

UNIVERZITA PARDUBICE  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie

# **Antidiabetika**

Tatiana Be

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tatiana Be**  
Osobní číslo: **C16346**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Antidiabetika**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s problematikou antidiabetik.
2. Pro vybraná antidiabetika proveďte rešerši na téma jejich chemického stanovení v různých maticích.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Michaela Kovářová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č.9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 06. 2019

Tatiana Be

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce ing. Martinu Bartošovi, CSc., za vedení, zájem, ochotu, připomínky a čas, který mi věnoval během zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat ing. Michaele Kovářové, konzultantce, která mi pomáhala svými připomínkami, radami i náměty při obtížích nebo otázkách, na které jsem při práci narazila.

Velké poděkování patří celé mé rodině a blízkých přátelům, především mé mamince, za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je tvořena dvěma částmi – teoretickou a experimentální. První část je zaměřena na problematiku antidiabetik, jejich strukturu, popis, výskyt a stanovení v různých matricích. Druhá část se zabývá izotachoforetickým stanovením různých antidiabetik. Byl vybrán optimální elektrolytový systém s vedoucím elektrolytem o pH 5 tvořeným 0,01 M octanem draselným a kyselinou octovou k úpravě pH. Jako koncový elektrolyt byla využita 0,01 M kyselina octová. Tento postup stanovení antidiabetik byl použit pro stanovení metforminu v léčivých přípravcích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Antidiabetika, izotachoforéza, stanovení, metformin, buformin, phenformin

## **TITLE**

Antidiabetic drugs

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis is consisted of two parts - theoretical and experimental. The first part is focused on antidiabetic drugs, their structure, description, occurrence and determination in various matrices. The second part deals with isotachophoretic determination of various antidiabetic drugs. An optimal electrolyte system with 0.01 M potassium acetate and acetic acid (pH 5.0) as leading electrolyte and 0.01 M acetic acid as terminating electrolyte was selected. Validated procedure was used to determine metformin in pharmaceutical products.

## **KEYWORDS**

Antidiabetic drugs, isotachopheresis, determination, metformin, buformin, phenformin

# OBSAH

Seznam zkratk	
Seznam obrázků	
Seznam grafů	
Seznam tabulek	
ÚVOD	13
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Diabetes mellitus	14
1.2 Léčba diabetu	15
1.2.1 Biguanidy	16
1.2.2 Deriváty sulfonylmočoviny	16
1.2.3 Meglitinidy	18
1.2.4 Inhibitory $\alpha$ -glukosidázy	18
1.2.5 Thiazolidindiony	19
1.3 Přehled metod pro stanovení perorálních antidiabetik	20
1.3.1 Stanovení kapalinovou chromatografií	20
1.3.2 Stanovení tenkovrstvou chromatografií	23
1.3.3 Stanovení kapilární elektroforézou	25
1.4 Kapilární elektroforéza	28
1.4.1 Historie kapilární elektroforézy	28
1.4.2 Charakteristika kapilární elektroforézy	28
1.4.3 Elektroforetická mobilita	29
1.4.4 Elektroosmotický tok	30
1.4.5 Migrační čas	31
1.4.6 Jouleovo teplo	32
1.4.7 Účinnost a selektivita	32
1.5 Varianty kapilární elektroforézy	33
1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza	33
1.5.2 Micelární elektrokinetická chromatografie	33
1.5.3 Kapilární gelová elektroforéza	34
1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace	34
1.5.5 Kapilární izotachoforéza	35

1.6 Instrumentace	35
1.6.1 Zdroj vysokého napětí	36
1.6.2 Detektor	36
1.6.3 Dávkování	37
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1 Použité chemikále	38
2.2 Přístroje a zařízení	38
2.2.1 Elektroforetický analyzátor EA 102	38
2.3 Elektrolytové systémy	38
2.4 Příprava roztoků	39
2.4.1 Příprava standardních roztoků pro volbu elektrolytového systému	39
2.4.2 Příprava kalibračních roztoků	39
2.4.3 Příprava roztoků vzorků	39
2.5 Reálné vzorky	39
2.6 Zpracování experimentálních dat	40
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
3.1 Volba elektrolytového systému	41
3.2 Kalibrační závislost	42
3.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti	43
3.4 Opakovatelnost	43
3.5 Výtěžnost	44
3.6 Analýza reálných vzorků	44
ZÁVĚR	48
LITERATURA	49
PŘÍLOHY	53



## Seznam zkratek

ACE	acetohexamid
CAD	aerosolový detektor nabitých částic
CE	kapilární elektroforéza
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EOF	elektroosmotický tok
GLB	glibenklamid
GLC	gliklazid
GLM	glimepirid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHL	chlorpropamid
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
PPAR- $\gamma$	receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOL	tolbutamid
UV	ultrafialová oblast

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Odhad počtu lidí s cukrovkou v roce 2017 v jednotlivých zemích.	14
Obrázek 2: Strukturní vzorce biguanidů.	16
Obrázek 3: Strukturní vzorce některých derivátů sulfonylmočoviny.	17
Obrázek 4: Strukturní vzorce některých meglitinidů.	18
Obrázek 5: Strukturní vzorce některých inhibitorů $\alpha$ -glukosidázy.	19
Obrázek 6: Strukturní vzorce některých derivátů thiazolidindionů.	19
Obrázek 7: HPLC chromatogramy roztoku standardů při 230 nm (A) a 247 nm (B) a UV spektra detekovaných látek (C).	20
Obrázek 8: TLC chromatogram TOL (1), ACE (2), CHL (3), GLC (4), GLB (5), GLM (6) a směsi standardních roztoků (M).	24
Obrázek 9: Kapilární elektroferogram směsi čtyř syntetických antidiabetik: acetohexamid (ACE), chlorpropamid (CHL), glibenklamid (GLI) a tolbutamid (TOL).	25
Obrázek 10: CE analýza eluátu methanolu s 3 % kyseliny octové obsahujícího metformin (signál při 1,75 min), fenformin (signál při 2,70 min) a teofylin s kofeinem (signál při 8,9 až 9,2 min).	27
Obrázek 11: CE analýza eluátu methanolu s 3 % kyseliny octové obsahujícího metforminu (signál při 1,78 min) a fenforminu (signál při 2,50 min) a glibenklamid (signál při 6,43 min).	27
Obrázek 12: Základní instrumentace CE.	29
Obrázek 13: Rozdělení nábojů v kapiláře.	30
Obrázek 14: Schema zařízení pro kapilární elektroforézu.	35
Obrázek 15: Izotachofereogramy standardních roztoků – vlevo vedoucí elektrolyt pH 4,5, vpravo pH 5,0.	42

## Seznam grafů

Graf 1: Závislosti intenzity signálu koncového elektrolytu (horní křivka), phenforminu, buforminu a metforminu (dolní křivka) na pH vedoucího elektrolytu.	41
Graf 2: Vliv pH vedoucího elektrolytu na délku zóny phenforminu (horní křivka), buforminu a metforminu (dolní křivka).	42
Graf 3: Kalibrační závislosti pro metformin (horní křivka), buformin a phenformin (dolní křivka).	43
Graf 4: Naměřené obsahy metforminu a obsahy deklarované výrobcem v přípravku přípravcích.	45
Graf 5: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídávku v přípravku Siofor 500.	45
Graf 6: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídávku v přípravku Siofor 850.	46
Graf 7: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídávku v přípravku Siofor 1000.	46
Graf 8: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídávku v přípravku Stadamet 850.	47
Graf 9: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídávku v přípravku Glucophage XR 500 mg.	47

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Klasifikace perorálních antidiabetik.	15
Tabulka 2: Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ).	21
Tabulka 3: Hodnoty meze detekce (LOD) pro UV, CAD a ELSD detektor.	21
Tabulka 4: Hodnoty meze detekce (LOD) pro UV detektor.	22
Tabulka 5: Hodnoty meze detekce (LOD) při TLC stanovení směsi antidiabetik. Mobilní fáze: n-butylacetát s 0,4% kyselinou mravenčí.	24
Tabulka 6: Metody detekce v kapilární elektroforéze.	36
Tabulka 7: Seznam použitých chemikálií.	38
Tabulka 8: Opakovatelnost metody pro metformin, buformin a phenformin.	44
Tabulka 9: Výtěžnost metody pro metformin, buformin a phenformin.	44
Tabulka 10: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 500.	53
Tabulka 11: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 850.	53
Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 1000.	53
Tabulka 13: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Stadamet 850.	53
Tabulka 14: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Glucophage XR 500 mg.	53
Tabulka 15: pH vedoucího elektrolytu.	54
Tabulka 16: Kalibrační závislost.	55
Tabulka 17: Analýza reálných vzorků.	56

# ÚVOD

Diabetes mellitus, česky úplavice cukrová neboli cukrovka, je jedním z nejdůležitějších a nejčastějších zdravotních problémů, který se týká lidí na celém světě. Nikdo není imunní vůči této nemoci - ani muži, ani ženy ani děti. Aktuálnost hledání účinných léků je způsobená rychlým a velkým nárůstem počtu pacientů s cukrovkou a jejich předčasnou smrtí, protože tato choroba nezůstává neměnná, vyvíjí se každý den.

Diabetes je endokrinní onemocnění charakterizované chronickým zvýšením hladiny cukru v krvi (cukr je hlavním zdrojem energie v organismu) v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku pankreatického hormonu inzulínu.

Historie diabetu začíná v dávných dobách. Tehdy lidé uměli rozpoznat tuto nemoc, ale neznali žádný způsob, jak tuto nemoc léčit, a kvůli tomu byli pacienti odsouzeni k předčasné smrti. Byly známy tři hlavní příznaky: časté vylučování moči, intenzivní žízeň a náhlá ztráta hmotnosti. Přítomnost těchto příznaků naznačovala, že příčinou onemocnění by mohla být porucha ledvin nebo gastrointestinálního traktu. V době antiky bylo zjištěno, že moč diabetiků má sladkou chuť způsobenou přítomností cukru. Tehdy se tato choroba stala známou pod názvem cukrovka.

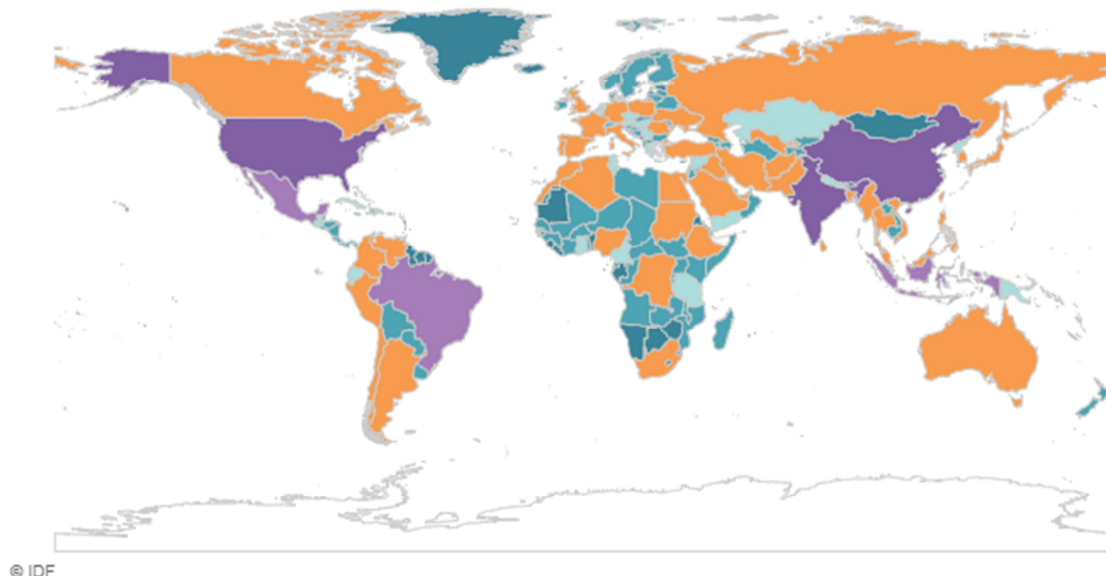
V současnosti je diabetes mellitus nejrozšířenější metabolickou chorobou. V roce 2015 se počet registrovaných diabetiků v České republice pohyboval okolo 858 tisíc, dnešní odhady hovoří o jednom milionu a více. Z uvedených 858 tisíc nemocných mělo přibližně 58 tisíc diagnózu diabetes mellitus 1. typu. Ten je charakterizován absolutním nedostatkem inzulínu způsobeným destrukcí  $\beta$ -buněk pankreatu a člověk s tímto onemocněním je celoživotně závislý na podávání inzulínu. Zbýlých 786 tisíc nemocných mělo diabetes mellitus 2. typu, u kterého se projevují dvě poruchy. První je snížená tvorba inzulínu a druhá je ztráta citlivosti tkání na inzulín. Míra těchto dvou poruch u nemocného se může lišit případ od případu.<sup>1</sup>

Cukrovka je nevyléčitelné onemocnění, jediná léčba spočívá ve zmírnění jejích symptomů.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Diabetes mellitus

Výskyt onemocnění diabetem výrazně překonal očekávané parametry a v současnosti je incidence diabetu charakterizována Mezinárodní diabetickou federací jako epidemie. Na obrázku je znázorněná mapa světa, kde procento lidí trpících diabetem se zvyšuje směrem od tmavě modré barvy přes oranžovou po tmavě fialovou (Obr. 1).



Obrázek 1: Odhad počtu lidí s cukrovkou v roce 2017 v jednotlivých zemích.<sup>2</sup>

U diabetu 2. typu existují současně dvě hlavní poruchy: inzulinová rezistence a dysfunkce  $\beta$ -buněk. Inzulinová rezistence je snížení citlivosti buněk závislých na inzulinu na působení inzulinu, následované porušením metabolismu glukózy.  $\beta$ -buňky produkují hormon inzulín jako odpověď na zvýšení koncentrace glukózy v krvi. Pokud  $\beta$ -buňky nejsou schopny udržet dostatečně vysokou úroveň sekrece inzulinu k překonání inzulinové rezistence, vyvine se hyperglykemie. To je typické jak pro pacienty s metabolickým syndromem, tak pro pacienty s normální tělesnou hmotností.<sup>3</sup>

Cukrovka způsobuje různé další poruchy. Akutní metabolické komplikace jsou hypoglykemický šok a diabetická ketoacidóza (vysoká hladina ketolátek). Komplikace projevující se s pokročilým stádiem diabetu jsou makro- a mikroangiopatie (poškození velkých a malých cév), které mohou vést až k srdečnímu infarktu a cerebrovaskulární poruchám. Rovněž se může vyvinout retinopatie (nezánětlivé onemocnění oční sítnice), popř. diabetická katarakta (šedý zákal), která je způsobena akumulací sorbitolu v oční čočce.<sup>4</sup>

## 1.2 Léčba diabetu

Léčení diabetu 2. typu je založeno na změně životního stylu pacienta. Dieta a cvičení u pacientů jsou cennými nástroji v boji proti vysokým hladinám cukru v krvi, stejně jako při udržování fyzického a duševního zdraví. Pokud po této změně v životě zůstane hladina glukózy v krvi příliš vysoká, předepisují se perorální antidiabetika. Jako konečné řešení může být podáván inzulin.

