze čistého RIV.

| Koncentrace RIV<br>[mg/ml] | Plocha píku RIV<br>[mAU.s] | Směrodatná odchylka<br>[mAU.s] | Relativní<br>směrodatná<br>odchylka [%] |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|---|
| 0,01                       | 10,2                       | 0,64                           | 6,27                                    |
| 0,05                       | 47,6                       | 1,51                           | 3,17                                    |
| 0,10                       | 93,5                       | 0,80                           | 0,86                                    |
| 0,20                       | 190,3                      | 1,41                           | 0,74                                    |
| 0,40                       | 381,1                      | 7,43                           | 1,95                                    |
| 0,50                       | 533,8                      | 8,89                           | 1,67                                    |

Grafické znázornění je zobrazeno na Obr. 7, str. 29.



Obr. 7 – Kalibrační závislost čistého RIV v rozmezí koncentrací 0,01 – 0,50 mg/ml. Jak je vidět, je tato závislost lineární v rozmezí 0,01 – 0,40mg/ml RIV.  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Jak je vidět na Obr. 7, není závislost plochy píku na koncentraci RIV lineární v celém rozsahu. Při koncentraci RIV 0,5 mg/ml dochází z neznámých důvodů ke zvýšení odezvy detektoru a hodnota velikosti píku RIV při této koncentraci tak leží mimo lineární oblast kalibrační závislosti.

Pro výpočet meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pomocí směrodatné odchylky  $s_{y,x}$  získané z analýzy rozptylu dat kalibrační závislosti byl použit následující vztah (8), kde  $y_i$  je naměřená hodnota signálu a  $Y_i$  je hodnota signálu vypočítaná z kalibrační závislosti pro danou koncentraci analytu.

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{n-2}} \quad (8)$$

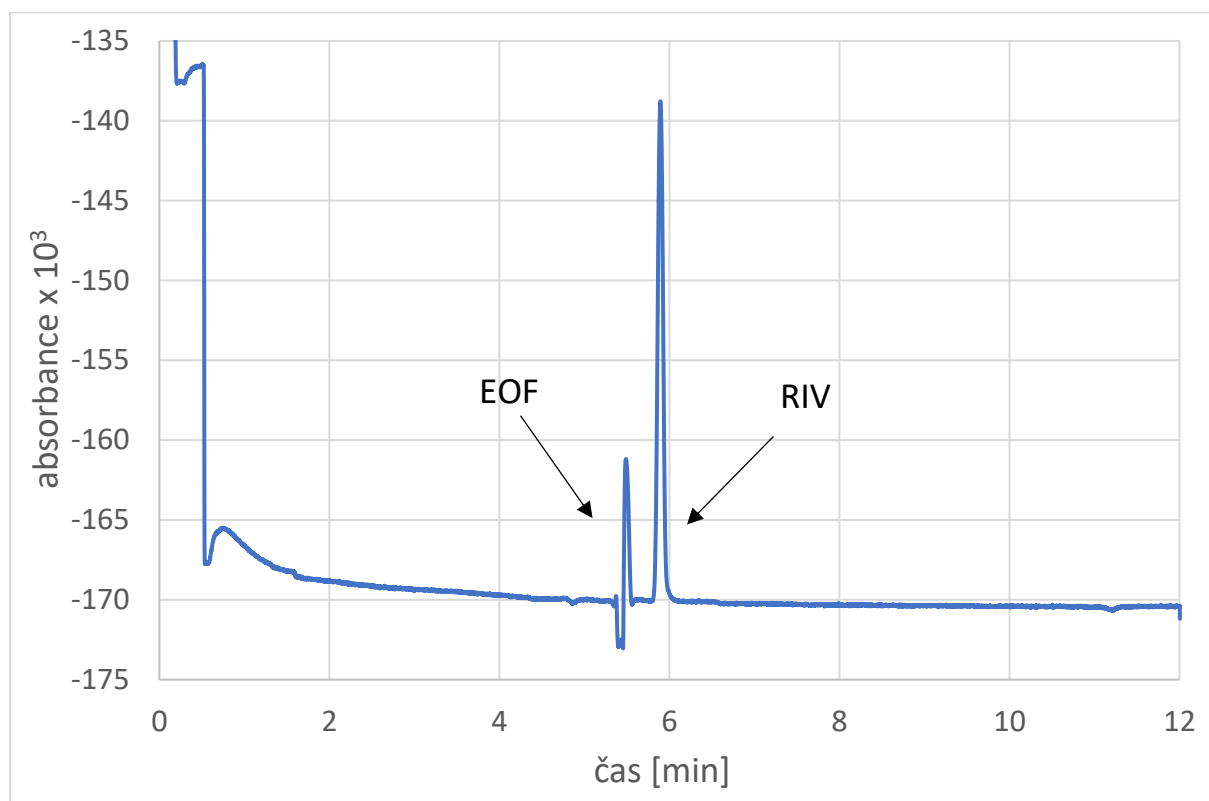
Po získání hodnoty  $s_{y,x}$  je pro získání LOD a LOQ využito vztahů (9), kde  $m$  odpovídá směrnici kalibrační závislosti RIV.

