

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie



**ANALÝZA PROTICHŘIPKOVÝCH LÉČIV S VYUŽITÍM  
ELEKTROFORETICKÝCH METOD  
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009

DRAHOMÍRA KUBÍKOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie



**ANALÝZA PROTICHŘIPKOVÝCH LÉČIV S VYUŽITÍM  
ELEKTROFORETICKÝCH METOD  
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Drahomíra Kubíková.....

Velké poděkování patří Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za odborné vedení  
mojí diplomové práce, za poskytnuté konzultace, cenné rady a připomínky. Děkuji též  
pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícné jednání.

## ABSTRAKT

V této práci je zachycen vývoj metody pro separaci a stanovení paracetamolu (PA), kofeinu (CO), kyseliny askorbové (AA) a fenylefrinu (FE) v léčivém přípravku pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC). Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (31,2 cm x 50  $\mu$ m, efektivní délka 21 cm) při 20 kV. Detekce probíhala při vlnových délkách 190 nm a 265 nm. Optimální základní elektrolyt měl složení: 100 mM kyselina boritá s obsahem 100 mM sodecylsíranu sodného (SDS) v 10 % methanolu. pH\* elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 7,8 pomocí 50 mM tetraboritanu sodného. Jako vnitřní standard byl použit methylparaben (MP). Validovaná metoda byla úspěšně použita pro analýzu léčivého přípravku (Coldrex tbl.).

## **ABSTRACT**

In this study, micellar elektrokinetic chromatography method (MEKC) was developed for the determination of paracetamol (PA), caffeine (CO), ascorbic acid (AA) and phenylephrine (FE) in a pharmaceutical preparation. Separation was carried out in a fused silica capillary (31,2 cm x 50  $\mu\text{m}$  i.d. effective length 21 cm) at 20 kV with UV detection at 190 nm and 265 nm. Optimized background electrolyte (BGE) was 100 mM boric acid containing 100 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) as a surfactant and 10 % (v/v) of methanol.  $\text{pH}^*$  7,8 was found to be optimal (modified by 50 mM sodium tetraborate). Methylparaben (MP) was used as internal standard. This validated method has been successfully applied for the analysis of commercially available pharmaceutical product (Coldrex tbl.).

## 1. ÚVOD

Kapilární elektroforéza je účinná separační metoda, která využívá rozdílné migrace látek iontového charakteru v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. (1) Patří, společně s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a plynovou chromatografií, k nejvíce používaným separačním technikám. Toto postavení získala pro své nesporné výhody, ke kterým patří v první řadě vysoká rychlost analýzy a separační účinnost, minimální potřebné množství vzorku, malá spotřeba roztoků elektrolytů a z toho vyplývající nízké náklady na provoz. (2) K dalším přednostem kapilární elektroforézy se řadí také možnost automatizace, detekce přímo na kapiláře a snadná úprava selektivity metody změnami v chemickém složení pracovního elektrolytu. (3)

Umožňuje separaci i velmi složitých směsí látek. Svoje uplatnění nachází při analýzách anorganických a organických i biologických vzorků. (1)

Jednou z metod kapilární elektroforézy je micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Jde o kombinovanou separační techniku, která využívá jevy elektromigrační i princip chromatografický. Je použitelná k analýze kationů, anionů a neutrálních látek včetně analýzy léčiv. (4,5)

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

Kapilární elektroforéza je elektromigrační dělicí metoda založená na rozdílné rychlosti putování jednotlivých složek analyzované směsi v elektrickém poli. Lze ji aplikovat na látky povahy elektrolytů tvořené nízkomolekulárními ionty a na systémy elektricky nabitých koloidních částic. Migračním prostředím je vodivý roztok elektrolytů, který je v kontaktu s přivodními elektrodami proudového zdroje. Hybnou silou, která uvádí částice do pohybu, je intenzita elektrického pole  $E$ , vyjádřená gradientem napětí v jednotkách  $V \cdot m^{-1}$ . Sílu působící pohyb jednotlivé částice vystihuje součin intenzity elektrického pole a velikosti náboje částice. Proti pohybu částic působí tření v kapalném prostředí podmíněné jeho viskozitou. Třecí síla při pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). Skutečná rychlost migrace je výsledkem interakce těchto protichůdných vlivů. Pokud je u jednotlivých složek rozdílná, dojde k jejich separaci. (6)

Mezi základní varianty kapilární elektroforézy patří:

- zónová elektroforéza
- izotachoforéza
- izoelektrická fokusace
- micelární elektrokinetická chromatografie
- kapilární elektrochromatografie
- mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
- kapilární gelová elektroforéza

Separační principy jsou u jednotlivých variant odlišné. V zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází k separaci na základě rozdílů efektivních pohyblivostí, v izoelektrické fokusaci na základě rozdílů v izoelektrických bodech a v micelární elektrokinetické chromatografii, kapilární elektrochromatografii a mikroemulzní elektrokinetické chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a pseudostacionární fází. (7,8) V případě kapilární gelové elektroforézy jsou složky vzorku separovány podle velikosti a tvaru molekuly. (9)

Separace probíhá v kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapěťového zdroje, které vytvářejí pole nutné pro separaci. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá analytický signál, který je dále zpracován počítačem. (7)

### 2.1.1. Elektroforetická pohyblivost

Při elektroforéze dochází k pohybu elektricky nabitých částic v roztoku působením elektrického pole. Směr pohybu je dán znaménkem jejich náboje a orientací elektrického pole. Rychlost tohoto pohybu je úměrná intenzitě použitého elektrického pole: (6,7)

$$v = u \cdot E$$

$v$  – rychlost elektroforetického pohybu [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$u$  – elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$E$  – intenzita elektrického pole [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ]

Elektroforetická pohyblivost  $u$  vyjadřuje rychlost pohybu částice nebo iontu v jednotkovém elektrickém poli. Roste úměrně s nábojem a klesá s velikostí částice. Pohyblivostem bývá přisuzováno znaménko v souladu s nábojem příslušného iontu. (7)

### 2.1.2. Iontová pohyblivost

Kolem každého iontu v roztoku vytvářejí ionty opačného znaménka tzv. iontovou atmosféru. Interakce mezi ionty ovlivňuje výslednou pohyblivost sledovaného iontu – s rostoucí koncentrací elektrolytu elektroforetická pohyblivost iontu klesá. Když extrapolujeme koncentrační závislost elektroforetické pohyblivosti na nulovou iontovou sílu, získáme pohyblivost iontovou  $u_0$ . Ta se zvyšuje s rostoucí teplotou (zvýšení teploty o  $1^\circ\text{C}$  vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%). (7)

### 2.1.3. Skutečná pohyblivost

Skutečná pohyblivost je pohyblivost v reálném prostředí. Je zpravidla nižší než absolutní ( $u_0$ ), což je dané mimo jiné vzájemnými interakcemi iontů v konečně zředěných roztocích. (6)

### 2.1.4. Efektivní pohyblivost

Látky povahy slabých kyselin a bazí se v roztoku vyskytují ve dvou formách. Ve formě iontů s příslušnou elektroforetickou pohyblivostí a ve formě neutrálních molekul, které nejsou schopny elektroforetický migrovat. Obě formy jsou ve směsi zastoupeny v určitém poměru, vyjádřeném např. stupněm disociace. (6) Protože ionizační rovnováha probíhá nepoměrně rychleji než elektromigrace, (7) nemůže dojít k rozdělení rovnovážné směsi na nepohyblivé molekuly a pohyblivé ionty. Směs putuje jednotnou rychlostí, která je úměrná stupni disociace. (6) Výsledná pohyblivost se nazývá efektivní pohyblivost  $\bar{u}$  a je dána vztahem:

$$\bar{u} = \sum_{i=1}^n u_i \cdot x_i$$

$u_i$  – pohyblivost jednotlivých iontových forem látky

$x_i$  – molární zlomky

Volbou pH lze tedy upravit složení rovnovážné směsi a tím regulovat pohyblivost podle potřeby od nulové až po plnou iontovou. Úprava pH je tedy účinný prostředek k dosažení optimálního dělení směsí kyselých nebo bazických látek. (6)  
Závislost efektivní pohyblivosti slabých jednosytných kyselin vyjadřuje vztah:

$$\bar{u} = \frac{u}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Pro slabé jednosytné baze je člen (pKa – pH) nahrazen členem (pH – pKa). (10)

Podobně lze popsat i migrační chování komplexů. Pokud ustavení rovnovážného stavu probíhá rychlostí srovnatelnou nebo nižší než je rychlost elektromigrace (př. keto a enol formy), je možné jednotlivé formy téže látky od sebe oddělit. (7)