Evropská asociace pro studium diabetu (EASD) a Americká diabetologická asociace (ADA) doporučuje, aby se ve většině případů v první fázi léčby diabetu 2. typu kromě změn životního stylu podávala antidiabetika na bázi metforminu. Pokud nebudou dosaženy cíle glykemické kontroly, mohou být ve druhé fázi léčby přidány další léky (přípravky sulfonylmočoviny, thiazolidindionů). V třetí fázi je možná kombinace třech perorálních léků. Kombinace inzulinové terapie s perorálními hypoglykemickými léky, jako jsou biguanidy a thiazolidindiony, vedla k několika pozitivním účinkům v některých studiích: minimalizace přírůstku hmotnosti a snížení denních potřeb inzulinu při zlepšování metabolické kontroly (Tab. 1).<sup>3</sup>

Tabulka 1: Klasifikace perorálních antidiabetik.<sup>5,6</sup>

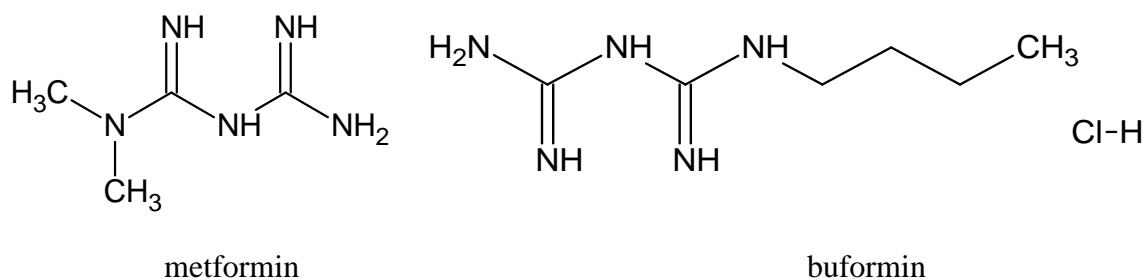
Skupina	Účinné látky
1. Deriváty biguanidů	metformin, buformin
2. Látky zvyšující sekreci inzulinu	
2.1 Deriváty sulfonylmočoviny	tolbutamid, glibenclamid, gliclazid, glipizid, glimepirid, gliquidon
2.2 Meglitinidy	repaglinid, nateglinid
3. Inhibitory $\alpha$ -glukosidázy	acarbóza, miglitol
4. Deriváty thiazolidindionů = glitazony = agonisté PPAR- $\gamma$	rosiglitazon, pioglitazon

Jednou z nevýhod inzulinových přípravků je nemožnost enterálního užívání. V tomto ohledu se po dlouhou dobu provádějí pokusy o nalezení hypoglykemických látek, které jsou účinné při perorálním podání. V současnosti jsou tyto léky široce používány u diabetes mellitus 2. typu. Mají jiné mechanismy účinku než inzulin a jsou rozděleny do několika tříd.

### 1.2.1 Biguanidy

Do skupiny biguanidů patří metformin a buformin, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku 2. Metformin (obsažený v léčivých přípravcích s názvy Glukofag, Gliformin, Siofor) je v dnešní době jediná látka, která je zástupcem této skupiny antidiabetik. Hypoglykemický účinek metforminu není důsledkem zvýšení sekrece inzulínu  $\beta$ -buněk pankreatu. Podrobný mechanismus účinku není zcela jasný, ale je známo, že metformin snižuje absorpci cukrů v střevě a produkci glukózy, snižuje hladinu glukagonu v krvi, zvyšuje citlivost na inzulín, snižuje hladinu cholesterolu a triglyceridů v krevní plazmě a snižuje chuť k jídlu a tělesnou hmotnost. Klinicky je používán v kombinaci s dietou s vysokým obsahem bílkovin a s nízkým obsahem sacharidů k obnovení normálních menstruačních cyklů u dospívajících žen a je zařazen do klinických studií s HIV k posouzení jeho účinnosti při léčbě metabolických poruch spojených se syndromem HIV lipodystrofie.

Hlavními nežádoucími účinky metforminu jsou nevolnost, zvracení, průjem, plynatost, bolest žaludku. Kromě toho se může také objevit laktátová acidóza. Její výskyt je důsledkem skutečnosti, že metformin stimuluje anaerobní glykolýzu, jejímž konečným produktem je kyselina mléčná. Symptomy laktátové acidózy jsou slabost, ospalost, bolesti svalů, dýchavičnost a hypotermie.<sup>7,8,9</sup>



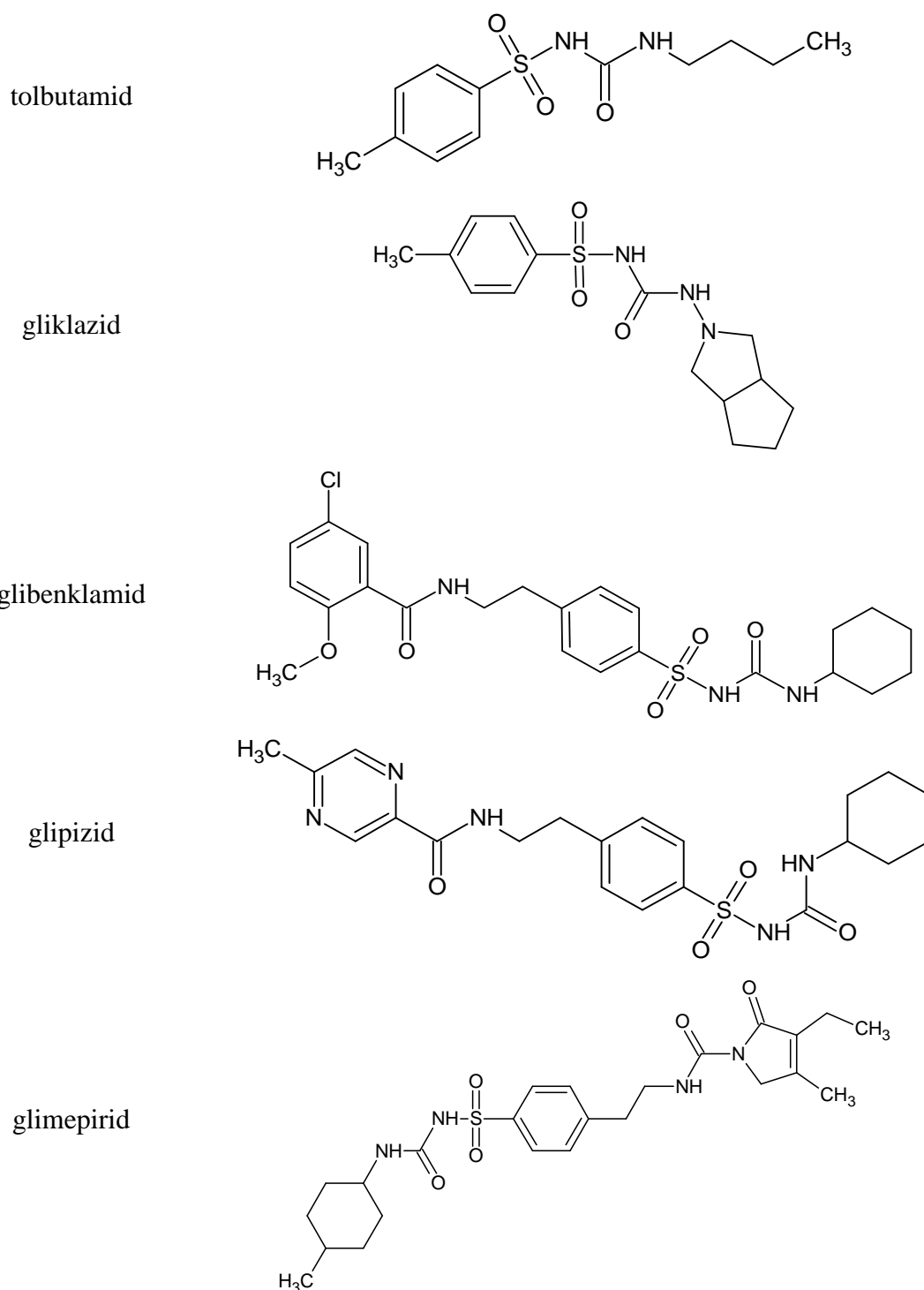
Obrázek 2: Strukturní vzorce biguanidů.

### 1.2.2 Deriváty sulfonylmočoviny

Deriváty sulfonylmočoviny jsou nejčastěji používaná skupina syntetických antidiabetik (Obr. 3). Hlavní složkou hypoglykemického účinku je schopnost těchto látek zvyšovat sekreci inzulínu stimulací  $\beta$ -buněk pankreatu. Tento účinek léčiv je výsledkem blokády adenosintrifosát-dependentních draslíkových kanálů  $\beta$ -buněk. Mimo to deriváty sulfonylmočoviny obnovují citlivost  $\beta$ -buněk na glukózu, zvyšují hustotu inzulínových receptorů v tkáních závislých na inzulínu a zvyšují citlivost receptorů na inzulín a zlepšují transdukci postreceptorového signálu.



Skupina léků na bázi sulfonfylmočoviny je obecně dobře snášena, ale má řadu dalších farmakokinetických a farmakodynamických vlastností. Za prvé, deriváty sulfonfylmočoviny zvyšují chuť k jídlu. Za druhé, deriváty sulfonfylmočoviny se vážou na plazmatické proteiny, proto mohou vstupovat do farmakokinetické interakce s nesteroidními protizánětlivými léky, nepřímými antikoagulancii atd. Za třetí, tyto léky

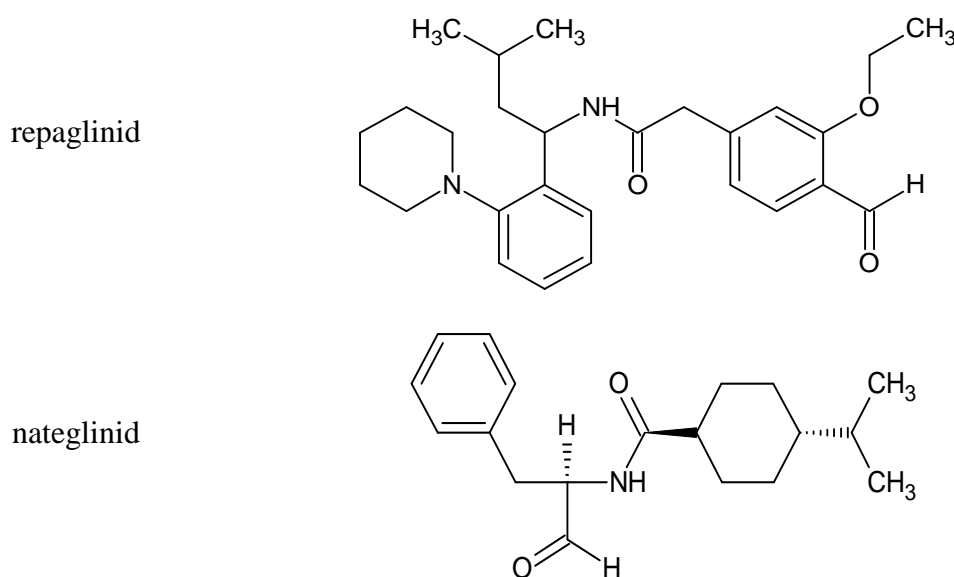


Obrázek 3: Strukturní vzorce některých derivátů sulfonfylmočoviny.

pronikají do placentární bariéry, což je třeba vzít v úvahu při předepisování během těhotenství. Za čtvrté, deriváty sulfonylmočoviny nemají dostatečnou selektivitu pro draslíkové kanály  $\beta$ -buněk a mohou proto blokovat draslíkové kanály kardiomyocytů a angiomyocytů, což může vést ke zvýšení úmrtnosti na choroby kardiovaskulárního systému. Není pravidlem, že hypoglykemický účinek se zvyšuje současně s nárůstem dávky těchto léčiv. Kromě toho při dlouhodobém užívání vysokých dávek léčiva dochází k nepříjemnému snížení citlivosti receptorů sulfonylmočoviny s a v důsledku toho ke snížení účinnosti samotného léčiva.<sup>10,11,12</sup>

### 1.2.3 Meglitinidy

Meglitinidy jsou úplně nová skupina látek, strukturně odlišná od derivátů sulfonylmočoviny (Obr. 4). Vážou se na sulfonylmočovinový receptor a jejich účinek - zvýšení sekrece inzulínu - začíná rychleji a má pozitivní vliv na postprandiální hyperglykémii. Meglitinidy nejsou vhodné pro pacienty se závažným jaterním nebo renálním selháním. Nejběžnější vedlejší účinky jsou hypoglykémie, nevolnost, průjem, bolesti hlavy, bolesti v kloubech nebo zádech a další.<sup>6</sup>



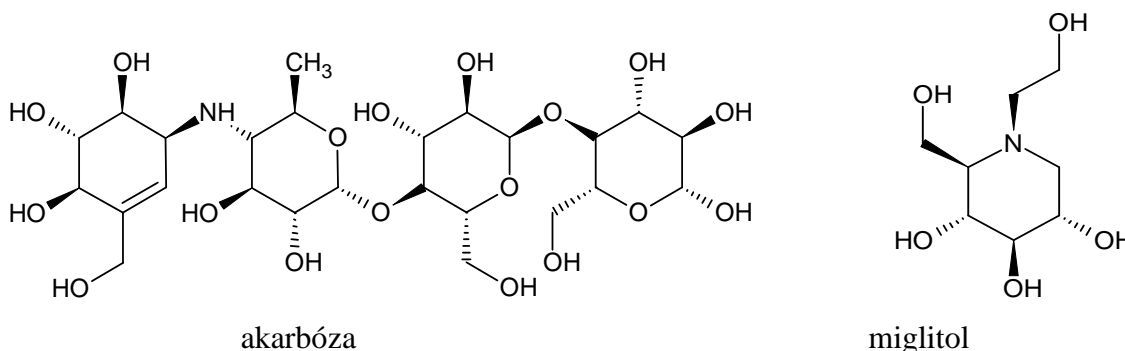
Obrázek 4: Strukturní vzorce některých meglitinidů.

### 1.2.4 Inhibitory $\alpha$ -glukosidázy

Inhibitory  $\alpha$ -glukosidázy jsou látky, které blokují  $\alpha$ -glukosidázu ve střevě a zpomalují rozklad polysacharidů a oligosacharidů (Obr. 5). V důsledku inhibice tohoto enzymu se

snižuje postprandiální růst glykémie (objevuje se po jídle), ale také se vyvíjejí typické vedlejší účinky. Nejběžnější látkou z této skupiny léčiv je akarbóza, pak miglitol.<sup>11</sup>

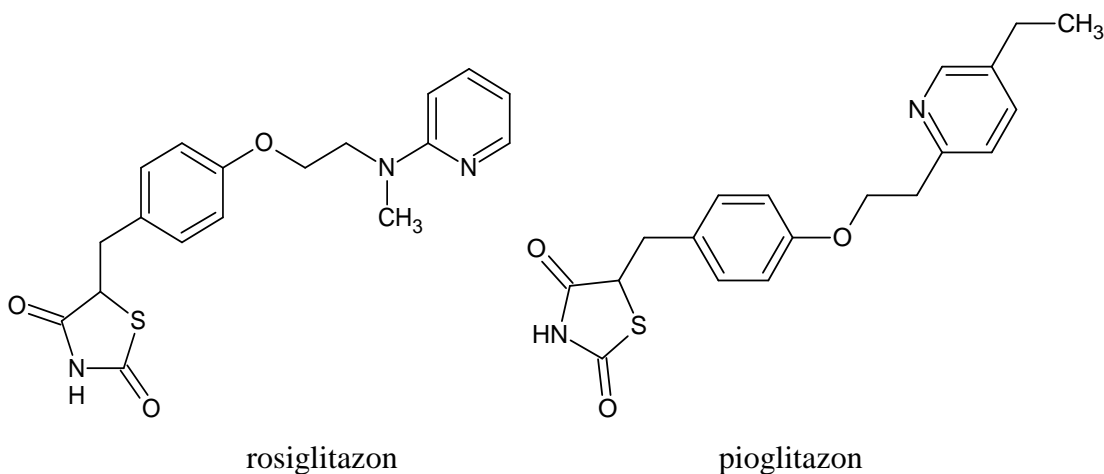
Hlavním vedlejším účinkem je meteorismus (plynatost), zejména při vysokém příjmu sacharidů. Inhibitory intestinální  $\alpha$ -glukosidázy se běžně používají v kombinační terapii s deriváty sulfonylmočoviny.<sup>6</sup>



Obrázek 5: Strukturální vzorce některých inhibitorů  $\alpha$ -glukosidázy.