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{y,x}}{m} \quad \text{a} \quad LOQ = \frac{10 \cdot s_{y,x}}{m} \quad (9)$$

Při využití těchto vztahů dojde k získání  $LOD = 0,0056 \text{ mg/ml}$  s  $LOQ = 0,019 \text{ mg/ml}$ .

### 4.3 Selektivita při analýze tablety Xarelto

Jako další krok bylo testováno chování RIV získaného rozdrčením a rozetřením tablety Xarelto® 20 mg. Bylo zjištěno, že excipienty v tabletě nevytvářejí rušivé píky a tím byla ověřena selektivita metody. Toto je zobrazeno na Obr. 8.



Obr. 8 – Elektroforeogram RIV o  $c_g = 0,15 \text{ mg/ml}$  v BGE tvořeném 1M kyselinou octovou a 40mM CTAB v ACN. Vzorek RIV byl získán rozpuštěním rozdrčené a rozetřené tablety Xarelto® 20mg. Je zde vidět, že excipienty nemají nežádoucí vliv na podobu elektroforeogramu a nemají tedy z tohoto hlediska negativní vliv na stanovení.  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Obsah kapiláry byl mobilizován tlakem 0,50 kPa po celou dobu analýzy.

## 4.4 Opakovatelnost při analýze tablety Xarelto

Po potvrzení selektivity metody pro analýzu RIV byla testována opakovatelnost výsledků analýz provedených pomocí této metody. Vzorkem byla rozdrcená a rozetřená tableta Xarelto® 20 mg. Tableta byla po rozdrcení a rozetření rozpuštěna v ACN a takto získaný roztok byl posléze přefiltrován a naředěn na požadovanou koncentraci.

Analýza vzorku byla provedena 5×, získané výsledky byly prověřeny Deanovým a Dixonovým testem pro vyloučení případných odlehlých výsledků, což vedlo k vyloučení 1 odlehlého výsledku a následně byly hodnoty získány mediánem. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 2. Analýza proběhla při  $\lambda = 254$  nm.

*Tab. 2 – Opakovatelnost výsledků při analýze RIV v tabletě Xarelto® 20 mg. Koncentrace RIV byla 0,25 mg/ml. Hodnoty pocházejí ze 4 měření, protože jedno měření bylo vyřazeno pro jeho odlehlost. Vzorkem byl RIV o koncentraci 0,25 mg/ml v BGE tvořeném 1M kyselinou octovou a 40 mM CTAB v ACN.*

*Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu$ m. Obsah kapiláry byl mobilizován tlakem 0,50 kPa po celou dobu analýzy.*

|                         | medián | směrodatná odchylka | relativní směrodatná odchylka [%] |
|-------------------------|--------|---------------------|-----------------------------------|
| plocha píku RIV [mAU.s] | 256,2  | 9,1                 | 3,6                               |
| migrační čas RIV [min]  | 6,83   | 0,16                | 2,33                              |

V tabulce je vidět, že se plochy píků a migrační časy RIV mezi jednotlivými měřeními příliš neměnili a opakovatelnost metody je tedy na vysoké úrovni.