### 2.1.5. Migrační čas

Elektroforetická pohyblivost nelze experimentálně přímo zjistit. Lze ji však vypočítat z migračního času  $t_m$ , tj. času který je nutný pro migraci látky z místa nástřiku do detekční cely. Pokud je elektromigrace provázena hydrodynamickým tokem (např. důsledkem elektroosmózy), je třeba znát i migrační čas nenabitých částic  $t_0$ . Elektroforetická pohyblivost se pak vypočte podle vztahu: (7)

$$u = \frac{l_t \cdot l_s}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right)$$

$l_t$  – celková délka kapiláry [m]

$l_s$  – efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku po detektor) [m]

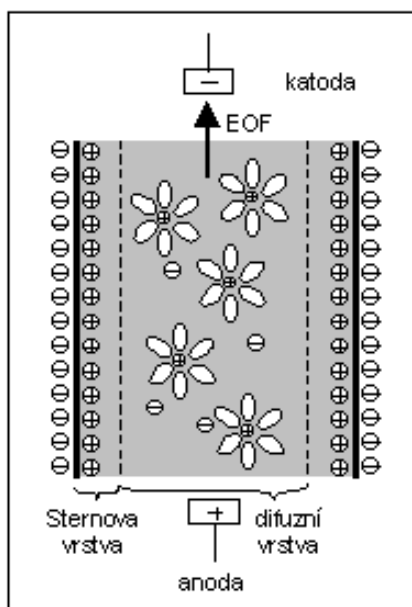
$U$  – pracovní napětí [V]

$t_m$  – migrační čas látky [s]

$t_0$  – migrační čas nenabitých částic [s]

### 2.1.6. Elektroosmotický tok (EOF)

Kromě elektroforetického pohybu je častým transportním jevem v kapilárních elektromigračních metodách elektroosmotický tok. (4) Je to objemový tok kapaliny v kapiláře. (3) Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalná fáze u vnitřní stěny kapiláry (Obr.1). Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též zeta potenciál  $\zeta$ . Působením stejnosměrného pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale prostřednictvím vnitřního tření v kapalině i veškerý roztok přítomný v kapiláře. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy. (4)



Obr. 1 Vznik elektroosmotického toku (11)

Velikost EOF je závislá na velikosti zeta potenciálu elektrické dvojvrstvy vytvořené na rozhraní proudící kapaliny a stěny kapiláry. Rychlost EOF je dána vztahem: (12)

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta}$$

$\varepsilon$  – permitivita roztoku [ $C^2 J^{-1} m^{-1}$ ]

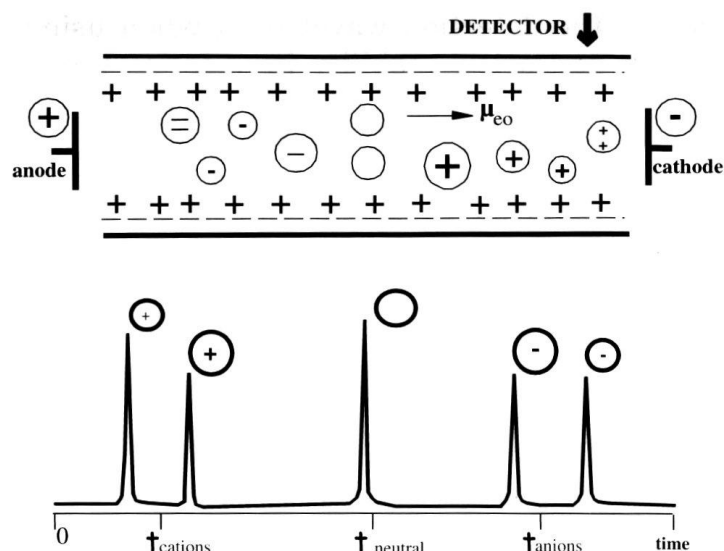
$\zeta$  – elektrokinetický potenciál [V]

$\eta$  – viskozita roztoku [N.s.m]

Zeta potenciál je určen povrchovým nábojem stěny kapiláry. Jelikož tento náboj silně závisí na pH, mění se velikost EOF s pH. Při vysokém pH, kdy jsou silanolové skupiny převážně deprotonizované, je EOF značně větší než při nízkém pH, kdy jsou tyto skupiny protonizované. EOF je významný od pH větší než 4. Zeta potenciál je také závislý na iontové síle pufru. Rostoucí iontová síla způsobuje kompresi dvojvrstvy, pokles zeta potenciálu a redukci EOF. (3)

Z praktického hlediska může být přítomnost EOF výhodná, protože způsobuje pohyb téměř všech látek stejným směrem bez ohledu na náboj. Za normálních podmínek (tj. negativně nabitý povrch kapiláry) EOF směřuje od anody ke katodě. Anionty jsou unášeny směrem ke katodě, jelikož velikost toku může být i víc než o řád větší než jejich elektroforetické mobility. Kationty, neutrální molekuly a anionty mohou být tudíž analyzovány zároveň, jelikož migrují stejným směrem. Kationty migrují nejrychleji, neboť elektroforetické přitahování směrem ke katodě a EOF jsou ve stejném směru, neutrální látky jsou všechny nesené rychlostí EOF, ale nejsou od sebe separovány, anionty migrují nejpomaleji, protože jsou sice nesené ke katodě, ale přitahovány jsou k anodě (Obr. 2).

Někdy je ovšem nutné EOF eliminovat. Proto se modifikuje vnitřní povrch kapiláry, blokují se volné silanolové skupiny zodpovědné za EOF. Používá se dynamické pokrývání (aditivy v pufru) nebo kovalentní pokrývání. Toto pokrývání může zvýšit, snížit nebo obrátit povrchový náboj a tím EOF. (3)



Obr. 2 Migrace elektricky nabitých a neutrálních látek v kapiláře působením EOF (12)

### 2.1.7. Děje ovlivňující elektroforetickou pohyblivost

Chceme-li separovat všechny nebo alespoň hlavní komponenty vzorku, je třeba dosáhnout co největších rozdílů v jejich migračních časech. Nejjednodušší cestou je použití delší kapiláry. Tím se ovšem výrazně prodlužuje doba analýzy, a proto se k tomuto kroku přistupuje až po vyčerpání dalších možností. Snahou je najít takové podmínky, při nichž jsou rozdíly elektroforetických pohyblivostí mezi sousedními zónami největší. Toho lze dosáhnout změnou pH pracovního elektrolytu, přidávkem vhodného komplexujícího činidla, látek vytvářejících hostitelské komplexy, detergentů, přidávkem nevodného rozpouštědla nebo použitím gelu. (7)

#### 2.1.7.1. Vliv pH pracovního elektrolytu

Při elektroforéze slabých kyselin a bazí je nejjednodušším krokem vedoucím ke změně elektroforetické pohyblivosti změna pH pracovního elektrolytu. Se změnou pH dochází ke změně ionizace a tím i ke změně efektivní pohyblivosti dané látky. Při hledání optimálního pH pro separaci určitých látek je třeba vycházet ze závislosti elektromigračních pohyblivostí těchto látek na pH pracovního elektrolytu. Vhodné pH je potom takové, při kterém je rozdíl pohyblivostí největší. (7)

#### 2.1.7.2. Tvorba komplexů

U analytů, které mohou vytvářet komplexy, může dojít ke zlepšení jejich separace přidávkem iontu kovu či ligandu k tlumivému roztoku. Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů závisí především na druhu kovu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivní analýze. (13) Tvorbu komplexů lze využít pro zlepšení

separace kovů, kdy se hledá vyhovující ligand a jeho koncentrace, nebo analogicky pro separaci ligandů, kdy se hledá vhodný kov. (7)

### **2.1.7.3. Tvorba iontových asociátů**

Tvorba iontových asociátů se využívá ke snížení rychlosti migrace analytů. (13) Využívají se především kyseliny a zásady o vyšším náboji, neboť čím vyšší je náboj interagujících iontů, tím silnější jsou interakce a tím výraznější je snížení pohyblivosti. (7) Při analýze aniontů se na tvorbě iontových asociátů mohou podílet např. di- a trialkylaminy, tetraethylamoniové soli, cetyltrimethylamonium bromid, opticky aktivní aminy jako je chinin a chinidin nebo polymerní kationty jako diethylaminoethyl-dextrin. Při separaci kationtů tvorbou iontových asociátů se mohou uplatnit jak anorganické látky, tak i alkyfosfáty, alkylsulfonáty, alkylsulfáty a opticky aktivní látky jako je např. dibutyltartarát. (13)