### 1.2.5 Thiazolidindiony

Jedná se o zcela novou skupinu léků (Obr. 6). Thiazolidindiony (glitazony) mají vliv na expresi genů jak přímo aktivních v procesu aktivace receptorů inzulínu, tak nepřímo ovlivňujících metabolismus glukózy v játrech a kosterních svalech metabolismem mastných kyselin nebo hladin určitých hormonů (leptinu). Thiazolidindiony tedy snižují inzulínovou rezistenci a hyperglykémii (jak po jídle, tak nalačno). Thiazolidindiony jsou kontraindikovány u pacientů se závažným srdečním selháním a selháním jater. Mezi nejběžnější vedlejší účinky patří bolesti hlavy, zad, zvýšení tělesné hmotnosti a anémie.<sup>6</sup>



Obrázek 6: Strukturální vzorce některých derivátů thiazolidindionů.

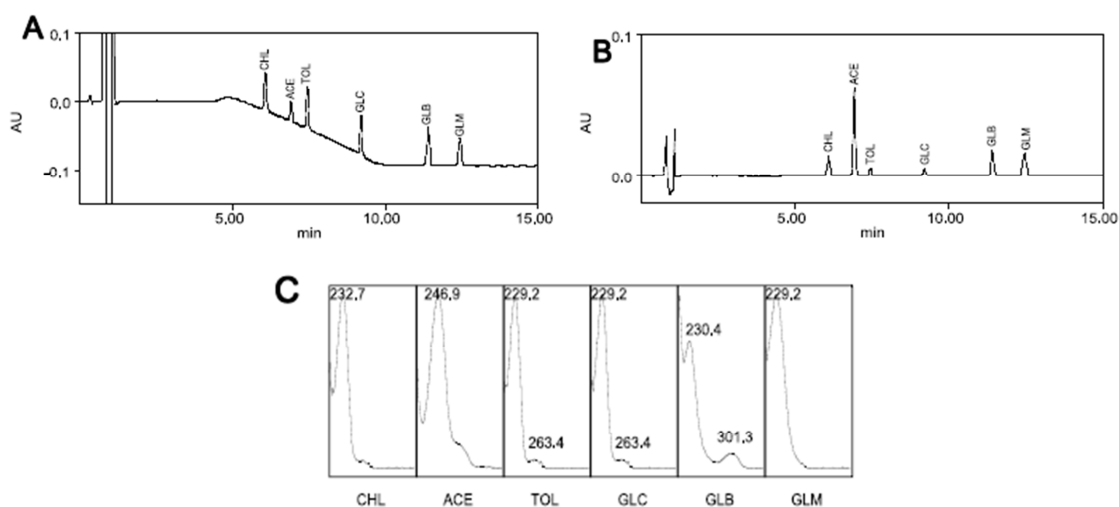
## 1.3 Metody pro stanovení perorálních antidiabetik

Ve speciální literatuře je nejběžněji používanou separační metodou kapalinová chromatografie, pak tenkovrstvá chromatografie a nakonec kapilární elektroforéza.

### 1.3.1 Stanovení kapalinovou chromatografií

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejvíce rozšířených separačních metod. Vyznačuje se vysokou účinností, dobrou opakovatelností a spolehlivostí. Tato metoda je vhodná pro separaci ve vodě nerozpustných, méně těkavých kapalin a pevných látek rozpustných v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách.<sup>13</sup>

Deriváty sulfonylmočoviny (glibenklamid, gliklazid, glipizid, glimepirid a tolbutamid) byly separovány pomocí kolony Cadenza CD-C18. Pro snímání spekter byl použit fotometrický detektor s diodovým polem. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem (fáze A) a 0,01 M octanem amonným upraveným na pH 4,0 kyselinou octovou (fáze B). Na začátku pokusu se mobilní fáze obsahovala 30 % složky A a 70 % složky B. Po 5 minutách byl obsah složky A lineárně zvýšen na 50 % a byl 7 minut udržován. Záznam chromatografických píků byl prováděn při 230 nm a 247 nm (Obr. 7). Standardní roztok (A, B) obsahoval 10 µg/ml tolbutamidu, acetoexamidu, chlorpropamidu, gliklazidu, glibenklamidu a glimepiridu. Dávkováno bylo 10 µl roztoku. Pro každý detekovaný pík, odpovídající vždy jedné složce standardního roztoku, bylo změřeno UV spectrum v rozmezí od 210 do 360 nm. Byly stanoveny hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) (Tab. 2). Sledování chromatografických píků bylo prováděno při



Obrázek 7: HPLC chromatogramy roztoku standardů při 230 nm (A) a 247 nm (B) a UV spektra detekovaných látek (C).<sup>14</sup>

230 nm pro chlorpropamid (CHL), tolbutamid (TOL), gliklazid (GLC), glibenklamid (GLB), glimepirid (GLM) a při 247 nm pro acetoexamid (ACE).<sup>14</sup>

Tabulka 2: Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ).<sup>14</sup>

<b>Derivát</b>	<b>LOD [ng/10µl]</b>	<b>LOQ [ng/10µl]</b>
chlorpropamid	1,2	3,9
acetoexamid	1,1	3,7
tolbutamid	1,8	6,0
gliklazid	1,8	6,1
glibenklamid	0,8	2,5
glimepirid	0,9	2,9

Poměrně nedávno se ve spojení s HPLC rozšířila nová metoda detekce, tzv. CAD (Charged Aerosol Detection). Jedná se o univerzální detektor pracující na principu detekce kladně nabitých částic, které mají rozdílnou pohyblivost (hmotnost). Pomocí tohoto a dalších detektorů tj. UV a ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) byly stanoveny čtyři druhy antidiabetických léčiv, glipizid, gliklazid, glibenklamid a glimepirid (Tab. 3). Všechny experimenty byly prováděny na koloně C18 s vodou a acetonitrilem jako mobilní fází, sestávající z 35 % složky A (90 % voda + 0,1 % kyselina mravenčí + 10 % acetonitril) a 65 % složky B (90 % acetonitril + 10 % voda). Dávkováno bylo 10 µl roztoku. Bylo zjištěno, že CAD vykazovala nejvyšší citlivost s LOD přibližně 25, 16, 48 a 21 ng pro glipizid, gliklazid, glibenclamid a glimepirid. Hodnoty LOD pro CAD byly podobné hodnotám UV detekce, ale byly mnohem lepší než u ELSD. Ukázalo se, že CAD je nejcitlivější druh detekce pro analýzu zmíněných antidiabetik. Díky svému vynikajícímu výkonu, snadnému použití, poměrně nízkým nákladům a zejména jednotným odezvám má CAD potenciál být univerzálním detektorem první volby pro stanovení antidiabetických léčiv a jeví se nadějně také pro další použití ve farmaceutické analýze.<sup>15</sup>

Tabulka 3: Hodnoty meze detekce (LOD) pro UV, CAD a ELSD detektor.<sup>15</sup>

<b>Derivát</b>	<b>UV [ng/10µl]</b>	<b>CAD [ng/10µl]</b>	<b>ELSD [ng/10µl]</b>
glipizid	36	25	73
gliklazid	47	16	76
glibenklamid	45	48	76
glimepirid	27	21	77

V další práci byla použita metoda HPLC pro současné stanovení metforminu a glipizidu, gliklazidu, glibenklamidu nebo glimeperidu v plazmě (Tab. 4). Současné stanovení těchto analytů je důležité pro rutinní monitorování diabetických pacientů, kteří užívají kombinované léky, a pro farmakokinetické studium kombinovaných lékových forem. Separace byla provedena za použití analytické kolony C18 a UV detektoru. Mobilní fáze byla složena z 2 mM dodecylsulfátu sodného, acetonitrilu (37,5 %) a 0,0125 M dihydrogenfosforečnanu draselného (62,5 %). Pro metodu 1 (kombinace metforminu a glibenklamidu nebo glimepiridu) bylo pH upraveno na 7,3 pomocí NaOH a pro metodu 2 (kombinace metforminu a glipizidu nebo gliklazidu) bylo pH upraveno na 5,3 pomocí HCl. Na základě UV spektra analytů byla vlnová délka detektoru nastavena na 225 nm.<sup>16</sup>

Tabulka 4: Hodnoty meze detekce (LOD) pro UV detektor.<sup>16</sup>

Derivát	LOD [ng/ml]	LOQ[ng/ml]
metformin (metoda 1)	3,0	5,0
metformin (metoda 2)	9,9	16,5
glibenklamid	4,0	7,0
glimepirid	4,5	7,5
glipizid	4,5	7,5
gliklazid	13,5	22,5

V práci z roku 2014 byla provedena kinetická studie degradace dvou perorálních antidiabetik, gliklazidu a glipizidu, s použitím nové HPLC metody, která byla validována z hlediska selektivity, citlivosti, linearity a přesnosti. V silně kyselém a alkalickém prostředí byl gliklazid téměř úplně degradován, zatímco glipizid vykazoval mnohem vyšší stabilitu. Meze detekce gliklazidu a glipizidu byly 3,9 µg/ml a 4,5 µg/ml.

Tato studie ukázala, že během rozkladu gliklazidu a glipizidu v silně kyselém a alkalickém prostředí byly možné různé cesty degradace. Pouze jeden z produktů degradace (v případě glipizidu) byl identifikován jako nečistota uvedená v 7. vydání Evropského lékopisu. Byly porovnávány účinky pH a teploty na stabilitu obou léčiv, z analýz bylo zjištěno, že glipizid je více rezistentní vůči velmi vysokému nebo velmi nízkému pH a má tedy vyšší stabilitu v prostředí s diferencovaným pH ve srovnání s gliklazidem. Současně rychlosti rozkladu obou léčiv byly nejmenší při pH 8,3.<sup>17</sup>

Od roku 1999 patří inzulín do seznamu zakázaných látek Mezinárodního olympijského výboru a Světové antidopingové agentury. Výjimku tvoří sportovci trpící inzulín-dependentním diabetem, v ostatních případech není podávání inzulínu dovoleno. Terapeutika, vyvinutá pro léčbu diabetes mellitus nezávislého na inzulínu, působí jako uvolňující faktory endogenně produkovaného inzulínu nebo zlepšují jeho účinnost. Tyto sloučeniny jsou používány pro léčbu sportovců a je potřeba kontrolovat jejich hladiny v tělesných tekutinách. Z tohoto důvodu byl vyvinut robustní a citlivý test pro identifikaci 12 perorálních antidiabetických léčiv nebo příslušných hydroxylovaných metabolitů v lidské moči: metformin, tolbutamid, tolazamid, glibenklamid, gliklazid, gliquidon, glimepirid, glipizid, glibornurid, glinidy nateglinidu (derivát D-fenylalaninu) a repaglinidu (derivát kyseliny benzoové), rosiglitazon a pioglitazon. Vzorke moči byly enzymaticky hydrolyzovány. Cílové analyty byly extrahovány pomocí extrakce kapalina-kapalina a identifikovány kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Ionizace analytů byla provedena pomocí elektrospreje. Meze detekce příslušných léčiv se pohybovaly mezi 10 a 30 ng/ml. Výsledné specifické iontové přechody mohou být využity k identifikaci perorálních antidiabetik nebo jejich metabolitů v lidské moči, protože tato třída sloučenin může být zneužita ve sportu v důsledku jeho inzulín-uvolňujícího nebo inzulín-senzibilizujícího účinku.<sup>18</sup>

### 1.3.2 Stanovení tenkovrstvou chromatografií

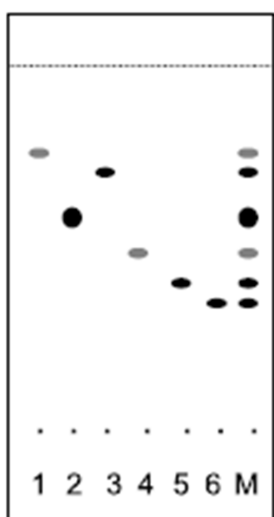
Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je další separační metoda, kde stacionární fází je silikagel, oxid hlinitý atd., mobilní fází je směs rozpouštědel (cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi). Vzorek se aplikuje ve velmi malém množství ( $\mu\text{l}$ ) na začátek chromatografické desky spolu se standardy. Po usušení nanesených vzorků se deska umístí do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze). Chromatografická deska se poté vyjme, vysuší a následuje detekce látek obsažených ve vzorku pro stanovení polohy.<sup>13</sup>

V TLC analýze bylo dosaženo dobré separace pomocí směsi *n*-butylacetátu s 0,4% kyselinou mravenčí jako mobilní fází (Obr. 8), jako stacionární fáze byl použit silikagel 60. Pro detekci bylo použito ultrafialové záření o vlnové délce 254 nm. K detekci byla použita čtyři různá činidla: Dragendorffův roztok (DD), 10% methanolvý roztok

kyseliny fosfomolybdenové (PM) a 30% methanolový roztok kyseliny sírové (SA) (Tab. 5).<sup>14</sup>

Tabulka 5: Hodnoty meze detekce (LOD) při TLC stanovení směsi antidiabetik. Mobilní fáze: *n*-butylacetát s 0,4% kyselinou mravenčí. DD – Dragendorffův roztok, PM – 10% methanolový roztok kyseliny fosfomolybdenové, SA – 30% methanolový roztok kyseliny sírové.<sup>14</sup>

Derivát	UV [μg]	DD [μg]	PM [μg]	SA [μg]
tolbutamid	2,0	-	-	-
chlorpromamid	0,5	-	-	-
glibenklamid	0,5	0,5	-	0,25
acetohexamid	0,01	-	-	-
gliklazid	0,5	2,0	0,25	-
glimepirid	0,25	1,0	-	-



Obrázek 8: TLC chromatogram TOL (1), ACE (2), CHL (3), GLC (4), GLB (5), GLM (6) a směsi standardních roztoků (M).<sup>14</sup>

V další práci byla pomocí tenkovrstvé chromatografie zkoumána nová perorální antidiabetika pioglitazon, rosiglitazon a repaglinid. Mobilní fáze obsahovala 1,4-dioxan s fosfátovým pufrém. Byl také zkoumán vliv pH na separaci léčiv. Pro kvantitativní stanovení pioglitazonu v tabletách pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie byla vyvinuta a validována jednoduchá, rychlá a stabilní metoda. Analýza byla prováděna s 1,4-dioxan-fosfátovým pufrém o pH 4,4 jako mobilní fází. Detekce a kvantifikace byla provedena klasickou denzitometrií při vlnové délce absorpčního maxima pioglitazonu (266 nm). Přesnost byla ověřena opakovanými analýzami standardních roztoků a analýzou vzorků se standardním přídatkem. Mez detekce (LOD)

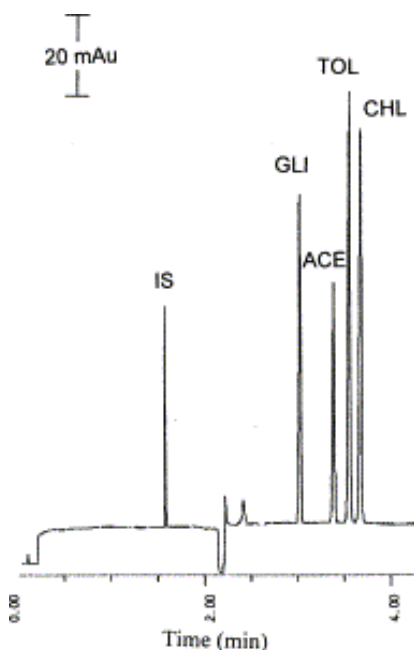


byla 0,06  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  pioglitazonu. Souhrnně, tři nová perorální antidiabetika, pioglitazon, rosiglitazon a repaglinid, byly separovány pomocí TLC na obrácených fázích na destičkách s vázaným kyanopropylem. Rozdíly v selektivitě systémů rozpouštědel byly zkoumány na separaci blízkých příbuzných sloučenin, pioglitazonu a rosiglitazonu. Tyto analýzy umožnily výběr vhodného chromatografického systému pro identifikaci a kvantifikaci pioglitazonu, rosiglitazonu a repaglinidu.<sup>19</sup>

### 1.3.3 Stanovení kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza byla široce používána v minulém desetiletí pro separaci a stanovení mnoha látek ve farmaceutické analýze. V některých oblastech kapilární elektroforéza v současné době vytěsňuje kapalinovou chromatografií díky mnoha výhodným vlastnostem, jako je extrémně vysoká účinnost, vysoké rozlišení, rychlá analýza a malá spotřeba vzorku a činidel.