## 4.5 Využití metody při analýze reálného vzorku

Následně byla testována využitelnost metody pro analýzu reálného vzorku, tedy rozdrcené a rozetřené tablety Xarelto® 20 mg. Tableta byla po rozdrcení a rozetření rozpuštěna v ACN a takto získaný roztok byl posléze přefiltrován a naředěn na požadovanou koncentraci. Při testování takto vytvořeného vzorku byla pomocí kalibrační závislosti získané v kapitole 4.2 vypočtena koncentrace vzorku. Využitím takto získané hodnoty byla zjištěna výtěžnost této metody.

Analýza vzorku byla provedena 3×, získané výsledky byly prověřeny Deanovým a Dixonovým testem pro vyloučení případných odlehlých výsledků a poté byly hodnoty získány mediánem. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 3. Stejně jako v předchozím případě se jednalo o analýzu při  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

*Tab. 3 – Výtěžnost metody při analýze. Skutečná koncentrace RIV byla určena přípravou, tedy množstvím pipetovaného zásobního roztoku RIV. Hodnoty pocházejí ze 3 měření.*

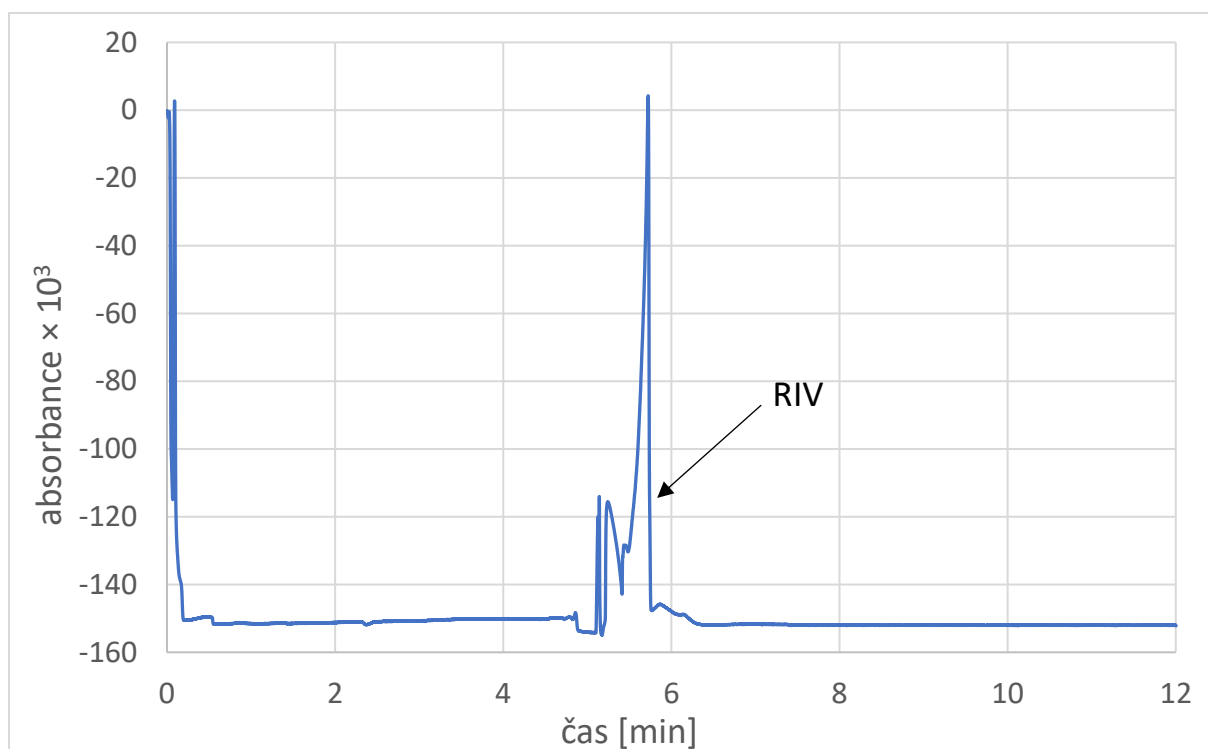
*Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Nepokrytá křemenná kapilára délky 50,0/41,5 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Obsah kapiláry byl mobilizován tlakem 0,50 kPa po celou dobu analýzy.*

|                                       | medián | směrodatná<br>odchylka | Relativní směrodatná<br>odchylka [%] |
|---------------------------------------|--------|------------------------|--------------------------------------|
| Plocha píku RIV [mAU.s]               | 132,5  | 2,5                    | 1,9                                  |
| vypočítaná koncentrace RIV<br>[mg/ml] | 0,140  | 0,003                  | 2,14                                 |
| skutečná koncentrace RIV [mg/ml]      | 0,15   | -                      | -                                    |
| Výtěžnost [%]                         | 93,23  | 1,71                   | 1,83                                 |

Jak je zde vidět, vypočítaná koncentrace RIV ve vzorku tablety se velmi blížila koncentraci skutečné. Výtěžnost metody přesahuje 90 %.