### **2.1.7.4. Tvorba hostitelských komplexů**

Využívány jsou separace v přítomnosti cyklodextrinů. Cyklodextriny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) jsou cyklické oligosacharidy tvořené 6-8 molekulami glukózy, které vytvářejí dutý válec, na jehož obvodu jsou hydroxylové skupiny a vnitřní jádro zůstává hydrofobní. Do tohoto jádra mohou vstupovat hydrofobní skupiny a vznikají tak různě pevné hostitelské komplexy. Poněvadž hydroxylové skupiny na povrchu jsou chirální, vytvářejí cyklodextriny s chirálními separandy komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich separaci. Podobné komplexy mohou vytvářet i další látky, např. crown ethery, což jsou opět cyklické sloučeniny. (7)

### **2.1.7.5. Vliv nevodných rozpouštědel**

Přídavkem nevodného rozpouštědla k pracovnímu elektrolytu se mění solvatace separovaných iontů a viskozita elektrolytu. Tím dochází k ovlivnění iontové pohyblivosti, což může přispět ke zlepšení separace. Nevodné rozpouštědlo má také vliv na EOF. Nejčastěji se využívá methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril a dimethylsulfoxid. (7)

### **2.1.7.6. Vliv síťujícího prostředí**

Síťující prostředí se využívá pro separaci polymerů, které se liší molekulovou hmotností, avšak ne hustotou elektrického náboje. Síťujícím prostředím s největší tradicí je polyakrylamidový gel. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší molekuly jsou při migraci síťujícím prostředím více zpomalovány. Dnes jsou gelové kapiláry

nahrazovány roztoky lineárních polymerů, které vytvářejí síť. Nejčastěji používanými jsou deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a další. (7)

#### **2.1.7.7. Vliv ionogenních smáčedel**

Přídavek ionogenních smáčedel se využívá např. při SDS elektroforéze bílkovin, kdy je cílem vyrovnání nábojové hustoty mezi jednotlivými separandy tak, aby byla separace ovlivněna pouze molekulovými hmotnostmi proteinů.

Po překročení kritické micelární koncentrace začnou ze smáčedel vznikat micely. Hydrofobicita jádra ionogenních micel umožňuje vstup nepolárních látek a díky náboji micel i jejich elektroforetickou migraci. To je podstatou micelární elektrokinetické chromatografie. (7)

#### **2.1.8. Děje ovlivňující separaci**

##### **2.1.8.1. Difúze**

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré ohraničení. Koncentrace látek v zónách je nerovnoměrná (koncentrační profil v zóně nabývá tvaru Gaussovy křivky – koncentrace látky je uprostřed zóny maximální a k obvodu klesá). Vzdálenost, kterou urazí difúzí průměrný ion za dobu  $t$ , se označuje  $\sigma$  a vypočte se podle vztahu:

$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$

$D$  – difúzní koeficient

$\sigma^2$  se nazývá rozptyl

Účinnost elektroforetické separace lze v CZE i MEKC vyjádřit počtem dosažených teoretických pater  $N$ :

$$N = \frac{u \cdot U}{2 \cdot D}$$

$u$  – elektroforetická pohyblivost

$U$  – napětí

Vzhledem k přímé úměře mezi pohyblivostí a difúzním koeficientem bude menší disperze (a větší počet teoretických pater) u větších molekul s malým difúzním koeficientem. (7)

### **2.1.8.2. Elektromigrační disperze**

Rozdíl v pohyblivostech mezi analytem a spoluiontem pracovního elektrolytu se projevuje asymetrií elektroforetického píku. Pokud má analyt větší pohyblivost než spoluion, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Jestliže ionty na jeho čelním rozhraní opouštějí difúzní zónu, dostávají se do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší než by bylo při vlivu prosté difúze. Naopak na zadním rozhraní se ionty opouštějící zónu dostávají do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, jejich migrační rychlost se zvýší a jsou vráceny zpět. Dochází tak k zaostřování zadního rozhraní zóny. Analogicky se tvoří asymetrická zóna při migraci analytu o menší pohyblivosti než má spoluion pracovního elektrolytu (čelní rozhraní je ostré a zadní je difúzní). Zóna iontu, který má stejnou pohyblivost jako spoluion pracovního elektrolytu, nebude elektromigrační disperzí ovlivněna. Čím větší je rozdíl mezi pohyblivostmi analytu a spoluiontu, tím je zóna více deformovaná. (7)

### **2.1.8.3. Jouleovův ohřev**

Rychlost separace a separační účinnost jsou omezovány Jouleovým teplem, které se tvoří při průchodu elektrického proudu pracovním elektrolytem. (14) Množství tepla vznikající v kapiláře je přímo úměrné vodivosti elektrolytu  $K$ , vloženému napětí  $U$  a nepřímo úměrné délce kapiláry  $L$ . Tyto závislosti vyjadřuje vztah: (13)

$$\Delta H = \frac{K \cdot U^2}{L^2}$$

Zvýšením teploty dochází ke zvýšení mobility a tím je dosaženo kratších migračních časů. (13) Při chlazení dochází ke vzniku teplotního gradientu uvnitř kapiláry s nejvyšší teplotou ve středu, což má negativní dopad na kvalitu separace. Vzhledem k teplotní závislosti pohyblivostí se ionty v ose kapiláry, kde teplota dosahuje vyšších hodnot, pohybují nejrychleji, zatímco na okraji nejpomaleji. Tento jev zaznamenává detektor jako rozšíření zóny. (7)

### **2.1.8.4. Sorpce**

Negativní vliv na kvalitu separace má i interakce iontů se stěnou kapiláry. Pokud jsou tyto interakce dostatečně silné, může dojít k úplné sorpci analytu na stěnu kapiláry, což se projeví absencí píku v elektroforeogramu, v lepším případě asymetrií píku nebo chvostováním. Sorpcím se dá předcházet tvorbou ochranného filmu na stěně kapiláry. (7)

### 2.1.8.5. Délka detekční cely

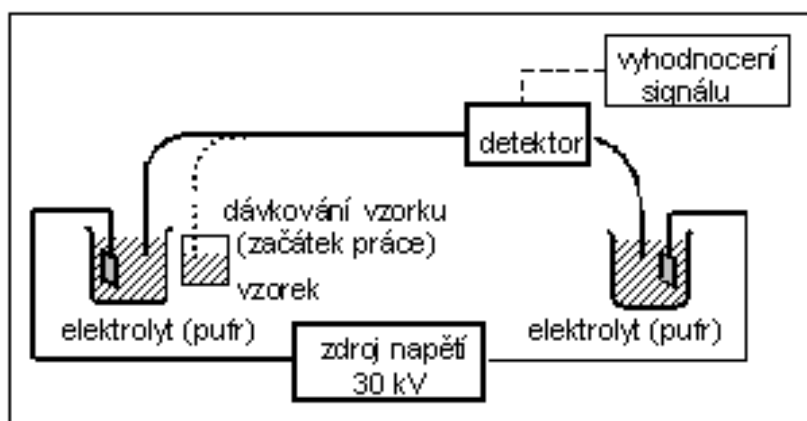
Pro zvýšení účinnosti separace je žádoucí délku detekční cely minimalizovat, to však vede ke snížení detekční citlivosti. Délka detekční cely je tedy kompromisem mezi účinností separace a citlivostí detekce. (7)

### 2.1.8.6. Délka nástřiku

Délku nástřikového pulsu je vhodné minimalizovat. (7)

### 2.1.9. Instrumentální uspořádání

Experimentální uspořádání v kapilární elektroforéze je prakticky stále stejné, liší se jen v jednotlivostech. Zařízení (Obr. 3) vždy obsahuje separační kapiláru, zdroj napětí, dávkovač vzorku, detektor a zařízení pro záznam analytického signálu. (7)



Obr. 3 Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu (11)

#### 2.1.9.1. Separační kapilára

Kapilární elektroforéza se obvykle provádí v křemenných kapilárách, které jsou z důvodu lepší mechanické pevnosti pokryty tenkou vrstvou polyimidu. Tato ochranná vrstva musí být v místě detekční cely odstraněna. Výjimečně jsou užívány kapiláry teflonové a skleněné. Vnitřní průměr kapiláry je obvykle 25 – 100  $\mu\text{m}$ , avšak je možné setkat se i s kapilárami o vnitřním průměru pod 1  $\mu\text{m}$ . Délka kapiláry dosahuje obvykle 20 – 100 cm, ale volí se s přihlédnutím k charakteru analyzovaného vzorku. Rozlišujeme mezi celkovou délkou kapiláry  $l_t$  a užitečnou (separační) délkou kapiláry  $l_s$ , která představuje vzdálenost od místa nástřiku vzorku po detekční celu.