Kombinace metformin hydrochloridu (M) s rosiglitazon maleátem (R) nabízí racionální terapeutický přístup k léčbě diabetu 2. typu. Tato dvě činidla mohou být použita v kombinaci pro dosažení aditivní účinnosti snižující hladinu glukózy při léčbě diabetu 2. typu, aniž by byla stimulována sekrece inzulínu a bez hypoglykémie. Optimální separace těchto analytů bylo dosaženo s použitím křemenné kapiláry a acetátového pufru při pH 4,0. Detekční vlnová délka UV detektoru byla nastavena na 203 nm. Mez detekce pro obě látky byla 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a mez stanovitelnosti 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .<sup>20</sup>



Obrázek 9: Kapilární elektroferogram směsi čtyř syntetických antidiabetik: acetoheksamid (ACE), chlorpropamid (CHL), glibenklamid (GLI) a tolbutamid (TOL).<sup>21</sup>

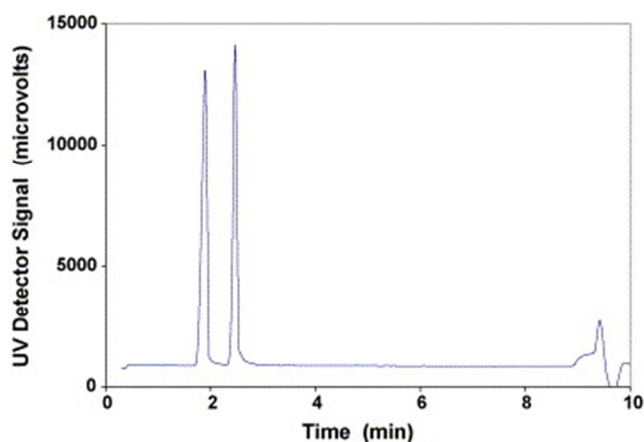
Dále můžeme uvést výsledky separace antidiabetik v Tchaj-wanu. Čtyři syntetická antidiabetika, acetoexamid, chlorpropamid, glibenklamid a tolbutamid, které lze nalézt jako cizorodé látky v tradičních čínských léčivech, byly testovány současně s použitím vysokoúčinné kapilární elektroforézy (HPCE) s UV detekcí při 200 nm (Obr. 9). Elektrolytem byl 100 mM fosfát-borátový pufr ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 7,5). Meze detekce čtyř syntetických antidiabetik byly 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro ACE, 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro CHL, 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro GLB a 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro TOL.<sup>21</sup>

Kapilární elektroforéza je cenným nástrojem pro analýzu různých analytů včetně malých molekul. Ukázalo se, že micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) je zvláště účinná pro analýzu farmaceutických i lékových směsí jak ve standardní formě, tak v biologických tekutinách. Micelární elektrokinetická chromatografie ve spojení s detektorem diodového pole při 190 až 350 nm a UV detektorem při 200 nm, byla využita jako analytická metoda pro separaci a detekci sulfonylmočovinových léčiv tolzamidu, acetoexamidu, chlorpropamidu, glibenklamidu, glipizidu a tolbutamidu. Byl použit pufr obsahující 5 mM borát / 5 mM fosfát / 75 mM cholát sodný. Tato metoda umožnila stanovit perorální antidiabetika v moči po dávce 5 mg léčiva, což je koncentrace 300 až 500 ng/ml.<sup>22</sup>

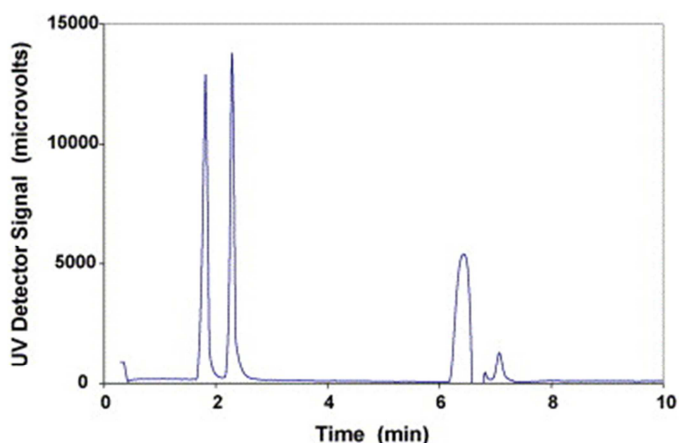
SPE-CE (Solid-phase extraction-capillary electrophoresis) je technika, při které mohou být velmi zředěné analyty selektivně extrahovány z matrice vzorku a koncentrovány online pro analýzu. Tato studie popisuje první fázi vývoje metody využívající tuto techniku pro přímou analýzu hypoglykemických léků v moči. Účinná separace a detekce šesti standardů sulfonylmočovinového léčiva (tolzamidu, acetoexamidu, chlorpropamidu, glibenklamidu, glipizidu a tolbutamidu) bylo dosaženo při koncentracích pod mezí detekce běžných kapilárních elektroforetických technik. Byl použit pufr složený z 250 mM boritanu a 5 mM fosfátu o pH 8,4 a UV detekce při 200 nm. Mez detekce byla přibližně 20 ng/ml.<sup>23</sup>

SPE byla použita i pro stanovení tří základních a neutrálních antidiabetických léčiv (metformin, fenformin a glibenklamid) v lidské plazmě. Analýza kapilární elektroforézou byla provedena za použití nevodného pufru acetonitril / 5 mM octan amonný / 5% kyselina octová, což umožnilo rychlou separaci metforminu a fenforminu během 3 minut. Tyto dva analyty migrovaly daleko před teofylinem a kofeinem (přidány jako modelové sloučeniny z kategorií léčiv a potravin pro testování selektivity této metody pro stanovení metforminu a fenforminu), které eluovaly jako překrývající

se píky (8,9 až 9,2 min) (Obr. 10). Byla použita UV detekce při 240 nm. Meze detekce byly 12 ng/ml pro metformin a 6 ng/ml pro fenformin. Glibenklamid je perorální léčivo snižující hladinu glukózy v krvi z třídy derivátů sulfonylmočoviny, které se obvykle kombinuje s hydrochloridem metforminu. Metoda SPE-CE s UV detekcí byla použita pro současnou analýzu metforminu, fenforminu a glyburidu v lidské plazmě. Při použití 3% kyseliny octové v methanolu jako matrice vzorku byl glibenklamid zcela oddělen od metforminu a fenforminu (Obr. 11). Tyto výsledky ukázaly, jak snadné je pomocí CE oddělit neutrální molekuly glyburidu od pozitivně nabitých kationtů metforminu a fenforminu.<sup>9</sup>



Obrázek 10: CE analýza eluátu methanolu s 3 % kyseliny octové obsahujícího metformin (signál při 1,75 min), fenformin (signál při 2,70 min) a teofylin s kofeinem (signál při 8,9 až 9,2 min).<sup>9</sup>



Obrázek 11: CE analýza eluátu methanolu s 3 % kyseliny octové obsahujícího metforminu (signál při 1,78 min) a fenforminu (signál při 2,50 min) a glibenklamid (signál při 6,43 min).<sup>9</sup>

## **1.4 Kapilární elektroforéza**

### **1.4.1 Historie kapilární elektroforézy**

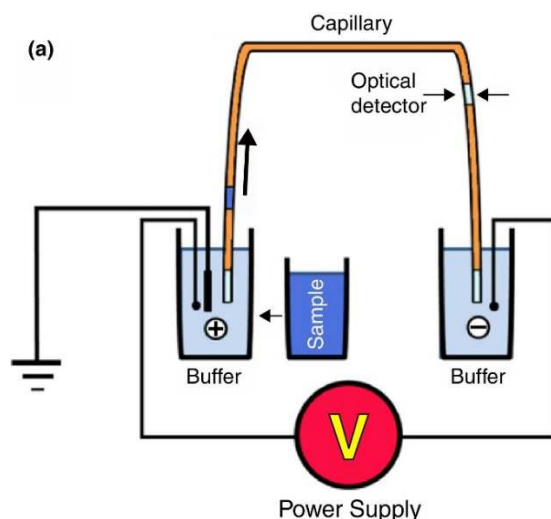
Elektroforézu jako metodu separace iontových analytů navrhl v 30. letech 20. století švédský biochemik Arne Tiselius, který umístil směs sérových proteinů do roztoku pufru a při aplikaci elektrického pole zjistil, že složky vzorku migrují ve směru a rychlosti určené jejich velikostí a elektrickým nábojem, což dovolilo vědci oddělit albumin od  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulinů. V roce 1948 získal vědec Nobelovu cenu za chemii za sérii prací na elektroforéze.

Významnými omezeními této již široce používané metody byly nízká účinnost a nedostatečná selektivita separace. Následné použití antikonvenčního prostředí (želatinové, agaróзовé a polyakrylamidové gely) tento problém částečně odstranilo.

Od roku 1980 se elektroforéza stala alternativou a doplněním vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), především při separaci ionogenních a polárních sloučenin. Hlavní výhody kapilární elektroforézy jsou zvýšení účinnosti, malé množství dávkovaného vzorku, jednodušší postup přípravy vzorku, jednoduchý a levný návrh přístroje, možnost online detekce a automatizace.<sup>24</sup>

### **1.4.2 Charakteristika kapilární elektroforézy**

Kapilární elektroforéza je založena na separaci složek komplexní směsi v křemenné kapiláře působením elektrického pole (Obr. 12). Mikroobjem analyzovaného roztoku se zavede do kapiláry, která je naplněna vhodným elektrolytem. Vlivem vysokého napětí vloženého na kapiláru se složky směsi začnou pohybovat kapilárou různými rychlostmi v závislosti především na náboji a hmotě (přesněji elektroforetické mobilitě), a tudíž dosahují detekční zóny v různých časech. Výsledný záznam analýzy se nazývá elektroforeogram. Kvalitativní charakteristikou je retenční parametr (doba migrace), plocha píku je úměrná koncentraci látky.<sup>25</sup>



Obrázek 12: Základní instrumentace CE.<sup>26</sup>

### 1.4.3 Elektroforetická mobilita

Nejdůležitější vlastností přenosu hmoty během elektroforézy je elektroforetická mobilita částic - tj. rychlost pohybu vztažená na jednotku síly elektrického pole. Doba migrace nabitých látek (resp. celková rychlost částic) v kapilární elektroforéze je určena dvěma parametry: vnitřní elektroforetickou rychlostí částic ( $v_{ep}$ ) a rychlostí elektroosmotického toku ( $v_{eof}$ ):

$$v = v_{ep} + v_{eof}$$

Elektroforetická rychlost, která je součinem elektroforetické mobility ( $\mu_e$ ) a síly elektrického pole ( $E$ ), je nezbytná pro separaci jednotlivých látek:

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

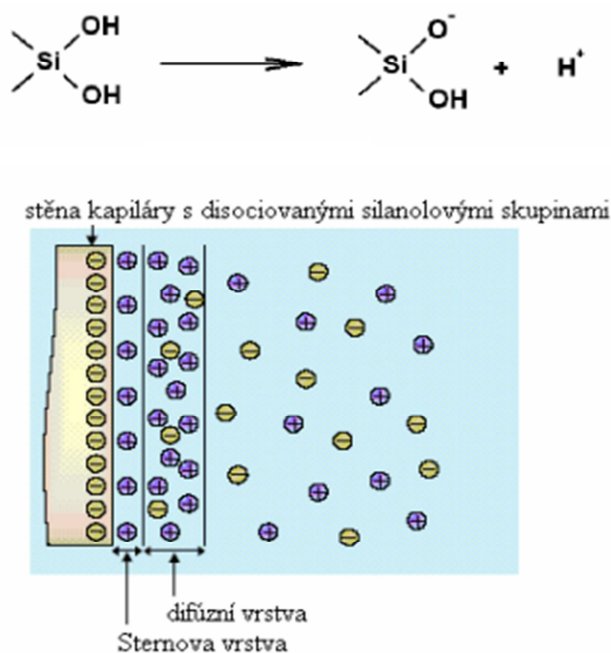
Elektroforetická mobilita může být vypočtena podle níže uvedeného vzorce, kde  $q$  je náboj iontu,  $\eta$  je viskozita roztoku,  $r$  je poloměr ionu:

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

Z rovnice vyplývá, že malé ionty s velkým nábojem budou mít elektroforetickou mobilitu větší, než ty s malým nábojem. Elektroforetická mobilita závisí také na teplotě. S rostoucí teplotou klesá viskozita elektrolytu a zvyšuje se elektroforetická mobilita. Z důvodu, že elektroforetická mobilita je spojená s rychlostí, má menší molekula s větším nábojem vyšší rychlost než větší molekula s menším nábojem. Na detektoru se jako první projevuje odpověď malé molekuly.<sup>24,25,26,27</sup>

#### 1.4.4 Elektroosmotický tok

Při provádění separace v kapilárách je obzvláště důležitý elektroosmotický tok (EOF) spojený s pohybem difúzní části dvojvrstvy, která tvoří relativně nabitý povrch vnitřní stěny kapiláry. Povrchový náboj je zpravidla určen přítomností negativně nabitých silanolových skupin SiOH na povrchu nemodifikovaných křemenných kapilár (Obr. 13). Kvůli zachování elektroneutality se kationty z elektrolytu kumulují v blízkosti negativně nabitých skupin za tvorby dvojvrstvy, která má několik částí. Na vnitřní straně kapiláry je stacionární vrstva pouze těchto negativně nabitých silanolových skupin, které jsou kompenzovány stacionární vrstvou opačného náboje, vznikající z kationtů - Sternovou vrstvou. Na Sternovu vrstvu navazuje pohyblivá difúzní vrstva tvořená ionty vázanými elektrostatickými silami, které kompenzují zbytek náboje vnitřní Sternovy vrstvy. Protože tyto ionty jsou solvatované, jejich pohyb způsobuje, že celý roztok proudí v kapiláře ke katodě.



Obrázek 13: Rozdělení nábojů v kapiláře.<sup>25,28</sup>

Elektroforetická mobilita elektroosmotického toku ( $\mu_{eof}$ ) a rychlost elektroosmotického toku ( $v_{eof}$ ) se určují jako:

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \times \xi}{\eta}$$

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon \times \zeta}{\eta} \times E$$

Kde  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta,  $\zeta$  je zeta potencial a  $E$  je intenzita elektrického pole.

Všechny složky, které mají být stanoveny, se budou pohybovat ve směru detektoru jako důsledek EOF. Ale rychlost pohybu iontů se stejným směrem elektroforetických a elektroosmotických pohybů se zvýší a s opačným směrem poklesne. V případě nemodifikované křemenné kapiláry existuje v difúzní části elektrické dvojvrstvy určitý přebytek koncentrace kationtů, v jehož důsledku dochází k elektroosmotickému toku směrem ke katodě. V důsledku toho se kationty budou pohybovat rychleji a budou detekovány před elektroosmotickým tokem, anionty jsou pomalejší a budou detekovány po elektroosmotickém toku, neutrální molekuly se pohybují s elektroosmotickým tokem.

Unikátní vlastností elektroosmotického toku je plochý profil průtoku v kapiláře. Takový profil je výhodný, protože se sníží rozmývání zón separovaných látek.