## 4.6 Využití metody při analýze vzorku krevní plazmy

Dále byla testována využitelnost metody pro stanovení obsahu RIV v krevní plazmě. Vzorek byl připraven ze zásobního roztoku RIV v ACN. Bylo zjištěno, že tato metoda není pro vzorky obsahující krevní plazmu použitelná, jelikož přítomnost plazmy znemožňuje odečet plochy a výšky píku RIV. Toto je zobrazeno na Obr. 9.



Obr. 9 – Elektroforeogram RIV o  $c_g = 0,2 \text{ mg/ml}$  v krevní plazmě. BGE je tvořen 1M kyselinou octovou a 40mM CTAB v ACN. Je zde vidět, že není možné správně odečíst velikost píku RIV.  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

Kapilára byla před měřením propláchnuta 1 min do odpadní vialky a pak 1 min do vialky s BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5,0 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vkládáno napětí 30 kV. Obsah kapiláry byl mobilizován tlakem 0,50 kPa po celou dobu analýzy.

Elektroforeogram, který je součástí Obr. 9, str 34. zobrazuje, že pík RIV nedosahuje až na základní linii a není ho tedy možné správně kvantifikovat. Z toho vyplývá nemožnost využití této metody pro stanovení RIV ve vzorcích obsahujících krevní plazmu.

Metoda je tedy využitelná pouze pro stanovení lékových forem RIV.

## 5. Závěr

Cílem této práce byl vývoj elektroforetické metody pro stanovení rivaroxabanu z důvodu typických vlastností elektroforetických metod. Těmito vlastnostmi jsou nízká cena, rychlost a šetrnost k životnímu prostředí.

Cíl se podařilo splnit, v této práci došlo k vytvoření metody schopné stanovit rivaroxaban pomocí kapilární elektroforézy v nevodném prostředí acetonitrilu. Vytvořená metoda je nízkonákladová, rychlá a šetrná k životnímu prostředí, neboť je při ní pracováno s velmi malými objemy všech používaných látek. Bylo zjištěno chování rivaroxabanu v prostředí kapilární elektroforézy v různých základních elektrolytech a různých nastaveních při optimalizaci metody. Získaná metoda je využitelná u analýz lékových forem rivaroxabanu. Pro analýzy vzorků obsahujících krevní plazmu využitelná není. Po všech optimalizacích byla výsledkem metoda založená na nevodném základním elektrolytu složeném z 1M kyseliny octové a 40 mM cetyltrimethylamoniumbromidu v acetonitrilu, využívající hydrodynamické dávkování vzorku, separační napětí 30,0 kV a mobilizaci obsahu kapiláry hydrodynamickým tlakem po celou dobu analýzy. Získaná metoda je lineární v rozsahu koncentrací rivaroxabanu 0,01 – 0,40 mg/ml, je dostatečně selektivní i pro stanovení rivaroxabanu v tabletě Xarelto® a poskytuje mez detekce 0,0056 mg/ml a mez stanovitelnosti 0,019 mg/ml. Výťažnost této metody dosahuje 93,2 %.