Pro zahájení elektroforetického děje musí být oba konce kapiláry ponořeny do elektrodových nádobek naplněných elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapěťového zdroje v rozsahu 20 – 30 kV, které vytváří elektrické pole nutné k separaci. Vyšší vložené napětí, které by mělo teoreticky vést ke zkrácení doby

analýzy, nemá již praktický význam – dochází totiž k ionizaci vzduchu a vzniku elektrického výboje v okolí elektrod. (7)

### **2.1.9.2. Zdroj vysokého napětí**

Do zásobníků pracovního elektrolytu jsou umístěny elektrody vysokonapěťového zdroje o rozsahu 0 – 30 kV. Vyšší napětí se neuzívá kvůli nebezpečí ionizace vzduchu a elektrických výbojů. (7) Měla by zde být možnost přepínání polarity elektrod. (3)

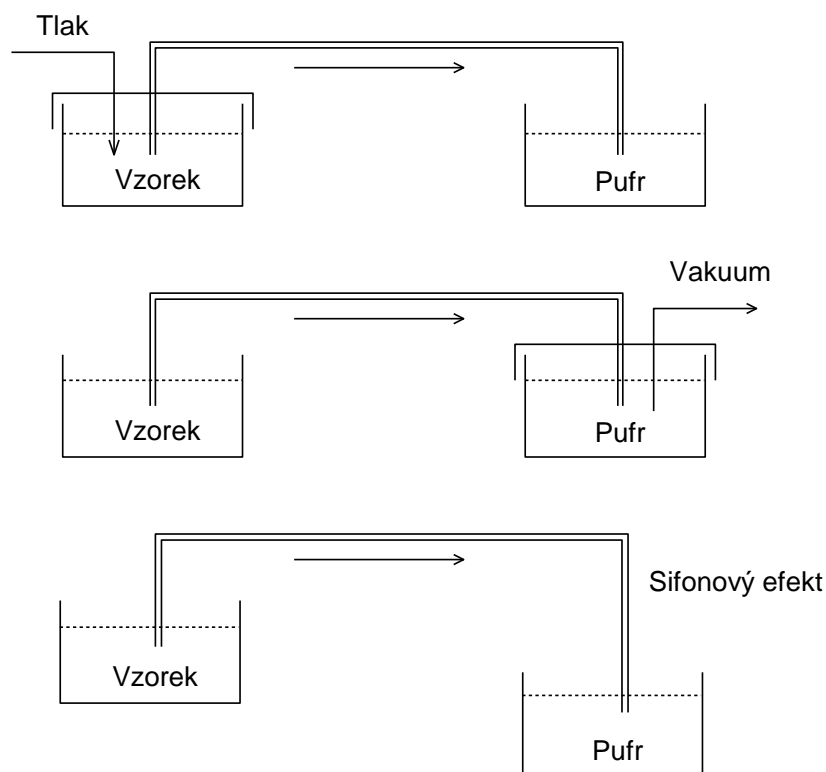
### **2.1.9.3. Dávkování vzorku**

Dávkování vzorku do kapiláry má vliv na kvantitativní výsledky měření. Nejběžnější je dávkování hydrodynamické a elektrokinetické (Obr. 4).

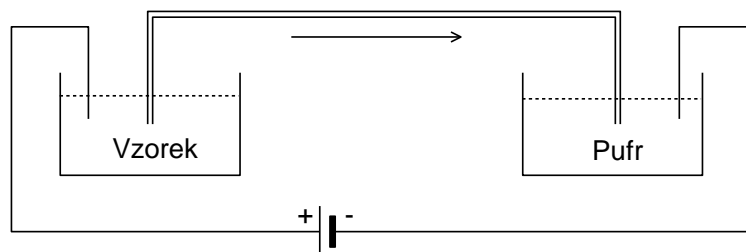
Hydrodynamické dávkování spočívá ve vtlačování úzkého sloupce roztoku vzorku do kapiláry vlivem tlakových rozdílů podél kapiláry. Existují různé mechanismy pro dosažení tlakového spádu. Jedná se o aplikaci tlaku na „dávkovací“ konec kapiláry, použití vakua na distálním konci kapiláry nebo využití tzv. sifonového efektu, kdy je rezervoár se vzorkem na určitou dobu umístěn do větší výšky než výstupní zásobník. Při hydrodynamickém dávkování je množství vneseného vzorku téměř nezávislé na složení vzorku. Objem vneseného vzorku je funkcí rozměrů kapiláry, viskozity pufru v kapiláře, aplikovaného tlaku a času. Obvykle se dávkovací tlak pohybuje v rozmezí 25 – 100 mbar a čas 0,5 – 5 s. U sifonového efektu je rezervoár vzorku zdvižen o 5 – 10 cm na 10 – 30 s. (3)

Elektrokinetické (elektromigrační) dávkování spočívá v tom, že vstupní nádobka s pracovním elektrolytem je nahrazena nádobkou se vzorkem a po stanovenou dobu se aplikuje dávkovací napětí, které je několikrát nižší než pracovní. Vnesené množství je závislé na elektroforetické mobilitě jednotlivých solutů. Navíc je závislé na EOF a koncentraci vzorku. (3) Je to jediný možný způsob aplikace vzorku v kapilární gelové elektroforéze. (7)

## HYDRODYNAMICKÉ DÁVKOVÁNÍ



## ELEKTROKINETICKÉ DÁVKOVÁNÍ



Obr. 4 Dávkování vzorku v kapilární elektroforéze (3)

### 2.1.9.4. Detekce

Vhodně zvolený detektor výrazně přispívá ke správné identifikaci, neboť získaný signál je závislý na charakteru analytu. Detektor vhodný pro určitou analýzu je volen s ohledem na jeho citlivost, selektivitu, linearitu záznamu a hladinu šumu. (15)

U kapilární elektroforézy je nejběžnější detekce v on-line uspořádání. Separované látky migrují kapilárou až do detekční cely, postupně jí procházejí a jejich průchod je zaznamenán. Záznam analýzy, tj. elektroforeogram, představuje závislost odezvy detektoru na čase. (1)

Mezi nejčastější způsoby detekce se řadí UV absorpce, fluorescence, elektrochemická detekce a hmotnostní spektrometrie. (26)

### **a) UV absorpce**

UV absorpce je nejrozšířenější metodou detekce v kapilární elektroforéze. S křemennými kapilárami může být užito detekce od 200nm výše přes viditelnou oblast. (3) Ačkoli nejde o nejcitlivější detekční metodu, většina analytů obsahuje chromofory, které umožňují absorpci v UV oblasti bez předchozí derivatizace. Vzhledem k velkému počtu sloučenin absorbujících v této oblasti však dochází k častým interferencím, což vede k překrývání píků analyzovaných složek. (13) Pro identifikaci elektroforetických píků je výhodné použití diode-array detektoru, který využívá polychromatického paprsku, jenž je po průchodu kapilárou rozdělen na jednotlivé pásy, z nichž je každý detekován jednou fotodiodou. Výsledkem je trojrozměrný elektroforeogram zachycující spektrum pro každý pík. (7)

Pro látky, které v UV oblasti neabsorbují, lze použít nepřímou UV detekci. Metoda je založená na přítomnosti spoluiontu absorbujícího v UV oblasti jako hlavní součást pracovního elektrolytu. Potom zóny neabsorbujícího analytu vyvolají pokles absorpce, což se na elektroforegramu projeví jako negativní pík. Na dosažení potřebné citlivosti detekce je nutné zvolit vhodně absorbující spoluion, který má současně efektivní pohyblivost srovnatelnou s pohyblivostí stanovovaného iontu. Příklady častěji užívaných spoluiontů jsou uvedeny v Tab. 1. V takovém případě může být koncentrace analytu v jeho migrační zóně vysoká, zatímco elektromigrační disperze je zanedbatelná. (16)