Pro analýzu je nutné mít možnost regulovat velikost osmotického toku, protože při vysokých tocích může vzorek projít detektorem bez rozdělení. Naopak, pokud je rychlost velmi nízká, separace je zbytečně zpožděna, šířka zóny se zvyšuje v důsledku disperze a anionty nemusí migrovat do detektoru vůbec. Nejjednodušší způsob, jak ovlivnit rychlost, je změnit sílu elektrického pole volbou odlišného pH, iontové síly nebo přidáním povrchově aktivních látek, které pokrývají vnitřní povrch kapiláry a mění rychlost a směr proudění.<sup>24,25,27,28</sup>

#### 1.4.5 Migrační čas

Migrační čas ( $t_m$ ) je doba potřebná k tomu, aby složka prošla účinnou délkou kapiláry ze zóny zavedení vzorku (začátek kapiláry) do detekční zóny:

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

Kde  $t_m$  je migrační čas,  $l_{ef}$  je efektivní délka kapiláry,  $v$  je celková rychlost,  $E$  je intenzita elektrického pole,  $\mu_e$  je elektroforetická mobilita a  $\mu_{eof}$  je elektroforetická mobilita elektroosmotického toku.

Doba migrace může být snížena zmenšením efektivní délky kapiláry nebo použitím silnějšího elektrického pole. Intenzita elektrického pole je omezena Joulovým teplem a zmenšením efektivní délky kapiláry záporně ovlivní účinnost separace.<sup>27,29</sup>

#### 1.4.6 Jouleovo teplo

Proud protékající vodičem je pohyb elektrického náboje pod vlivem elektrického pole. Takže elektrické pole koná nějakou práci. Tato práce je věnována vytápění vodiče. Jinak řečeno, elektrická energie přechází do jiné podoby – na teplo:

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

Kde  $Q$  je Jouleovo teplo,  $I$  je elektrický proud,  $R$  je odpor,  $t$  je čas a  $U$  je napětí.

Jouleovo teplo způsobuje rozšiřování píků, změnu nebo destrukci nestálé rozpuštěné látky a, především v případě kapilár naplněných gelem, nehomogenity fyzikálních vlastností separačního systému.

Účinné chlazení kapiláry je důležité pro snížení účinků Jouleova tepla. Kapilární chlazení může být zvýšeno použitím kapiláry z tepelně vodivých materiálů a použitím kapiláry s tenší stěnou. Křemen a sklo jsou považovány za nejvhodnější materiály, které poskytují maximální tepelnou vodivost spolu s vysokým elektrickým odporem. Chlazení kapiláry může být také podpořeno relativním zvětšením obvodu kapiláry k ploše průřezu.<sup>30,31</sup>

#### 1.4.7 Účinnost a selektivita

Metoda kapilární elektroforézy se vyznačuje vysokou účinností:

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{eof}) \times E \times l_{ef}}{2 \times D}$$

Kde  $N$  je počet teoretických pater,  $D$  je difúzní koeficient,  $l_{ef}$  je efektivní délka kapiláry,  $E$  je intenzita elektrického pole,  $\mu_e$  je elektroforetická mobilita a  $\mu_{eof}$  je elektroforetická mobilita elektroosmotického toku.

Teoretická hodnota  $N$  přesahuje hodnotu účinnosti získanou v praxi, protože rovnice zohledňuje pouze podélnou difúzi. Složky vzorku s nízkými difúzními koeficienty tvoří užší píky. Existuje množství faktorů, které může vést ke snížení účinnosti, např. zvýšení objemu dávkovaného vzorku (dáno délkou vzorku v kapiláře) nebo tvorba teplotního gradientu (v důsledku teplotního rozdílu ve středu a na vnitřní stěně kapiláry). Výsledný



gradient viskozity vede ke skutečnosti, že látka na stěně se pohybuje pomaleji než ve středu, což způsobuje rozšíření píků a snížení účinnosti separace. Různé varianty kapilární elektroforézy poskytují různou selektivitu separace v důsledku různých mechanismů:

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2}$$

Kde  $\alpha$  je selektivita separace,  $\mu_1$  je elektroforetická mobilita rychlejšího iontu a  $\mu_2$  je elektroforetická mobilita pomalejšího iontu.

Zvýšení selektivity separace může být dosaženo změnou pH pracovního elektrolytu nebo použitím aditiv (povrchově aktivních látek). Tyto faktory ovlivňují rychlost EOF.<sup>24,27,29,32</sup>

## **1.5 Varianty kapilární elektroforézy**

Metoda kapilární elektroforézy je založena na separaci nabitých složek komplexní směsi v křemenné kapiláře působením elektrického pole. Mezi nejběžnější varianty metody CE patří: kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), kapilární izotachoforéza (CITP), bezvodá kapilární elektroforéza (NACE).

### **1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza**

Při kapilární zónové elektroforéze se určené látky dělí v kapiláře obsahující pouze roztok elektrolytu bez jakéhokoliv protiproudého média. V této metodě je separace způsobena migrací různých složek vzorku různými rychlostmi ve formě oddělených pásů. Rychlost pohybu každého pásu závisí na elektroforetické pohyblivosti částic roztoku a elektroosmotickém toku v kapiláře. Pro zlepšení separace látek adsorbovaných na křemenném povrchu lze použít kapiláry s modifikovaným povrchem. Při použití tohoto typu kapilární elektroforézy je možné analyzovat jak malé, tak velké molekuly. Metoda je široce používána při stanovení peptidů, proteinů, aminokyselin, léčivých přípravků, anorganických iontů a mnoha dalších látek.<sup>25,27,29,32</sup>

### **1.5.2 Micelární elektrokinetická chromatografie**

V micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) dochází k separaci v roztoku elektrolytu, který obsahuje povrchově aktivní látku v koncentraci vyšší než je kritická

micelární koncentrace. Rozpuštěné molekuly jsou rozděleny mezi vodným roztokem pufru a fází tvořenou micelami v souladu s jejich distribučním koeficientem. Tuto metodu lze tedy považovat za hybrid elektroforézy a chromatografie. Může být použita k dělení jak nabitých tak neutrálních částic při zachování účinnosti, rychlosti a vybavení, které je vlastní kapilární elektroforéze. Jedním z povrchově aktivních činidel široce používaných v MEKC je aniontový tenzid dodecylsulfát sodný. Také se používají další povrchově aktivní látky. Příkladem kationtových tenzidů, používaných v MEKC, jsou cetyltrimethylamoniové soli.

Separční mechanismus je následující: V neutrálním nebo alkalickém prostředí vzniká silný elektroosmotický tok, který pohybuje ionty pufru směrem ke katodě. Pokud se jako povrchově aktivní látka použije dodecylsulfát sodný, dochází k elektroforetické migraci aniontových micel v opačném směru, tj. směrem k anodě. Výsledkem je snížení celkové migrační rychlosti micel ve srovnání s průtokem roztoku elektrolytu. V případě neutrálních látek, které mají být separovány, bude rychlost migrace analytu záviset pouze na velikosti jejich distribučních koeficientů mezi micelou a vodným roztokem pufru.<sup>25,27,29,32</sup>

### **1.5.3 Kapilární gelová elektroforéza**

Při kapilární gelové elektroforéze (CGE) probíhá separace uvnitř kapiláry naplněné gelem, který působí jako molekulární síto. Protože menší molekuly snadněji pronikají do struktury gelu a migrují rychleji než velké molekuly, dochází k separaci molekul s podobnými hodnotami poměru náboj k hmotnosti v souladu s jejich velikostí. Metodou kapilární gelové elektroforézy tak mohou být separovány různé biologické makromolekuly (například proteiny a fragmenty DNA), které mají často podobné hodnoty náboje a hmotnosti.<sup>27,32</sup>

### **1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace**

Při kapilární izoelektrické fokusaci (CIEF) migrují molekuly pod vlivem elektrického pole v systému s gradientem pH. Amfolyty migrují v závislosti na jejich celkovém náboji směrem ke katodě nebo anodě, dokud nedosáhnou hodnoty pH odpovídající jejich izoelektrickému bodu (pI). V tomto bodě dojde k jejich zastavení, protože jejich celkový náboj je v tomto bodě nulový a tudíž nemůže docházet k další migraci těchto látek v elektrickém poli. Metoda je široce používána při stanovení peptidů a aminokyselin.<sup>27,32</sup>

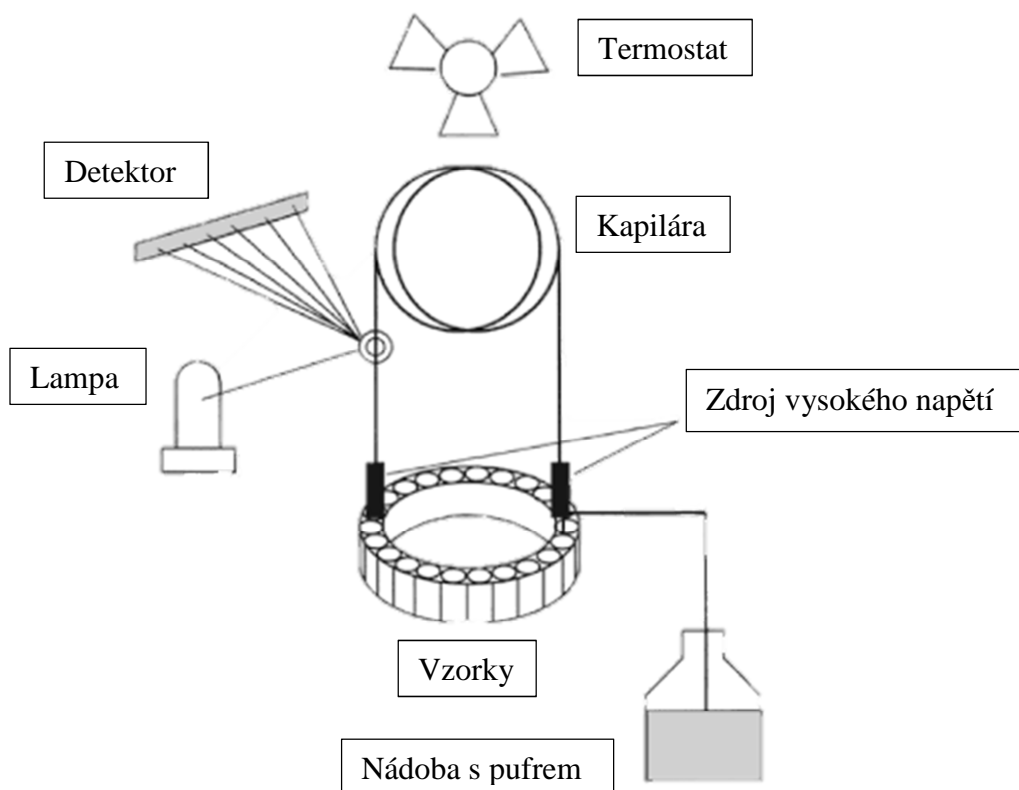
### 1.5.5 Kapilární izotachoforéza

Při kapilární izotachoforéze (CITP) jsou složky vzorku děleny vlivem rozdílu v jejich elektroforetických mobilitách. V této metodě, na rozdíl od jiných metod, jednotlivé frakce migrují v ustáleném stavu stejnou rychlostí. Zóny jednotlivých iontů migrují těsně za sebou jako sendvič mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Mobilitu iontů lze ovlivnit použitým protiiontem. Protože mobilita slabých iontů závisí na stupni disociace, může být měněna změnou pH vedoucího elektrolytu.

Vedoucí elektrolyt by měl být vybrán takovým způsobem, aby mobilita vedoucího iontu byla vyšší než mobilita ostatních složek. Naopak, pohyblivost koncového iontu by měla být menší než mobilita složek vzorku. Izotachoforéza může být použita pro stanovení kationtů nebo aniontů, což je vhodné při analýze organických kyselin a zásad, aminokyselin, peptidů, nukleotidů, biopolymerů, syntetických polymerů, anorganických solí atd.<sup>33</sup>

## 1.6 Instrumentace

Schema zařízení pro kapilární elektroforézu je na následujícím:



Obrázek 14: Schema zařízení pro kapilární elektroforézu.<sup>33</sup>

### 1.6.1 Zdroj vysokého napětí

Kvalitní zdroj je schopen generovat napětí od 5 do 30 kV a proud od 0 do 300  $\mu$ A. Pro dobrý výsledek nesmí odchylka překročit 0,1 %.<sup>27</sup>

### 1.6.2 Detektor

Ačkoliv pro kapilární elektroforézu je možné použít různé druhy detekce, včetně fluorescenční, elektrochemické a konduktometrické (Tab. 6), většina průmyslově vyráběných přístrojů je vybavena fotometrickými detektory.

Tabulka 6: Metody detekce v kapilární elektroforéze.<sup>25</sup>

Detekce	Definované sloučeniny	Mez detekce [mol/l]	Specifičnost
Fotometrický: přímá detekce	aromatické sloučeniny, proteiny, nukleové kyseliny	$10^{-7} - 10^{-4}$	nejrozšířenější, detekce látek, které neabsorbují v UV oblasti
Fotometrický: nepřímá detekce	ionty kovů, aminy, organické a anorganické anionty, cukry	$10^{-8} - 10^{-4}$	detekce látek, které neabsorbují v UV oblasti
Fluorescenční: přímá detekce	deriváty aminokyselin, peptidy, proteiny	$10^{-9} - 10^{-4}$	je nutné připravit fluoreskující derivaty
Fluorescenční: nepřímá detekce	alkoholy, aminy, cukry, anorganické anionty, kationty	$10^{-7} - 10^{-5}$	použití pro omezený počet látek
Laserový fluorescenční	deriváty aminokyselin, fragmenty DNA	$10^{-13} - 10^{-7}$	jen zřídka, velmi drahé
Amperometrický	biogenní aminy, fenolické sloučeniny	$10^{-8} - 10^{-6}$	vhodné pro kapiláry s vnitřním průměrem do 2 mikronů
Konduktometrický	ionty kovů, aminy, karboxylové kyseliny	$10^{-7} - 10^{-5}$	těžko měnit kapiláru
Potenciometrický	ionty alkalických kovů a kovů alkalických zemin	$10^{-8}$	obtížnost získávání iontově selektivních mikroelektrod
Hmotnostně spektrometrický	proteiny, peptidy, monitorování léčiv	$10^{-10} - 10^{-8}$	velké možnosti, ale vysoké náklady

### 1.6.3 Dávkování

Vzorek může být zaveden do kapiláry elektroforetickým, elektrokinetickým nebo vytlačovacím způsobem. Objem injektovaného vzorku nepřesahuje 2 nl, relativní směrodatná odchylka je 3 až 4 %. Během elektroforetického vstřikování vzorku se na konce kapiláry aplikuje vysoké napětí po stanovenou dobu, zatímco vstupní konec kapiláry se ponoří do roztoku vzorku. Ionty vzorku se přenesou do kapiláry pomocí jejich elektroforetické pohyblivosti. V případě elektrokinetické injekce vstupují složky vzorku do kapiláry v důsledku kombinace elektroendosmotického tlaku a elektroforetické pohyblivosti. Dávkování vtlačováním vzorku se dosáhne buď vytvořením nadměrného vnějšího tlaku inertního plynu aplikovaného na nádobku se vzorkem nebo vytvořením vakua na výstupu kapiláry nebo změnou hladiny vzorku vzhledem k hladině elektrolytu na výstupu kapiláry (tzv. gravitační zavedení vzorku).<sup>25</sup>

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikále

Dále je uveden seznam použitých chemikálií (Tab. 7).

Tabulka 7: Seznam použitých chemikálií.

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Kyselina octová 99%	p.a.	Lach:NER
Octan draselný	p.a.	Sigma-Aldrich
Metformin hydrochlorid	p.a.	Glentham Life Sciences
Buformin hydrochlorid	p.a.	Sigma-Aldrich
Phenformin hydrochlorid	p.a.	Sigma-Aldrich

### 2.2 Přístroje a zařízení

Electroforetic Analyser EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko)

Analytické váhy ABT 120-4M (Kern, Balingen, Německo)

Laboratorní pH-metr HI-4221 (Hanna, Německo)

Ultrazvuková lázeň K-2 (Kraintek Podhájská, Slovensko)

#### 2.2.1 Elektroforetický analyzátor EA 102

Přístroj je vhodný pro izotachoforézu kationtů a aniontů. Jedná se o dvoukolonový izotachoforetický analyzátor. Použita byla předseparační kolona o vnitřním průměru 0,8 mm a délce 160 mm a analytická kolona o vnitřním průměru 0,3 mm a délce 160 mm, obě z teflonu. Vzorek je vnášen dávkovacím kohoutem o objemu 30  $\mu$ l. Zaznamenáván byl signál vodivostních detektorů.