## 6. Literatura

- 1) Mueck, Wolfgang, Jan Stampfuss, Dagmar Kubitzka, a Michael Becka. „Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban". *Clinical Pharmacokinetics* 53, č. 1 (1. leden 2014): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0100-7>.
- 2) Roehrig, Susanne, Alexander Straub, Jens Pohlmann, Thomas Lampe, Josef Pernerstorfer, Karl-Heinz Schlemmer, Peter Reinemer, a Elisabeth Perzborn. „Discovery of the Novel Antithrombotic Agent 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor". *Journal of Medicinal Chemistry* 48, č. 19 (1. září 2005): 5900–5908. <https://doi.org/10.1021/jm050101d>.
- 3) Billoir, Paul, Virginie Barbay, Luc Marie Joly, Marielle Fresel, Marie Hélène Chrétien, a Véronique Le Cam Duchez. „Anti-Xa Oral Anticoagulant Plasma Concentration Assay in Real Life: Rivaroxaban and Apixaban Quantification in Emergency With LMWH Calibrator". *The Annals of Pharmacotherapy* 53, č. 4 (2019): 341–47. <https://doi.org/10.1177/1060028018811657>.
- 4) Lagoutte-Renosi, Jennifer, Julien Le Poupon, Alexandra Girard, Damien Montange, a Siamak Davani. „A Simple and Fast HPLC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Rivaroxaban in Human Plasma". *Journal of Chromatography B* 1100–1101 (15. listopad 2018): 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.026>.
- 5) Gouveia, Filipa, Joana Bicker, Joana Santos, Marília Rocha, Gilberto Alves, Amílcar Falcão, a Ana Fortuna. „Development, Validation and Application of a New HPLC-DAD Method for Simultaneous Quantification of Apixaban, Dabigatran, Edoxaban and Rivaroxaban in Human Plasma". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 181 (20. březen 2020): 113109. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113109>.

- 6) Alam, Prawez, Essam Ezzeldin, Muzaffar Iqbal, Md Khalid Anwer, Gamal A. E. Mostafa, Mohammed H. Alqarni, Ahmed I. Foudah, a Faiyaz Shakeel. „Ecofriendly Densitometric RP-HPTLC Method for Determination of Rivaroxaban in Nanoparticle Formulations Using Green Solvents". *RSC Advances* 10, č. 4 (8. leden 2020): 2133–40. <https://doi.org/10.1039/C9RA07825H>.
- 7) Vaghela, D., a P. Patel. „High performance thin layer chromatographic method with densitometry analysis for determination of rivaroxaban from its tablet dosage form". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (1. leden 2014): 383–86. ISSN- 0975-1491
- 8) Sekaran, Chandra Bala, Vankayalapati Hima Bind, Mittapalli Rupa Damayanthi, a Anaparthi Sireesha. „Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for the Determination of Rivaroxaban". *Der Pharma Chemica*, č. 4 2013, 5, 1-5, ISSN 0975-413X
- 9) AA, Lories. „High Performance Liquid Chromatography, TLC Densitometry, Firstderivative and First-derivative ratio spectrophotometry for de-termination of rivaroxaban and its alkaline Degradates in Bulk Powder and its Tablets". *Journal of Chromatography & Separation Techniques* 04 (1. leden 2013). <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000202>.
- 10) Süslü, İncilay, Mustafa Çelebier, a Sacide Altınöz. „Electrochemical Behaviour Investigation and Square-Wave Voltammetric Determination of Rivaroxaban in Pharmaceutical Dosage Forms". *Analytical Methods* 6, č. 23 (5. listopad 2014): 9397–9403. <https://doi.org/10.1039/C4AY01871K>.
- 11) Lunte, Susan M., a Donna M. Radzik. „Chapter 1 Principles of Capillary Electrophoresis". In *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, editoval Susan M. Lunte a Donna M. Radzik, 2:3–21. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis. Elsevier, 1996. [https://doi.org/10.1016/S1464-3456\(96\)80018-4](https://doi.org/10.1016/S1464-3456(96)80018-4).