Elektromigrační disperze úzce souvisí s detekcí. Je patrná především u analytů, jejichž efektivní pohyblivost se liší od pohyblivosti spoluiontu pracovního elektrolytu, vyšší koncentrace analytu v zóně zvýrazňuje elektromigrační disperzi. Elektromigrační disperze je pro různé ionty různá a na její potlačení je potřeba udržet koncentraci analytu na dostatečně nízké hladině vzhledem ke koncentraci spoluiontu pracovního elektrolytu. Potlačení elektromigrační disperze snížením koncentrace analytu klade vyšší nároky na detekční limit a citlivost detektoru. Zpravidla lze považovat elektromigrační disperzi za zanedbatelnou v případě, kdy je koncentrace stanovovaného iontu o dva řády nižší než koncentrace spoluiontu. V případě, že zvolený spoluion má efektivní pohyblivost srovnatelnou s pohyblivostí analytu, je rozmývání zón během migrace zanedbatelné, i když koncentrace analytu v zóně dosahuje velikosti koncentrace spoluiontu. (16)

Nejvyšších citlivostí bylo dosaženo za použití nízkých koncentrací spoluiontu s vysokou absorpcí při zvolené vlnové délce. (16)

Tab. 1 Používané spoliuniony pro nepřímou UV detekci aniontů v CZE (21)

Spoluion	Vlnová délka detekce (nm)	Koncentrace (mmol/l)	pH
Benzoát	228; 254	5 – 20	5,6 – 9,1
4-Methoxybenzoát	254	5	6,0; 9,37
Salicylát	220; 254	5; 20	6,0; 8,1
3,5-Dinitrobenzoát	254	1,25 – 10	3,5 – 8
1,2-Dihydroxybenzen-3,5-disulfonát	293	5	3,5 – 8,8
1,5-Naftalendisulfonát	214	3	8,1
1-Nitroso-2-naftol-6-sulfonát	254 (260)	0,5	8
Pikrát	357	2 – 10	2,5 – 12,6
Sorbát	254	5 – 6	6; 7,64; 12,2
Chromát	254; 260	1,8 - 10	2 - 12

#### **b) Fluorescence**

Fluorescence a především laserem indukovaná fluorescence je vysoce citlivá metoda. (7)

K detekci lze využít přirozenou fluorescenci, nepřímou fluorescenci, nebo fluorescenci po derivatizaci. Pouze málo sloučenin totiž obsahuje fluorofory, proto je nutná jejich derivatizace. Pomocí fluorescenčních činidel jsou tyto látky převáděny na fluoreskující sloučeniny. Mezi fluorescenční činidla patří např. dansylchlorid, fluoresceinisothiokyanát nebo fluoreskamin. (7, 26)

#### **c) Hmotnostní spektrometrie**

Kombinací kapilární elektroforézy s hmotnostně spektrometrickou detekcí vzniká metoda, která využívá migrace iontů v roztoku a ve vakuu. Pro každou látku lze získat hmotové spektrum, jež usnadňuje identifikaci píků. (7)

#### **d) Elektrochemická detekce**

Mezi způsoby elektrochemické detekce patří amperometrie, impulsní amperometrie, potenciometrie a konduktometrie.

Amperometrická detekce je velice citlivá pro analyty, které mohou být oxidovány nebo redukovány na povrchu elektrody.

Impulsní amperometrická detekce je používaný způsob detekce při stanovení karbohydrátů, thioetherů a sulfhydrolových sloučenin.

V potenciometrické a konduktometrické detekci je jako analytická odezva měřen potenciál nebo vodivost mezi dvěma elektrodami. (26)

### 2.1.10. Aplikace kapilární elektroforézy

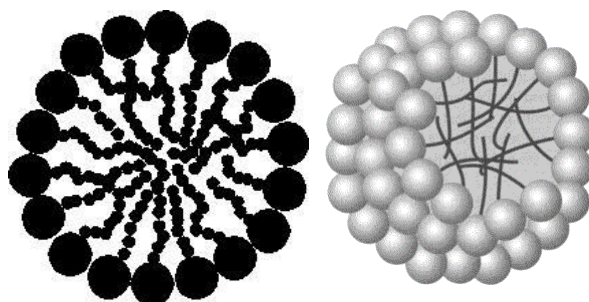
Využití kapilární elektroforézy je rozsáhlé a zasahuje do mnoha vědeckých i praktických oblastí. Lze ji aplikovat na separaci velkého množství rozmanitých chemických sloučenin – anorganických iontů, organických molekul a bioorganických makromolekul. Umožňuje určení aminokyselinového složení hydrolyzáta neznámých proteinů, stanovení sekvence aminokyselin v bílkovinách, studium peptidových map či analýzu nukleotidů a nukleových kyselin (určování sekvencí bazí v molekule DNA). Při analýze tělních tekutin se kapilární elektroforéza uplatňuje např. při separaci sérových bílkovin, studiu lipoproteinů, patologických metabolitů nebo stanovení toxických agens a monitorování lékových hladin. Možná je i analýza léčiv, potravin, průmyslových a mnoha dalších vzorků. (7,17)

## 2.2. MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), někdy uváděná též jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), byla představena v roce 1984 Terabem. (10)

Jedná se o techniku, mezi jejíž výhodné vlastnosti patří vysoká dělicí schopnost, relativně rychlá analýza, snadné ovlivnění selektivity, malé množství vzorku potřebné k analýze a možnost separace nejen nabitých, ale i elektricky neutrálních solutů. Využívá se často k analýze léčiv. (5)

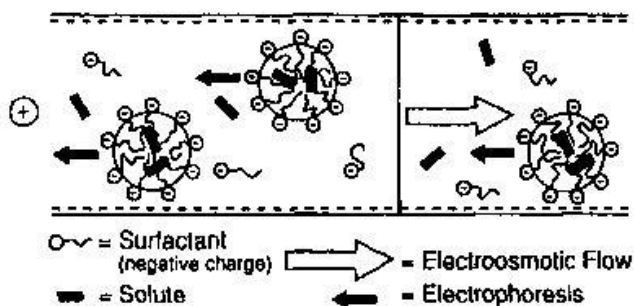
Základem této metody je přidavek povrchově aktivního činidla do základního elektrolytu o vyšší koncentraci než je kritická micelární koncentrace. Vytvoří se micely, ve kterých jsou molekuly surfaktantu orientovány tak, že hydrofobní řetězce směřují do středu a polární nabitě části jsou na povrchu micel (Obr. 5). (25)



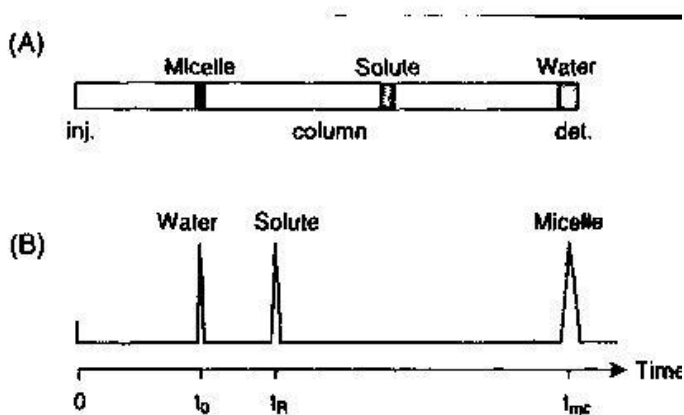
Obr. 5 Schématické znázornění struktury micely (52)

Útvar micely umožňuje separaci elektricky neutrálních solutů. K separaci dochází na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi micelární fází a okolní vodnou fází. Analyt, který vstoupil do micel, migruje rychlostí micel, zbývající část migruje rychlostí EOF. Nabité soluty jsou separovány prostřednictvím iontových interakcí s micelami. (5)

Separační princip MEKC je schematicky znázorněn na Obr. 6 a Obr. 7.