### 2.3 Elektrolytové systémy

**Vedoucí elektrolyt: 0,01 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$  +  $\text{CH}_3\text{COOH}$**

Bylo naváženo 0,4907 g octanu draselného, obsah byl převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. K tomuto roztoku byla přidávána 1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  tak, aby bylo dosaženo pH 6,0. Obdobným způsobem byly připraveny vedoucí elektrolyty o různém pH (4; 4,5; 5; 5,5).

### **Koncový elektrolyt: 0,01 M CH<sub>3</sub>COOH**

Ze zásobního roztoku 1 M kyseliny octové byl odpipetován 1 ml do 100 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku.

## **2.4 Příprava roztoků**

### **2.4.1 Příprava standardních roztoků pro volbu elektrolytového systému**

Bylo naváženo 67,5 mg metforminu, 75,9 mg buforminu a 123,0 mg phenforminu, navážená množství byla převedena do jedné 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl před použitím 10x zředěn.

### **2.4.2 Příprava kalibračních roztoků**

Do 100 ml baňky byl připraven zásobní roztok navážením 20,8 mg metforminu, 20,6 mg buforminu a 20,7 mg phenforminu a doplněním destilovanou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byly dále připraveny kalibrační roztoky o koncentracích metforminu 3,24 mg/l, 6,49 mg/l, 16,22 mg/l, 32,44 mg/l, 81,1 mg/l a 162,2 mg/l, buforminu 3,34 mg/l, 6,69 mg/l, 16,72 mg/l, 33,44 mg/l, 83,6 mg/l a 167,2 mg/l a phenforminu 3,52 mg/l, 7,03 mg/l, 17,58 mg/l, 35,16 mg/l, 87,89 mg/l a 175,8 mg/l odpipetováním 1, 2, 5, 10 a 25 ml do 50 ml baněk.

### **2.4.3 Příprava roztoků vzorků**

Zásobní roztok použitý pro standardní přídavek byl připraven navážením 30 mg metforminu do 100 ml baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Tableta Siofor 500 byla rozdrcena, nasypána do 100 ml baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Poté byly připraveny roztoky do třech 50 ml baněk odpipetováním 0 ml, 2,5 ml a 5 ml ze zásobního roztoku standardního přídávku, ke kterým bylo přidáno 0,5 ml roztoku reálného vzorku. Baňky pak byly doplněny destilovanou vodou po rysku.

Obdobným způsobem byly připraveny roztoky vzorků Siofor 850, Siofor 1000, Stadamet 850, Glucophage XR 500 mg.

## **2.5 Reálné vzorky**

Pro tuto práci byly k analýze vybrány některá antidiabetika, obsahující účinnou látku metformin v různých koncentracích. V následujícím seznamu jsou sepsány použité vzorky, jejich výrobce a složení.

**Siofor 500:** potahované tablety (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo)

Složení (obsahové látky v 1 tabletě): 500 mg metformin hydrochloridu, hypromelosa, povidon, magnesium stearát, makrogol 6000, oxid titaničitý.

**Siofor 850:** potahované tablety (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo)

Složení (obsahové látky v 1 tabletě): 850 mg metformin hydrochloridu, hypromelosa, povidon, magnesium stearát, makrogol 6000, oxid titaničitý.

**Siofor 1000:** potahované tablety (Berlin-Chemie Ag, Berlín, Německo)

Složení (obsahové látky v 1 tabletě): 1000 mg metformin hydrochloridu, hypromelosa, povidon K 25, magnesium stearát, makrogol 6000, oxid titaničitý.

**Stadamet 850:** potahované tablety (STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel, Německo)

Složení (obsahové látky v 1 tabletě): 850 mg metformin hydrochloridu, hypromelosa, makrogol 6000, magnesium stearát, povidon 25, oxid titaničitý.

**Glucophage XR 500 mg:** tablety s prodlouženým uvolňováním (Merck Serono, Lyon, Francie)

Složení (obsahové látky v 1 tabletě): 500 mg metformin hydrochloridu (390 mg metforminu), magnesium stearát, sodná sůl karmelosy, hypromelosa 2208, hypromelosa 2910, mikrokrystalická celulosa.

## 2.6 Zpracování experimentálních dat

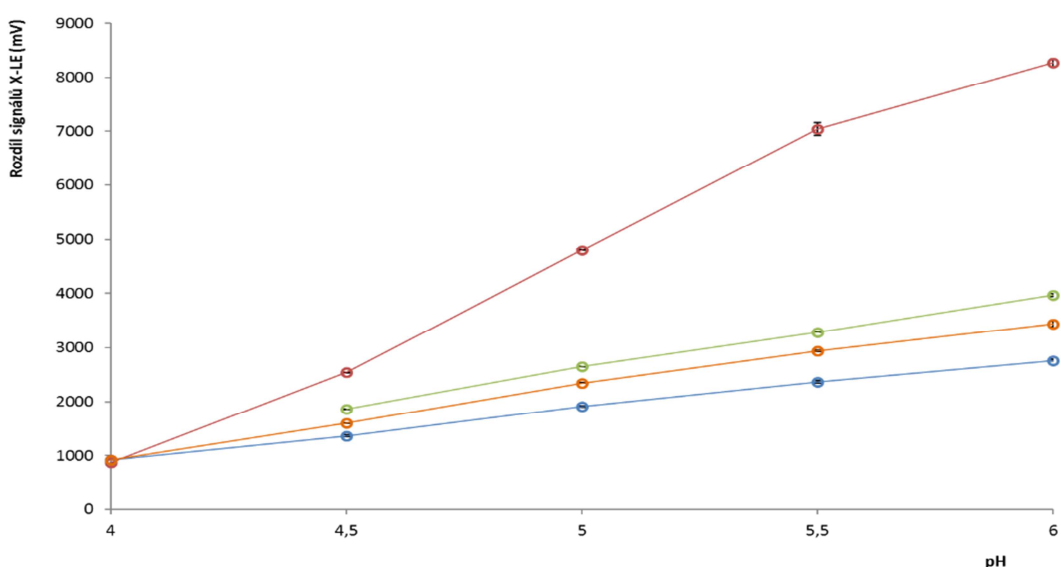
Data získaná pomocí ITP analyzátoru byla vyhodnocena pomocí programu ITPPro, který je dodáván výrobcem spolu s přístrojem. Následně byla data zpracována na počítači pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel 2013 a textového editoru Microsoft Word 2013. Zpracovávána byla data z předseparační i analytické kolony.



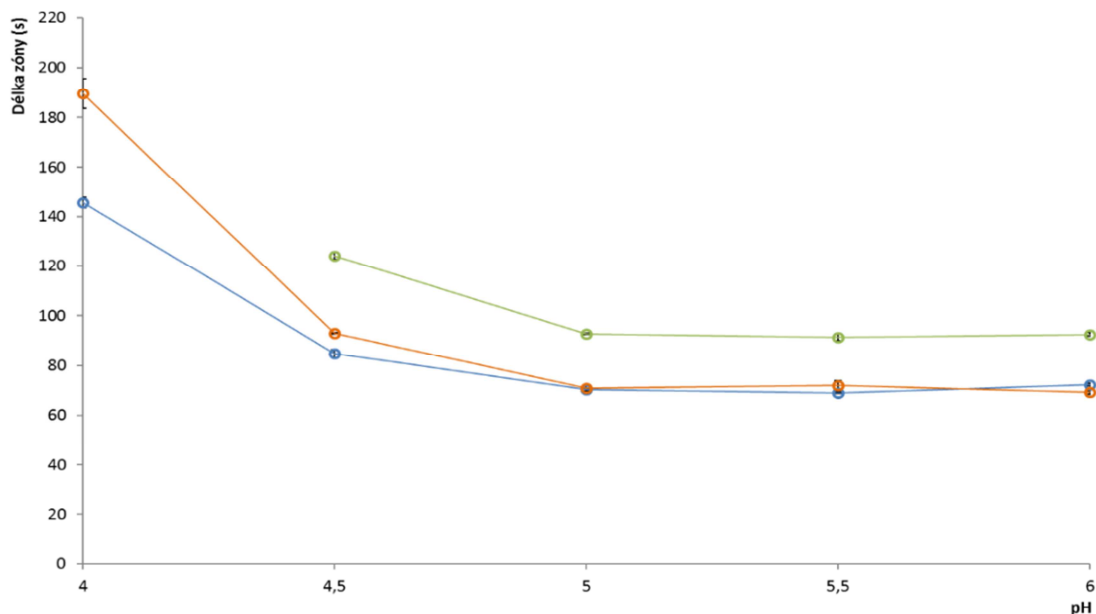
### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Volba elektrolytového systému

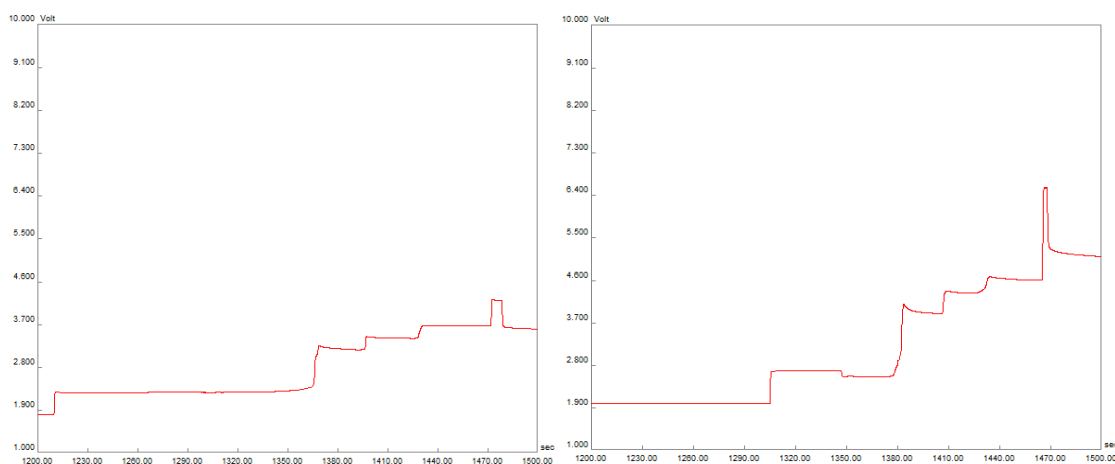
K analýze směšného standardu metforminu, buforminu a phenforminu byl využit kationtový mód s elektrolytovým systémem složeným z vedoucího elektrolytu 0,01 M octanu draselného s kyselinou octovou pro úpravu pH na hodnotu 6,0 a z koncového elektrolytu tvořeného 0,01 M kyselinou octovou, tzn. že vedoucím iontem byl  $K^+$  a koncovým  $H^+$ . Tento elektrolytový systém se jevil jako vhodný, proto byl dále zkoumán pouze vliv pH vedoucího elektrolytu na průběh analýzy. Takto byly vyzkoušeny vedoucí elektrolyty o pH 4, 4,5, 5, 5,5 a 6. Měření bylo vždy provedeno třikrát pro každou hodnotu pH. V grafu 1 je uvedena závislost intenzity signálu na pH vedoucího elektrolytu a v grafu 2 následně závislost délek zón jednotlivých analytů na pH vedoucího elektrolytu. Bylo vybráno pH 5,0 (Obr. 15 vpravo), při kterém jsou zóny analytů ostře ohraničené, délka zón je dostatečná, odstup koncového elektrolytu od posledního analytu (phenforminu) je vyšší než v případě pH 4,5. V případě potřeby nižší meze kvantifikace je výhodnější použít pH 4,5 (Obr. 15 vlevo), jelikož při tomto pH je separace dostatečná a délky zón analytů jsou nejvyšší. pH 4,0 je nevhodné, pohyblivosti analytů jsou příliš vysoké. V případě pH 5,5 a 6,0 jsou zóny oddělené, ale jejich přechod není dostatečně ostrý jako v případě pH 5,0 a 4,5. Získané hodnoty, které sloužily ke zvolení vhodného pH vedoucího elektrolytu jsou uvedeny v tabulce 15 v příloze.



Graf 1: Závislosti intenzity signálu koncového elektrolytu (horní křivka), phenforminu, buforminu a metforminu (dolní křivka) na pH vedoucího elektrolytu.



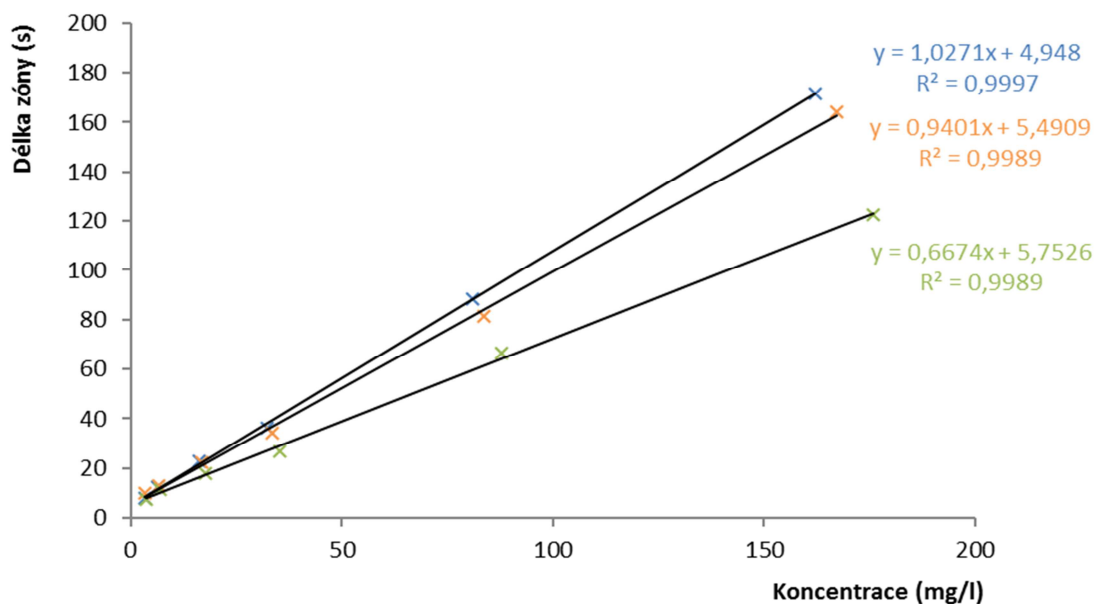
Graf 2: Vliv pH vedoucího elektrolytu na délku zóny phenforminu (horní křivka), buforminu a metforminu (dolní křivka).



Obrázek 15: Izotachforeogramy standardních roztoků – vlevo vedoucí elektrolyt pH 4,5, vpravo pH 5,0.

### 3.2 Kalibrační závislost

Byla vytvořena závislost velikosti signálu na různých koncentracích směšného kalibračního roztoku, který obsahoval metformin, buformin a phenformin. Směšné kalibrační roztoky byly připraveny tak, jak je popsáno v kapitole 2.4.2 a byly analyzovány v elektrolytovém systému s vedoucím elektrolytem o pH 5,0. Dále byla ze získaných hodnot sestavena kalibrační závislost, která je uvedena v grafu 3, jehož součástí jsou i rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti pro jednotlivé analyty. Naměřené hodnoty použité k sestavení kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 16 v příloze.



Graf 3: Kalibrační závislosti pro metformin (horní křivka), buformin a phenformin (dolní křivka).

### 3.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

LOD a LOQ byly určeny z rovnic kalibrační křivky. LOQ odpovídá koncentraci poskytující zónu o délce 1 s (pro výpočet byla nastavena hodnota úseku rovna 0) a LOD byl vypočten jako třetina LOQ.