- 12) Haglund, Herman, Arne Tiselius, a Otto Brotzen. „Zone Electrophoresis in a Glass Powder Column. Preliminary Report." *Acta Chemica Scandinavica* 4 (1950): 957–62. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0957>.
- 13) Jorgenson, James W., a Krynn DeArman. Lukacs. „Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries". *Analytical Chemistry* 53, č. 8 (1. červenec 1981): 1298–1302. <https://doi.org/10.1021/ac00231a037>.
- 14) Terabe, Shigeru., Koji. Otsuka, Kunimichi. Ichikawa, Akihiro. Tsuchiya, a Teiichi. Ando. „Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries". *Analytical Chemistry* 56, č. 1 (1. leden 1984): 111–13. <https://doi.org/10.1021/ac00265a031>.
- 15) Cohen, A. S., D. R. Najarian, A. Paulus, A. Guttman, J. A. Smith, a B. L. Karger. „Rapid Separation and Purification of Oligonucleotides by High-Performance Capillary Gel Electrophoresis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, č. 24 (prosinec 1988): 9660–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9660>.
- 16) Kilár, Ferenc, a Stellan Hjertén. „Separation of the Human Transferrin Forms by Carrier-Free High-Performance Zone Electrophoresis and Isoelectric Focusing". *Journal of Chromatography A*, First international symposium on high-performance capillary, 480 (1. leden 1989): 351–57. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84304-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84304-1).
- 17) Hořejší, V., a J. Kocourek. „Studies on Phytohemagglutinins XVIII. Affinity Electrophoresis of Phytohemagglutinins". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 336, č. 2 (14. únor 1974): 338–43. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(74\)90413-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90413-9).
- 18) Jacobson, Stephen C., Roland. Hergenroder, Lance B. Koutny, a J. Michael. Ramsey. „High-Speed Separations on a Microchip". *Analytical Chemistry* 66, č. 7 (1. duben 1994): 1114–18. <https://doi.org/10.1021/ac00079a029>.
- 19) Guttman, A., A. S. Cohen, D. N. Heiger, a Barry L. Karger. „Analytical and micropreparative ultrahigh resolution of oligonucleotides by polyacrylamide gel high-performance capillary electrophoresis". *Analytical Chemistry* 62, č. 2 (15. leden 1990): 137–41. <https://doi.org/10.1021/ac00201a010>.

- 20) Kennedy, R. T., M. D. Oates, B. R. Cooper, B. Nickerson, a J. W. Jorgenson. „Microcolumn Separations and the Analysis of Single Cells". *Science* 246, č. 4926 (6. říjen 1989): 57–63. <https://doi.org/10.1126/science.2675314>.
- 21) Walbroehl, Yvonne, a James W. Jorgenson. „On-Column UV Absorption Detector for Open Tubular Capillary Zone Electrophoresis". *Journal of Chromatography A* 315 (1. leden 1984): 135–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90731-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90731-9).
- 22) Karbaum, Astrid, a Thomas Jira. „Nonaqueous Capillary Electrophoresis: Application Possibilities and Suitability of Various Solvents for the Separation of Basic Analytes". *ELECTROPHORESIS* 20, č. 17 (1999): 3396–3401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991101\)20:17<3396::AID-ELPS3396>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991101)20:17<3396::AID-ELPS3396>3.0.CO;2-F).
- 23) Miller, Joseph L., Morteza G. Khaledi, a Damian Shea. „Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Nonaqueous Capillary Electrophoresis Using Charge-Transfer Complexation with Planar Organic Cations". *Analytical Chemistry* 69, č. 6 (1. březem 1997): 1223–29. <https://doi.org/10.1021/ac960734n>.
- 24) Wright, Paul B., a John G. Dorsey. „Silver (I)-Mediated Separations by Nonaqueous Capillary Electrophoresis: Nonaqueous Argentation Electrophoresis". *Journal of High Resolution Chromatography* 21, č. 9 (1998): 498–504. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4168\(19980901\)21:9<498::AID-JHRC498>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19980901)21:9<498::AID-JHRC498>3.0.CO;2-4).
- 25) Wang, Fang, a Morteza G. Khaledi. „Chiral Separations by Nonaqueous Capillary Electrophoresis". *Analytical Chemistry* 68, č. 19 (1. říjen 1996): 3460–67. <https://doi.org/10.1021/ac960537o>.



- 26) Bjørnsdottir, Inga, a Steen HonoréHansen. „Comparison of Separation Selectivity in Aqueous and Non-Aqueous Capillary Electrophoresis". *Journal of Chromatography A* 711, č. 2 (22. září 1995): 313–22. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)98953-T](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)98953-T).
- 27) Issaq, H. J. „A Decade of Capillary Electrophoresis". *Electrophoresis* 21, č. 10 (červen 2000): 1921–39. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20000601\)21:10<1921::AID-ELPS1921>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20000601)21:10<1921::AID-ELPS1921>3.0.CO;2-Y).