Obr. 6 Separační princip MEKC (5)



Obr. 7 Separace v MEKC (5)

### 2.2.1. Migrace v MEKC

Při použití aniontového surfaktantu jsou micely přitahovány směrem ke kladné elektrodě, což je v nepotažené kapiláře proti směru EOF. Poněvadž EOF je v neutrálním nebo bazickém prostředí rychlejší než rychlost micel, jejich výsledný pohyb je ve směru EOF směrem k záporné elektrodě. Migrační rychlost v MEKC závisí na hydrofobicitě solutů. Více hydrofobní soluty interagují s micelami silněji a migrují pomaleji než hydrofilnější soluty. Nejrychleji migruje vodná fáze, nejpomaleji micely. (25)

Při použití kationtových micel, je stěna kapiláry potažena pozitivně nabitými surfaktanty. Často dochází ke zvratu směru EOF a je nezbytné obrátit polaritu elektrod k zajištění migrace kationtových micel a v důsledku toho nenabitých solutů směrem k detektoru. (10)

Tzv. „eluční okno“ v MEKC je definováno hraničním chováním analytů. Analyty, které neinteragují s micelami, stráví svůj migrační čas v základní vodné fázi a migrují elektroosmotickou mobilitou. Jsou to typicky nenabitě velmi polární molekuly jako methanol, aceton, acetonitril nebo formamid, které jsou elektroosmotickými markery a eluují při  $t_0$ . Druhý případ je charakterizován elucí analytů, které interagují tak silně s micelami, že tráví všechny svůj čas uvnitř micel. Jsou to velmi hydrofobní látky, které jsou špatně rozpustné ve vodném prostředí, jako lipofilní barviva Sudan III, Sudan IV nebo hydrofobní kationty jako timepidium nebo halofantrin. Eluční časy pro tyto analyty se shodují s migračním časem  $t_{mc}$ . Všechny nenabitě soluty by měly být separovány mezi migračním časem nezadržovaného solutu  $t_0$  a plně zadržovaného solutu  $t_{mc}$ . (10, 25)

### 2.2.2. Kapacitní faktor (25)

Kapacitní faktor v MEKC může být vyjádřen údaji o migračním času:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0 \left[ 1 - \left( \frac{t_r}{t_{mc}} \right) \right]}$$

$t_r$  – retenční čas solutu

$t_0$  – retenční čas EOF

$t_{mc}$  – migrační čas micely

### 2.2.3. Rozlišení (25)

$$R_s = \left( \frac{N^{1/2}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2'}{1 + k_2'} \right) \left[ \frac{1 - \left( \frac{t_0}{t_{mc}} \right)}{1 + \left( \frac{t_0}{t_{mc}} \right) k_1'} \right]$$

N – počet teoretických pater

$\alpha$  - separační faktor,  $\alpha = k_2'/k_1'$

$k_1'$ ,  $k_2'$  – kapacitní faktory solutů

$t_0$  – retenční čas EOF

$t_{mc}$  – migrační čas micely

### 2.2.4. Faktory ovlivňující separaci

#### 2.2.4.1. Typ a koncentrace surfaktantu

Charakter surfaktantu může ovlivnit retenci, selektivitu, velikost elučního okna a účinnost separace.

Koncentrace zásadním způsobem ovlivňuje rozlišení. Může pozměnit velikost elučního okna a účinnost separace, nicméně má minimální vliv na selektivitu. (10)

#### 2.2.4.2. Modifikátory

Modifikátory jako jsou organická rozpouštědla, cyklodextriny a močovina mohou být součástí vodných roztoků pufrů. Redukují retenční charakteristiky solutů silně vázaných do micel. Jejich přítomnost také může vést k vyšší selektivě.

Modifikátory jako methanol a acetonitril jsou rozsáhle využívány ke zlepšení separací hydrofobních sloučenin, které interagují silně s micelami a migrují blízko migračního času micel nebo s micelami. Mimo těchto polárních modifikátorů vykazujících malou nebo žádnou interakci s micelami, jsou také používány hydrofobní alkoholy s delším řetězcem. Jejich interakce s micelami je větší a tím ovlivňování separace solutů odlišné.

Močovina redukuje interakce hydrofobních sloučenin s micelami zvýšením jejich solubility ve vodných roztocích.

Cyklodextriny mají hydrofobní kavitu, která představuje alternativní možnost pro interakci se solutem, vedle standardní interakce solut – micela. Nenabitě cyklodextriny migrují rychlostí EOF a v opačném směru, než kam jsou přitahovány aniontové micely.

„Čistý“ retenční čas solutů se snižuje a hydrofobní soluty, které by jinak eluovaly s micelami, mohou být lépe separovány. (10)

#### **2.2.4.3. Vliv pH a teploty**

Úprava pH hraje významnou roli u látek charakteru slabých kyselin nebo bazí, protože pH určuje stupeň acidobazické rovnováhy a tím velikost náboje na molekule a sílu interakce.

Teplota není široce užívaný parametr k ovlivnění separace, jelikož její efekt na selektivitu není významný. Má ale velký vliv na viskozitu (a proto EOF) a toto může být signifikantní. (10)

#### **2.2.5. Surfaktanty používané v MEKC**

##### **2.2.5.1. Aniontové surfaktanty s dlouhým alkylovým řetězcem**

Nejrozšířeněji používaným surfaktantem v MEKC je dodecylsírán sodný (SDS). Výhodou SDS je jeho vysoká rozpustnost ve vodě, nízká CMC, malá UV molární absorpce dokonce i při nízkých vlnových délkách, dosažitelnost a cena. Mezi další surfaktanty této skupiny patří např. tetradecylsírán sodný, N-lauroyl-N-methyltaurat sodný. (10, 30)

##### **2.2.5.2. Kationtové surfaktanty**

Většina kationtových surfaktantů obsahuje alkyltrimethylamoniovou skupinu. Nejužívanějším kationtovým surfaktantem je cetyltrimethylamonium bromid. Mezi další patří např. decyltrimethylamonium bromid (chlorid), dodecyltrimethylamonium bromid (chlorid). (25, 30)

##### **2.2.5.3. Neiontové surfaktanty**

Neiontové surfaktanty samy o sobě neovlivňují elektroforetickou pohyblivost a nemůžou být použity jako pseudostacionární fáze v tradiční MEKC. S úspěchem jsou ale používány pro separaci nabitých sloučenin jako např. peptidů.

Jako pseudostacionární fáze v MEKC mohou být využity neiontové surfaktanty v kombinaci s iontovým surfaktantem. Tyto smíšené micely vykazují rozdílné vlastnosti, např. odlišnou selektivitu. (30)

##### **2.2.5.4. Žlučové soli**

Žlučové soli jsou aniontové a chirální surfaktanty se steroidní strukturou. Ve srovnání s aniontovými surfaktanty s dlouhým alkylovým řetězcem mají slabší

solubilizační schopnost. Jsou proto s úspěchem využívány pro separaci kortikosteroidů a benzodiazepinových analogů, které se nedají stanovit pomocí MEKC s SDS, protože jsou zde téměř kompletně solubilizovány. Využívají se také k chirální separaci. Patří sem sodná sůl cholátu, deoxycholátu, taurocholátu a taurodeoxycholátu. (25, 30)

#### **2.2.5.5. Chirální surfaktanty**

Chirální surfaktanty jsou využívány k separaci enantiomerů. Kromě již zmíněných žlučových solí sem patří také acylaminokyseliny a alkoxyacylaminokyseliny, např. sodná sůl N-dodekanoylvalinu a sodná sůl N-dodecyloxykarbonylvalinu. Mohou být využity i některé saponiny, např. digitonin a kyselina glycyrrhizinová. (30)

### **2.3. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)**

Kapilární zónová elektroforéza je jednoduchá elektromigrační technika. Jednotlivé ionogenní látky, které se liší svými pohyblivostmi, se oddělují v prostředí základního homogenního elektrolytu. Složky vzorku se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Po určité době migrace vznikne řada prostorově oddělených zón, které patří jednotlivým složkám vzorku. (4, 24)

### **2.4. KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (ITP)**

Izotachoforéza je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů. Vzorek je umístěn mezi tzv. vedoucí a koncový elektrolyt. Po vložení stejnosměrného elektrického pole dojde k vytvoření ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními. Ostrost těchto rozhraní se díky samozaostřujícímu efektu s časem nemění. (4)

Při ITP lze separovat jen složky migrující jedním směrem. Během jedné analýzy lze tak rozdělit pouze kationty nebo jen anionty. ITP se proto dělí na kationtovou a aniontovou. (18)

### **2.5. IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE**

Izoelektrická fokusace umožňuje dělení amfoterních látek (bílkovin, peptidů) podle jejich izoelektrických bodů. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi amfolytů, jež tvoří

nosný elektrolyt této metody. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. (4) V tomto místě se látka stává elektroneutrální a dojde k jejímu zakoncentrování. Vzniká tak ostrá zóna analytu. (6)

## **2.6. KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRRAFIE (CEC)**

Kapilární elektrochromatografie je separační technika, která kombinuje principy chromatografie a elektroforézy. CEC poskytuje výhody obou metod, tj. vysokou separační účinnost kapilární elektroforézy a vysokou selektivitu HPLC. CEC používá kapiláry naplněné stacionární fází jako kapalinová chromatografie, avšak pro pohyb mobilní fáze v koloně využívá elektroosmotický tok jako pumpu. Díky pístovému profilu elektroosmotického toku dosahuje ve velké většině případů lepší účinnosti separace než klasická kapalinová chromatografie. (19, 20)

## **2.7. MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE (MEEKC)**

MEEKC je metoda využívající podobný separační princip jako v micelární elektrokinetické chromatografii. Pro neutrální sloučeniny je tento princip chromatografický, dochází k rozdělování solutu mezi vodnou a olejovou fází v mikroemulzním pufru. Ionizované analyty jsou separovány elektroforeticky. Mikroemulze v MEEKC jsou olejové kapičky dispergované ve vodné fázi. K vytvoření olejových kapiček se používá zpravidla oktan nebo heptan. Přídavkem surfaktantu (SDS) dochází ke stabilizaci a nabití těchto kapiček. Ko-surfaktant (butan-1-ol) se přidává pro podporu stabilizace mikroemulzí.