#### Mez detekce

Metformin – 0,3 mg/l

Buformin – 0,33 mg/l

Phenformin – 0,47 mg/l

#### Mez stanovitelnosti

Metformin – 0,9 mg/l

Buformin – 1,0 mg/l

Phenformin – 1,4 mg/l

### 3.4 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) délek zón pěti po sobě následujících měření. Pro analýzu bylo do odměrné 100 ml baňky naváženo 5,5 mg metforminu, 5,3 mg buforminu a 5,1 mg phenforminu, tato baňka byla doplněna vodou po rysku. Z naměřených hodnot byla vyčíslena RSD v programu Microsoft Excel. RSD byla získána jako podíl směrodatné odchylky a průměru délky zóny, vynásobené 100, aby byla získána hodnota v procentech. Opakovatelnost pro jednotlivé analyty je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8: Opakovatelnost metody pro metformin, buformin a phenformin.

	<b>metformin (s)</b>	<b>buformin (s)</b>	<b>phenformin (s)</b>
<b>1</b>	17		13,7
<b>2</b>	16,45	20,55	13,85
<b>3</b>	16,5	17,75	14,15
<b>4</b>	17,95	18,9	15,2
<b>5</b>	17,2	17,6	14,5
<b>průměr (s)</b>	17,0	18,7	14,3
<b>sm. odchylka (s)</b>	0,6	1,4	0,6
<b>RSD (%)</b>	3,6	7,3	4,2

### 3.5 Výtěžnost

Výtěžnost byla počítána z kalibrační křivky, jako poměr naměřené a skutečné koncentrace standardních roztoků o koncentraci okolo 80 mg/l, přesné koncentrace pro jednotlivé analyty včetně hodnot výtěžnosti jsou udány v tabulce 9. Ve všech případech byla výtěžnost rovna přibližně 100 %.

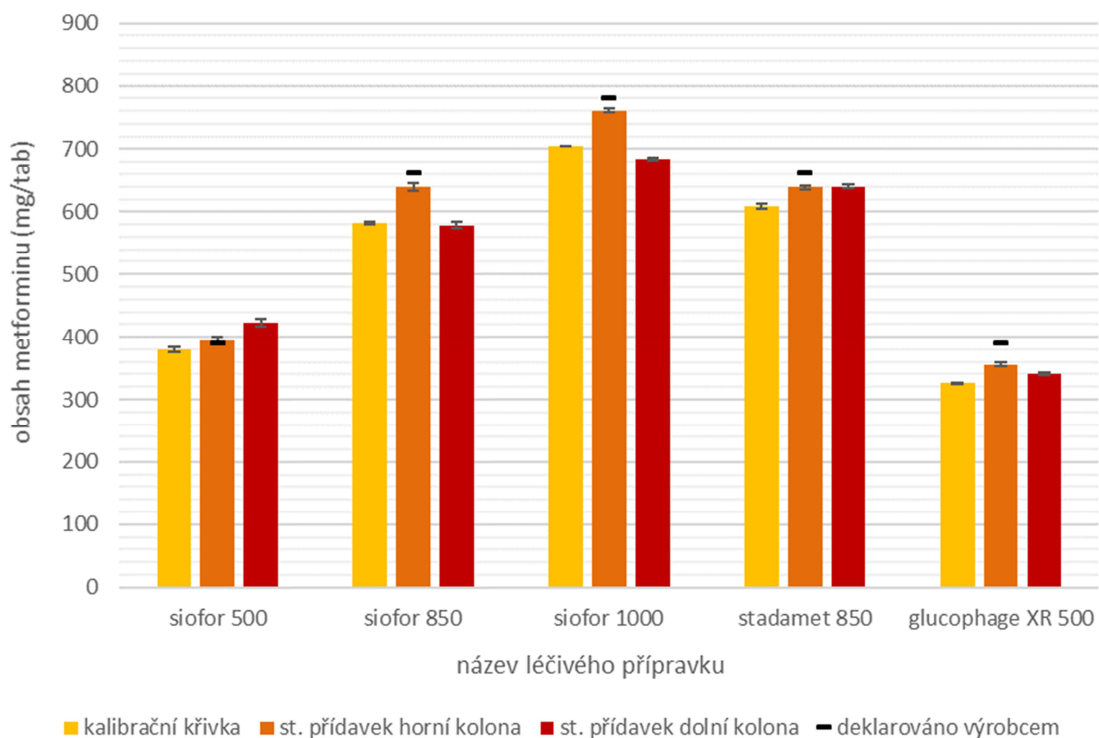
Tabulka 9: Výtěžnost metody pro metformin, buformin a phenformin.

	<b>skutečná konc. (mg/l)</b>	<b>naměřená konc. (mg/l)</b>	<b>výtěžnost (%)</b>
<b>metformin</b>	81,1	81,2 ± 0,1	100,1 ± 0,2
<b>buformin</b>	83,6	80,9 ± 0,6	96,8 ± 0,7
<b>phenformin</b>	87,89	91,3 ± 0,7	103,8 ± 0,8

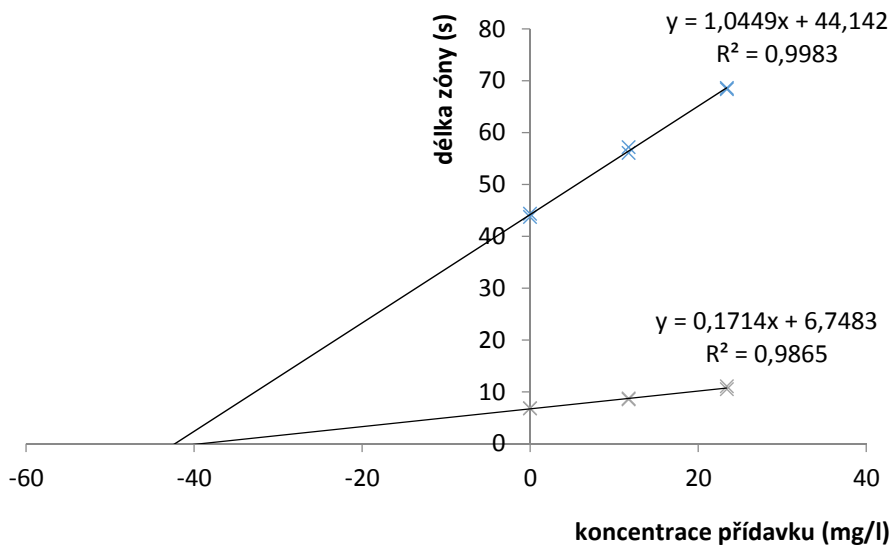
### 3.6 Analýza reálných vzorků

Reálné vzorky byly analyzovány pomocí optimalizovaného postupu. Pro měření byla vybrána antidiabetika obsahující metformin jako účinnou látku. Buformin a phenformin jsou v ČR zakázány kvůli riziku laktátové acidózy.

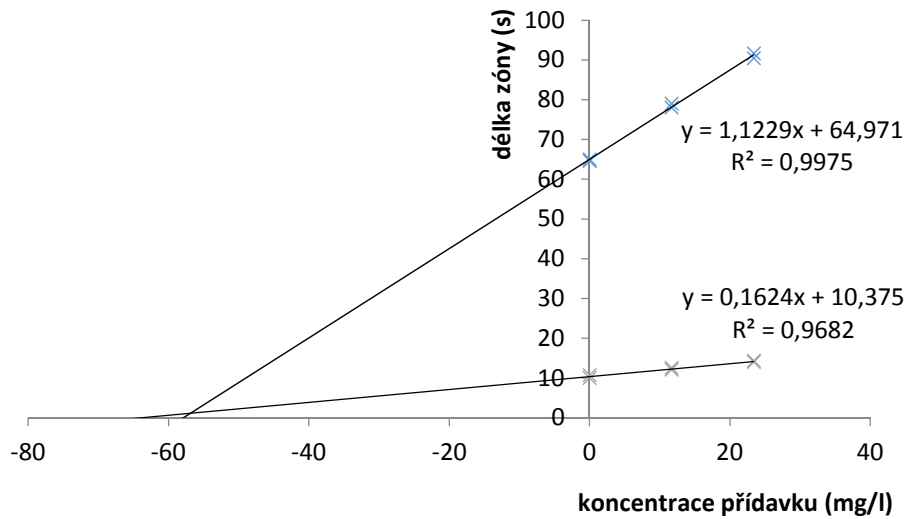
Obsah metforminu ve vzorcích byl stanoven metodou kalibrační křivky a metodou standardních přídavek (grafy 5 až 9). Experimentálně získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 17 v příloze. Výsledky jsou uvedeny v grafu 4 a v tabulkách 10 až 14 v příloze. Ze získaných výsledků je zřetelné, že nejspřávnější výsledky byly získány metodou standardního přídávku ze zón v předseparační koloně. V téměř všech případech byly naměřeny nižší obsahy, než bylo deklarováno výrobcem.



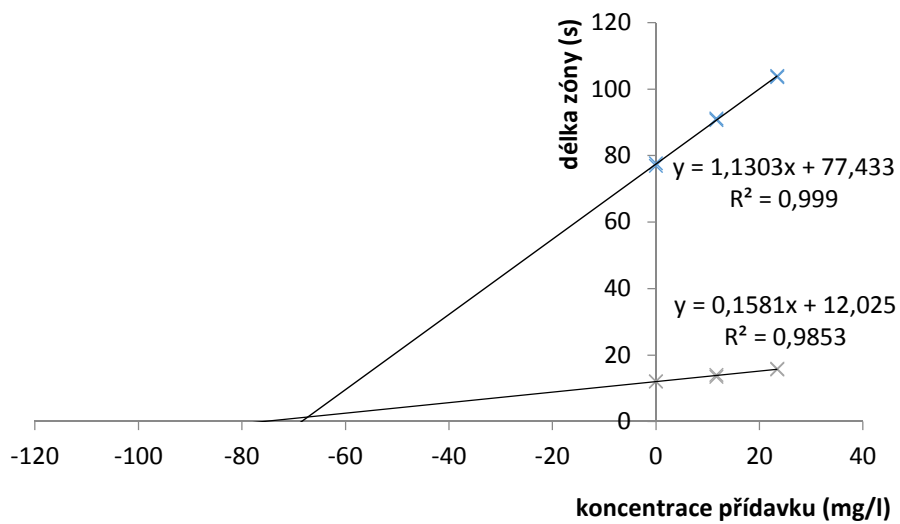
Graf 4: Naměřené obsahy metforminu a obsahy deklarované výrobcem v léčivých přípravcích.



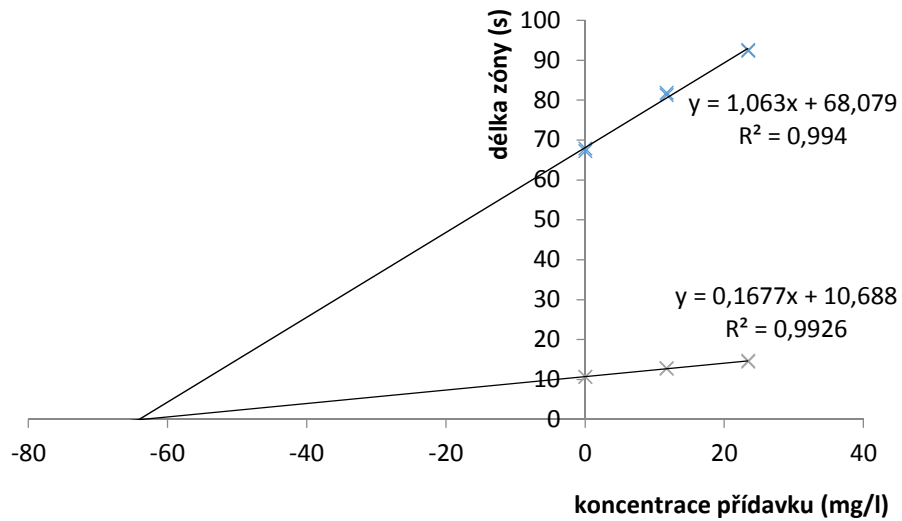
Graf 5: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídatku v přípravku Siofor 500.



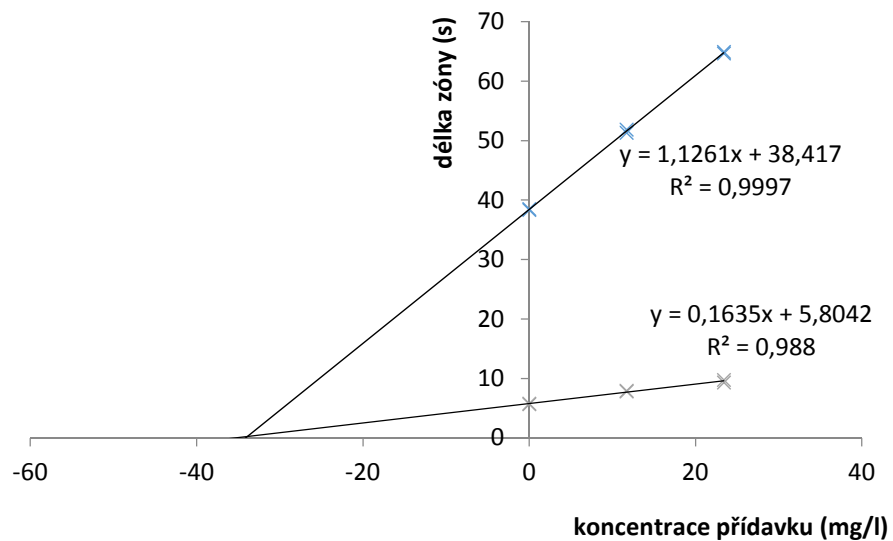
Graf 6: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídavku v přípravku Siofor 850.



Graf 7: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídavku v přípravku Siofor 1000.



Graf 8: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídatku v přípravku Stadamet 850.



Graf 9: Stanovení obsahu metforminu metodou standardního přídatku v přípravku Glucophage XR 500 mg.

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnout základní znalosti o antidiabetikách, zaměřit se na metody jejich stanovení a pokusit se pomocí izotachoforézy analyzovat vybraná antidiabetika.

V teoretické části práce byly popsány obecné informace týkající se antidiabetik, jejich vlastností, struktury a možností stanovení v různých matricích. V literatuře jsou popsány stanovení antidiabetik nejen metodou kapilární elektroforézy, ale také metodami HPLC a TLC.

V experimentální části byla úkolem této práce optimalizace izotachoforetického stanovení metforminu, buforminu a phenforminu a následné stanovení koncentrace metforminu v léčivých přípravcích. Z experimentů bylo zjištěno, že nejvhodnější elektrolytový systém k separaci byl tvořen vedoucím elektrolytem o složení 0,01 M octan draselný s kyselinou octovou k úpravě pH na 5 a koncovým elektrolytem 0,01 M kyselinou octovou.

Ověření správnosti metody bylo zjištěno pomocí stanovení metforminu, buforminu a phenforminu metodou kalibrační křivky. Výťažnost metody byla okolo 100 %. Dále byly určeny: LOD (metformin 0,3 mg/l; buformin 0,33 mg/l a phenformin 0,47 mg/l), LOQ (metformin 0,9 mg/l, buformin 1 mg/l a phenformin 1,4 mg/l), RSD (metformin 3,6 %, buformin 7,3 % a phenformin 4,2 %). Protože buformin a phenformin jsou v ČR zakázány kvůli riziku laktátové acidózy, byl v reálných vzorcích stanovován pouze metformin. Pro analýzu byla použita metoda kalibrační křivky a metoda standardního přídatku. Byl zjištěn obsah metforminu v tabletách: Siofor 500, Siofor 850, Siofor 1000, Stadamet 850, Glucophage XR 500 mg. Nejvíce s výrobcem shodné výsledky byly získány metodou standardního přídatku určené z délek zón v předseparační koloně. Celkově byly naměřeny obsahy metforminu s výtěžností od 83 do 108 %.