Metoda je používána především pro vysoce hydrofobní soluty. Lze ji využít také k separaci jak iontových, tak neutrálních sloučenin, ve vodě rozpustných i nerozpustných. (8, 22, 23)

## **2.8. KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA**

V kapilární gelové elektroforéze se kapilára před separací plní roztokem gelu, který vykazuje molekulově síťový efekt. Tento efekt způsobuje zpomalení rychlosti migrujících částic. Složky vzorku jsou zadržovány síťujícím prostředím různou měrou podle velikosti a tvaru molekuly. Výsledná elektroforetická pohyblivost těchto částic je nepřímo úměrná jejich velikosti a tyto látky jsou oddělovány v pořadí podle

vzrůstajících relativních molekulových hmotností. Metoda je využívána hlavně pro analýzu vzorků biopolymerů (např. polynukleotidů, nukleových kyselin). (4, 11)

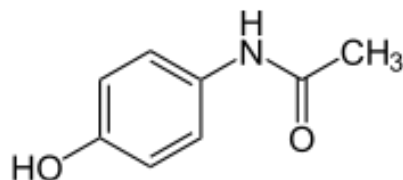
## 2.9. PARACETAMOL

Paracetamolium

$C_8H_9NO_2$

$M_r = 151,16$  (33)

$pK_a = 9,5$  (48)



Paracetamol je vysoce tolerovatelné účinné analgetikum a antipyretikum. Je lékem první volby ke snížení horečky a bolestí u dětí do 12 let, ale i u dospělých.

Po běžných terapeutických dávkách je výskyt nežádoucích účinků malý, někdy se objeví alergické kožní reakce. (31)

Léčivých přípravků obsahujících paracetamol je na našem trhu celá řada. Jedná se především o nepotahované bílé tablety, čípky a suspenze. (32)

### 2.9.1. Metody stanovení paracetamolu

- Pro stanovení paracetamolu bylo navrženo mnoho metod. Můžeme se setkat s metodami optickými ( UV/VIS spektrofotometrie, průtoková injekční spektrofotometrie, IR spektrofotometrie, spektrofluorimetrie, chemiluminiscenční metody), elektroanalytickými, chromatografickými (HPLC, TLC, MLC) i s kapilárními elektroforetickými metodami. (42)

- CD-MEEKC, UV detekce, BGE: 10 mM tetraboritan sodný, SDS, 2-propanol, 1-butanol, pentan, 3 mM 2,6-di-O-methyl-  $\beta$ -CD, křemenná kapilára: 48,5 cm x 50 $\mu$ m, stanovení paracetamolu a třinácti dalších látek v léku na nachlazení (40)

- MEKC, UV detekce, BGE: 50 mM fosfát, 75 mM SDS, pH 9, nepotažená křemenná kapilára: 64,5 cm x 50 $\mu$ m, stanovení paracetamolu a jeho nečistoty 4-aminofenolu (43)

- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-chloristan sodný, C 18 kolona (250 X 4,6 mm), stanovení paracetamolu, fenylefrinu, chlorfenylaminu a dextromethorfanu (44)

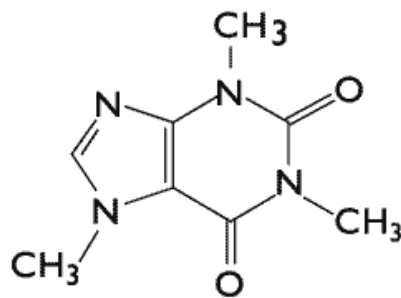
## 2.10. KOFEIN

Coffeinum

$C_8H_{10}N_4O_2$

$M_r = 194,19$  (33)

$pK_a = 14,2$  (50)



Kofein je alkaloid, který má centrálně stimulační účinky a mírné účinky kardiostimulační a diuretické. Zvyšuje stav bdělosti, snižuje únavu, zvyšuje pracovní aktivitu, zlepšuje náladu a motorické funkce.

Má řadu kontraindikací a interakcí. Při předávkování může vyvolat nespavost, bolesti hlavy, nauzeu až zvracení, tachyarytmie, iritabilitu a svalový třes. Zvyšuje žaludeční sekreci.

Dnes se u nás používá jako adjuvans v analgeticko-antipyretických a dalších kombinacích. (31)

### 2.10.1. Metody stanovení kofeinu

- CD-MEEKC, UV detekce, BGE: 10 mM tetraboritan sodný, SDS, 2-propanol, 1-butanol, pentan, 3 mM 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -CD, křemenná kapilára: 48,5 cm x 50 $\mu$ m, stanovení kofeinu a třinácti dalších látek v léku na nachlazení (40)

- MEKC, UV detekce, BGE: 0,2 M kyselina boritá, 50 mM tetraboritan sodný, pH 8, 135 mM SDS, křemenná kapilára: 48,5 cm x 50 $\mu$ m, stanovení kofeinu a dalších látek ve vitamínovém nápoji (41)

- HPLC, mobilní fáze: voda-acetonitril-kyselina fosforečná, ODS kolona (150 x 4,6 mm), stanovení kofeinu s katechiny v zeleném čaji (44)

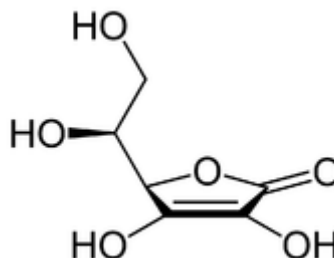
## 2.11. KYSELINA ASKORBOVÁ

Acidum ascorbicum

$C_6H_8O_6$

$M_r = 176,13$  (33)

$pK_a = 4,04$  (49)



Kyselina askorbová – vitamín C je antioxidační látka, v organismu se účastní řady oxidoredukčních metabolických reakcí. Má velký význam především pro růst a

udržování zdravých kostí, zubů, dásní, vazů a krevních cév, dále pro tvorbu některých přenašečů nervových vzruchů, hormonů nadledvin, pro reakci imunitního systému na infekce, pro hojení ran a pro absorpci železa z potravy.

Terapeuticky se užívá při hypovitaminóze a při zvýšených nárocích na organismus. (31)

### 2.11.1. Metody stanovení kyseliny askorbové

- CD-MEEKC, UV detekce, BGE: 10 mM tetraboritan sodný, SDS, 2-propanol, 1-butanol, pentan, 3 mM 2,6-di-O-methyl- $\beta$ -CD, křemenná kapilára: 48,5 cm x 50 $\mu$ m, stanovení fenylefrinu a třinácti dalších látek v léku na nachlazení (40)

- Elektrochemiluminiscence, stanovení kyseliny askorbové, dehydroaskorbové a celkového vitamínu C (45)

- Voltametrie, stanovení kyseliny askorbové a dopaminu (46)

- Cyklická voltametrie, stanovení kyselin askorbové a kyselin močové (47)

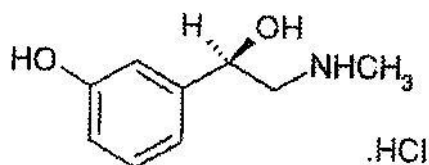
## 2.12. FENYLEFRIN

Phenylephrini hydrochloridum

$C_9H_{14}ClNO_2$

$M_r = 203,67$  (33)

$pK_a = 8,9$  a  $10,1$  (48)



Fenylefrin hydrochlorid je dekonjestant z řady sympatomimetik, který působí přímo hlavně na alfa-adrenergní receptory. Používá se lokálně k dekonjesci sliznic a jako mydriatikum, resp. i celkově jako periferní analeptikum. (31, 32)

### 2.12.1. Metody stanovení fenylefrinu

- MEKC, UV detekce, BGE: 10 mM dihydrogenfosfát sodný - tetraborát sodný, 10 mM SDS, pH 9, křemenná kapilára: 67 cm x 75 $\mu$ m, současné stanovení fenylefrinu, dextromethorfanu a difenhydraminu v sirupu na kašel (34)