## LITERATURA

1. Data o diabetu v ČR. *Diabetická asociace* [online]. Diabetická asociace ČR, ©2019 [cit. 18.03.2019]. Dostupné z: <http://diabetickaasociace.cz/co-je-diabetes/data-o-diabetu-v-cr/>
2. DIABETES ESTIMATES. In: *Diabetes Atlas-8<sup>th</sup> edition* [online]. International Diabetes Federation ©2019 [cit.10.03.2019]. Dostupné z: <http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>
3. MAJOROV, Alexander Y. Stav inzulínové rezistence ve vývoji diabetu 2. typu. Moskva, 2009. Disertační práce. FGU Endokrinologicheskii nauchnyi center Rosmedtekhnologii.
4. CLAUS, D. Diabetes- mellitus- clinical manifestations. *Nervenheilkunde*. 1993, **12**(3), 115-120. ISSN 0722-1541
5. MAŽAR, Petar, ZORC, Branka, PERKOVIĆ, Ivana. Oral antidiabetics. *Farmaceutski Glasnik*. 2011, **67**(3), 145-160. ISSN 0014-8202
6. SECHSER, Tomáš. Nová perorální antidiabetika. *Interní medicína pro praxi*. 2003, **5**(3), 115-119. ISSN 1212-7299
7. CAMPBELL, R. Keith, WHITE, John R., SAULIE, Barbara A. Metformin: A new oral biguanide. *Clinical Therapeutics*. 1996, **18**(3), 360-371. ISSN 0149-2918
8. DUNN, Christopher J., PETERS, David H. Metformin – a review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes-mellitus. *Drugs*. 1995, **49**(5), 721-749. ISSN 0012-6667
9. LAI, Edward P.C., FENG, Sherry Y. Solid phase extraction – Non-aqueous capillary electrophoresis for determination of metformin, phenformin and glyburide in human plasma. *Journal of chromatography B – Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2006, **843**(1), 94-99. ISSN 1570-0232
10. ALBERTI, K.G.G.M. Gliclazide – metabolic and vascular effects – a perspective. *Diabetes & Metabolism*. 1994, **20**(3), 341-348. ISSN 1262-3636
11. KVAPIL, Milan. Nová perorální antidiabetika mění strategii léčby diabetu. *Interní medicína pro praxi*. 2002, **4**(1), 19-22. ISSN 1212-7299
12. PERUŠIČOVÁ, Jindřiška. Perorální antidiabetika – současnost. *Ambulantná terapie*. 2009, **7**(1), 44-47. ISSN 1336-6750

13. ŠVANCARA, Ivan. *Kapalinová chromatografie* [Přednáška]. Pardubice: Univerzita Pardubice, FCHT, Katedra analytické chemie, 19. listopadu 2018.
14. KUMASAKA, Kenichi, KOJIMA, Takashi, HONDA, Hideo, DOI, Kayo. Screening and quantitative analysis for sulfonylurea-type oral antidiabetic agents in adulterated health food using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Health Science*. 2005, **51**(4), 453-460. ISSN 1344- 9702
15. SHAODONG, Jia, LEE, Woojung H., EE, Jiwon, PARK, Jeonghill, KWON, Sungwon, LEE, Jeongmi. Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(4), 973-978. ISSN 0731-7085
16. ABURUZ, Salah M., MILLERSHIP, Jeffrey S., MCELNAY, James. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimiperide in plasma. *Journal of Chromatography B – Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005, **817**(2), 277-286. ISSN 1570-0232
17. GUMIENICZEK, Anna, BERECKA, Anna, PIETRAS, Rafal, SLEBIODA, Marek. Stress degradation study of two oral antidiabetics, gliclazide and glipizide, and chemical analysis by LC and LC/MS methods. *Central European Journal of Chemistry*. 2014, **12**(1), 80-89. ISSN 1895-1066
18. THEVIS, Mario, GEYER, Hans, SCHANZER, Wilhelm. Identification of oral antidiabetics and their metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry – a matter for doping control analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005, **19**(7), 928-936. ISSN 0951-4198
19. GUMIENICZEK, Anna, HOPKALA, Hanna, BERECKA, Anna. Reversed-phase thin-layer chromatography of three new oral antidiabetics and densitometric determination of pioglitazone. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2004, **27**(13), 2057-2070. ISSN 1082-6076
20. YARDIMCI, Ceren, OZALTIN, Nuran. Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in

- pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **549**(1-2), 88-95. ISSN 0003-2670
21. KU, Yoe R., CHAG, Li Y., HO, Li K., LIN, Jer H. Analysis of synthetic anti-diabetic drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, **33**(2), 329-334. ISSN 0731-7085
  22. ROCHE, Matthew E., ODA, Robert P., LAWSON, George M., LANDERS, James P. Capillary electrophoretic detection of metabolites in the urine of patients receiving hypoglycemic drug therapy. *Electrophoresis*. 1997, **18**(10), 1865-1874. ISSN 0173-0835
  23. STRAUSBAUCH, Michael A., XU, S. J., FERGUSON, Jayne E., NUNEZ, Megan E., MACHACEK, Dwaine A., LAWSON, George M., WETTSTEIN, Peter J., LANDERS, James P. Concentration and separation of hypoglycemic drugs using solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1995, **717**(1-2), 279- 291. ISSN 0021- 9673
  24. KARCOVA, L.A. *Problemy analytičeskoy chimii, Tom 18, Kapiljarnyj elektroforez*. Moskva: Nauka, 2014. [cit. 15.03.2019]. ISBN 978-5-02-039087-4. Dostupné z: [https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o\\_1920230#1](https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_1920230#1)
  25. Kapilární elektroforéza. *Docplayer* [online]. DocPlayer, ©2019 [cit. 16.03.2019]. Dostupné z: <https://docplayer.ru/38228490-5-kapillyarnyy-elektroforez.html>
  26. HOLTKAMP, Hannah U., HARTINGER, Christian G. Capillary electrophoresis in metallodrug development. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2015, **16**, 16-22. ISSN 1740-6749
  27. MÁDR, Aleš. *Využití kapilární elektroforézy při studiu metabolismu léčiv*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Ústav biochemie.
  28. MIČÍKOVÁ, Ivana. *Studium metabolismu xenobiotik pomocí moderních elektromigračních metod*. Brno, 2007. Diplomová práce. Masarykova Univerzita. Přírodovědecká fakulta. Katedra biochemie.
  29. KHOMOV, Y. A., FOMIN, A. N. Capillary electrophoresis as the effective analytical method. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2012, 5. ISSN 2070-7428

30. Joule-Lenzův zákon. Definice, vzorec, fyzikální význam. *Pue8* [online]. Vse ob energetike, elektrotechnike i elektronike., ©2019 [cit. 18.03.2019]. Dostupné z: <https://pue8.ru/elektrotehnik/823-zakon-dzhoulya-lentsa-opredelenie-formula-fizicheskij-smysl.html>
31. SAHOTA, Rachhpal S., KHALEDI, Morteza G. Nonaquesus capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1994, **66**(7), 1141-1146. ISSN 0003-2700
32. Kapilljarnyj elektroforez. Eurasiancommission.org [online]. Eurasiiskaya Narodnaya Komissia, ©2019 [cit. 18.03.2019]. Dostupné z: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/LS1/Documents/2.47%20Капиллярный%20электрофорез.pdf>
33. BEKKE, Yurgen. *Chromatografija. Instrumentalnyj analiz: metody chromatografii i kapillarnogo elektroforeza*. Moskva: Technosfera, 2009. ISBN 978-5-94836-212-0

## PŘÍLOHY

Výsledky analýzy reálných vzorků

Tabulka 10: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 500.

způsob výpočtu	zjištěná koncentrace	konc. udávaná výrobcem	výtěžnost
kalibrační křivka	380,5 ± 4,0 mg/tab	390 mg/tab	97,6 ± 1,0 %
st. přídavek horní kolona	394,6 ± 5,4 mg/tab		101,2 ± 1,4 %
st. přídavek dolní kolona	422,8 ± 5,6 mg/tab		108,4 ± 1,4 %

Tabulka 11: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 850.

způsob výpočtu	zjištěná koncentrace	konc. udávaná výrobcem	výtěžnost
kalibrační křivka	582,5 ± 2,2 mg/tab	662,9 mg/tab	87,9 ± 0,3 %
st. přídavek horní kolona	640,1 ± 6,0 mg/tab		96,6 ± 0,9 %
st. přídavek dolní kolona	579,1 ± 5,4 mg/tab		87,4 ± 0,8 %

Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Siofor 1000.

způsob výpočtu	zjištěná koncentrace	konc. udávaná výrobcem	výtěžnost
kalibrační křivka	704,5 ± 0,5 mg/tab	780 mg/tab	90,3 ± 0,1 %
st. přídavek horní kolona	760,8 ± 2,7 mg/tab		97,5 ± 0,4 %
st. přídavek dolní kolona	685,2 ± 2,4 mg/tab		87,8 ± 0,3 %

Tabulka 13: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Stadamet 850.

způsob výpočtu	zjištěná koncentrace	konc. udávaná výrobcem	výtěžnost
kalibrační křivka	609,6 ± 3,8 mg/tab	662,9 mg/tab	92,0 ± 0,6 %
st. přídavek horní kolona	639,5 ± 3,1 mg/tab		96,5 ± 0,5 %
st. přídavek dolní kolona	640,4 ± 3,1 mg/tab		96,6 ± 0,5 %

Tabulka 14: Výsledky stanovení obsahu metforminu v přípravku Glucophage XR 500 mg.

způsob výpočtu	zjištěná koncentrace	konc. udávaná výrobcem	výtěžnost
kalibrační křivka	326,0 ± 1,0 mg/tab	390 mg/tab	83,6 ± 0,3 %
st. přídavek horní kolona	356,1 ± 2,7 mg/tab		91,3 ± 0,7 %
st. přídavek dolní kolona	341,1 ± 2,6 mg/tab		87,5 ± 0,7 %

Volba vedoucího elektrolytu. Vliv pH vedoucího elektrolytu na signál detektoru a délku zóny

Tabulka 15: pH vedoucího elektrolytu.

metformin										
pH	rozdíl signálů X-LE (mV)			průměr	sm. odchylka	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka
6	2780	2769	2747	2765	17	72,1	72,8	71,6	72,2	0,6
5,5	2390	2368	2343	2367	24	69,4	68,94	68,6	69,0	0,4
5	1925	1915	1900	1913	13	69,9	70,1	70,8	70,3	0,5
4,5	1386	1364	1351	1367	18	86,3	82,95	85,25	84,8	1,7
4	925	924	912	920	7	147,06	146,84	143,11	145,7	2,2
buformin										
pH	rozdíl signálů X-LE (mV)			průměr	sm. odchylka	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka
6	3412	3419	3497	3443	47	68,8	68,8	69,9	69,2	0,6
5,5	2955	2923	2940	2939	16	70	73,35	72,85	72,1	1,8
5	2349	2353	2335	2346	9	72,05	70,4	70,2	70,9	1,0
4,5	1597	1604	1602	1601	4	92,8	92,7	93,3	92,9	0,3
4	926	922	916	921	5	195,24	183,25	190,23	189,6	6,0
phenformin										
pH	rozdíl signálů X-LE (mV)			průměr	sm. odchylka	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka
6	3945	3957	3995	3966	26	93,1	91,7	92,8	92,5	0,7
5,5	3295	3297	3279	3290	10	92,75	91,1	90,05	91,3	1,4
5	2656	2651	2647	2651	5	92,75	93,05	92,45	92,8	0,3
4,5	1861	1864	1865	1863	2	125,75	123,85	123,1	124,2	1,4
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
koncový elektrolyt (TE)										
pH	rozdíl signálů X-LE (mV)			průměr	sm. odchylka					
6	8271	8224	8136	8210	69					
5,5	7122	6958		7040	116					
5	4797	4784		4791	9					
4,5	2542	2538	2542	2541	2					
4	873	860		867	9					

## Kalibrační křivka

Tabulka 16: Kalibrační závislost.

<b>metformin</b>						
koncentrace (mg/l)	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka	RSD (%)
3,24	8,00	7,95	7,85	7,93	0,08	0,96
6,49	12,45	12,25	12,25	12,32	0,12	0,94
16,22	22,80	23,15	22,85	22,93	0,19	0,83
32,44	36,60	36,50	35,85	36,32	0,41	1,12
81,10	88,20	88,40		88,30	0,14	0,16
162,20	171,55	171,95		171,75	0,28	0,16
<b>buformin</b>						
koncentrace (mg/l)	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka	RSD (%)
3,34	10,50	9,80	9,50	9,93	0,51	5,17
6,69	13,10	12,95	12,85	12,97	0,13	0,97
16,72	22,25	22,50	22,10	22,28	0,20	0,91
33,44	34,65	34,40	33,80	34,28	0,44	1,27
83,60	81,95	81,15		81,55	0,57	0,69
167,20	165,64	162,94		164,29	1,91	1,16
<b>phenformin</b>						
koncentrace (mg/l)	délka zóny (s)			průměr	sm. odchylka	RSD (%)
3,52	7,75	7,60	7,45	7,60	0,15	1,97
7,03	11,55	11,15	11,15	11,28	0,23	2,05
17,58	17,80	18,10	17,75	17,88	0,19	1,06
35,16	27,20	27,20	26,60	27,00	0,35	1,28
87,89	66,95	66,30		66,63	0,46	0,69
175,80	122,01	122,72		122,37	0,50	0,41

## Analýza reálných vzorků

Tabulka 17: Analýza reálných vzorků.

siofor 500											
	konc (mg/l)	délka zóny dolní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)	délka zóny horní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)
bez přídavku	0	44.35	43.70	44.03	0.46	1.04	6.80	6.80	6.80	0.00	0.00
1. st. příd.	11.7	57.15	56.05	56.60	0.78	1.37	8.75	8.55	8.65	0.14	1.63
2. st. příd.	23.4	68.60	67.35	67.98	0.88	1.30	11.10	10.55	10.83	0.39	3.59
siofor 850											
	konc (mg/l)	délka zóny dolní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)	délka zóny horní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)
bez přídavku	0	64.60	64.95	64.78	0.25	0.38	9.95	10.75	10.35	0.57	5.47
1. st. příd.	11.7	78.00	79.00	78.50	0.71	0.90	12.10	12.55	12.33	0.32	2.58
2. st. příd.	23.4	91.65	90.45	91.05	0.85	0.93	14.30	14.00	14.15	0.21	1.50
siofor 1000											
	konc (mg/l)	délka zóny dolní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)	délka zóny horní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)
bez přídavku	0	76.90	77.70	77.30	0.57	0.73	12.00	12.15	12.08	0.11	0.88
1. st. příd.	11.7	91.15	90.70	90.93	0.32	0.35	14.05	13.50	13.78	0.39	2.82
2. st. příd.	23.4	103.95	103.55	103.75	0.28	0.27	15.85	15.70	15.78	0.11	0.67
stadamet 850											
	konc (mg/l)	délka zóny dolní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)	délka zóny horní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)
bez přídavku	0	67.85	67.25	67.55	0.42	0.63	10.70	10.55	10.63	0.11	1.00
1. st. příd.	11.7	81.85	81.30	81.58	0.39	0.48	12.70	12.85	12.78	0.11	0.83
2. st. příd.	23.4	92.30	92.55	92.43	0.18	0.19	14.70	14.40	14.55	0.21	1.46
glucophage XR 500											
	konc (mg/l)	délka zóny dolní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)	délka zóny horní kolona (s)		průměr	sm. odch.	RSD (%)
bez přídavku	0	38.50	38.35	38.43	0.11	0.28	5.65	5.80	5.73	0.11	1.85
1. st. příd.	11.7	51.30	51.85	51.58	0.39	0.75	7.80	7.95	7.88	0.11	1.35
2. st. příd.	23.4	64.90	64.65	64.78	0.18	0.27	9.75	9.35	9.55	0.28	2.96