- MEKC, UV detekce, BGE: 5 mM fosfát – 5 mM borát, 40 mM SDS, pH 8,2, křemenná kapilára: 57cm x 75 $\mu$ m, současné stanovení fenylefrinu, sufacetamidu a acetátu prednisolonu v lokálním léčivém přípravku (35)

- CZE, UV detekce, fosfátový pufr 0,063 mol/l, pH 3,72, křemenná kapilára: 70 x 75 $\mu$ m, současné stanovení fenylefrinu, nafazolinu a difenhydraminu v nosních kapkách (36)

- HPLC, elektrochemická detekce, stanovení fenylefrinu a jeho konjugátů v lidské plazmě (37)

- HPLC, nepřímá konduktometrická detekce, stanovení fenylefrinu a dalších 7 látek v sirupech na nachlazení (38)

- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-chloristan sodný, C 18 kolona (250 X 4,6 mm), stanovení paracetamolu, fenylefrinu, chlorfenylaminu a dextromethorfanu (44)

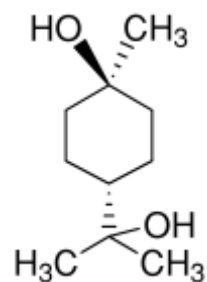
- HPTLC, mobilní fáze: ethylacetát-methanol-amoniak, stanovení fenylefrinu a lignokainu (39)

## 2.13. TERPIN

Trans-Terpin

$C_{10}H_{20}O_2$

Mr = 172,26 (51)



Monohydrát terpinu zvyšuje přímým účinkem bronchiální sekreci, je proto používán jako expektorans. (32)

### 2.13.1. Metody stanovení terpinu

- GC, plamenově-ionizační detekce, stanovení terpinu a kodeinu (27)
- GC, plamenově-ionizační detekce, stanovení terpinu (28)

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat elektroforetickou metodu pro separaci a stanovení vybraných protichřipkových léčiv (paracetamol, kofein, kyselina askorbová, terpin a fenylefrin). Vypracovanou a validovanou metodu aplikovat na léčivý přípravek (Coldrex tablety).

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### 4.1. CHEMIKÁLIE

- Kyselina boritá pro elektroforézu, p.a., Sigma
- Dodecylsíran sodný, p.a., Sigma-Aldrich
- Tetraboritan sodný, dekahydrát, A.C.S. reagent, 99 %, Aldrich
- Methanol Cromasolv® pro HPLC, ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich
- Acetonitril Cromasolv® pro HPLC, ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich
- Amoniak vodný roztok 25 – 27 %, p.a., Ing. Petr Švec, PENTA
- Paracetamol, 98 %, Aldrich
- Kofein, ≥ 99,9 %, Fluka
- Kyselina askorbová, > 99,0 %, Sigma
- Fenylefrin hydrochlorid, p.a., Sigma-Aldrich
- trans-Terpin, p.a., Sigma-Aldrich
- Methylparaben, p.a., RNDr. Jan Kulich
- Kyselina 3-nitrobenzoová, 99,0 %, Aldrich
- Ketoprofen, p.a., Sigma-Aldrich
- Ambroxol hydrochlorid, p.a., Fluka
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., Merck
- Kyselina sorbová, ≥ 99,0 %, Sigma
- Kyselina benzoová, ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich
- Kyselina 4-methoxybenzoová, 99,0 %, Aldrich
- Fenobarbital, p.a., Sigma
- Kyselina 2,6-pyridindikarboxylová, 99,0 %, Aldrich
- Deoxycholát sodný, ≥ 97,0 %, Sigma-Aldrich
- 5,5-diethylbarbiturát sodný, ≥ 99,5 %, Fluka
- TRIS, Trisma base – tris(hydroxymethyl)-aminomethan, A.C.S. reagent, ≥ 99,8 %, Sigma-Aldrich
- Sudan III pro mikroskopii, Balex, Ing. Jaroslav Kroupa, CSc.
- TAPSO, ≥ 99,0 %, Sigma
- α-Cyklodextrin hydrát, p.a., Aldrich
- β-Cyklodextrin, sulfatovaná sodná sůl, p.a., Aldrich
- Coldrex tablety, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GlaxoSmithKline Export Ltd., Brentford, Velká Británie

## **4.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ**

Na přípravu roztoků byla použita voda připravená zařízením Millipore MilliQRG. Všechny roztoky byly před dávkováním do přístroje odplyněny 15 minut na ultrazvukové lázni.

### **4.2.1. Roztoky pracovních elektrolytů**

Podle požadované koncentrace jsem navážila odpovídající množství kyseliny borité a SDS a na ultrazvukové lázni jsem je v 10 % methanolu rozpustila. Poté jsem upravila pH\* na hodnotu 7,8 tetraboritanem sodným o koncentraci 50 mM a v odměrné baňce doplnila po rysku. Obdobně jsem připravovala i další roztoky elektrolytů, které jsem zkoušela při hledání vhodného druhu elektrolytu.

### **4.2.2. Roztok standardů pro optimalizaci metody**

Do 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 25 mg paracetamolu, 50 mg kyseliny askorbové, 50 mg kofeinu, 50 mg terpinu, 25 mg fenylefrinu a 25 mg methylparabenu (IS). Látky jsem rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku. Roztok jsem nechala 15 minut odplynit na ultrazvukové lázni.

V další části práce byla připravována standardní směs bez terpinu.

### **4.2.3. Hledání vnitřního standardu**

Do 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 25 mg paracetamolu, 50 mg kyseliny askorbové, 50 mg kofeinu a 25 mg fenylefrinu a rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku. Dále jsem připravila jednotlivé roztoky IS (methylparaben, ambroxol, ketoprofen, kyselina 3-nitrobenzoová). Jednotlivé látky jsem navážila do 5 ml odměrných baněk, rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku. Koncentrace roztoků byla 1,0 mg/ml. Roztoky jsem nechala 15 minut odplynit na ultrazvukové lázni. Před analýzou jsem roztoky IS mísila s roztokem zkoušených látek v poměru 1:1.

### **4.2.4. Kalibrační roztoky**

Navážila jsem do 50 ml odměrné baňky přesně asi 200 mg methylparabenu (ZR IS), rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku. Roztok jsem nechala 15 minut odplynit na ultrazvukové lázni.

Dále jsem připravila roztok zkoušených látek (ZR ST). Do 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 2 g paracetamolu, 100 mg kofeinu, 120 mg kyseliny

askorbové a 20 mg fenylefrinu. Látky jsem rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku. Roztok jsem nechala 15 minut odplynit na ultrazvukové lázni.

Z těchto dvou roztoků jsem pak ředěním do 10 ml odměrných baněk podle schématu (Tab. 2) získala sérii roztoků s koncentrací paracetamolu od 0,1 mg/ml do 30 mg/ml, kofeinu od 0,25 mg/ml do 1,8 mg/ml, kyseliny askorbové od 0,3 mg/ml do 2,16 mg/ml a fenylefrinu od 0,05 mg/ml do 0,36 mg/ml. K ředění jsem používala 50 % methanol. Koncentrace IS byla ve všech roztocích 0,2 mg/ml.

Tab. 2 Ředění kalibračních roztoků (ml ZR ST + 0,5 ml ZR IS ad 10 ml methanol 50 %)

Paracetamol						
ZR ST [ml]	0,025	0,25	1,25	2,5	5,0	7,5
c [mg/ml]	0,1	1	5	10	20	30

Kofein, Kyselina askorbová, Fenylefrin					
ZR ST [ml]	1,25	2,5	5	7,5	9
c CO [mg/ml]	0,25	0,5	1,0	1,5	1,8
c AA [mg/ml]	0,3	0,6	1,2	1,8	2,16
c FE [mg/ml]	0,05	0,1	0,2	0,3	0,36

#### 4.2.5. Příprava vzorku HVLP (Coldrex tablety)

V achátové misce jsem důkladně rozetřela několik tablet. Z tabletoviny jsem navážila přesně asi 0,7494 g, množství odpovídající hmotnosti jedné tablety a kvantitativně přemístila do 50 ml odměrné baňky. Obsah baňky jsem rozpustila asi ve 30 ml 50 % methanolu a nechala 15 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Pak jsem přidala 5 ml zásobního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 2 mg/ml a doplnila 50 % methanolem po značku.

Vzorky jsem před měřením filtrovala přímo do vialky přes membránový filtr.

#### 4.2.6. Příprava vzorků pro ověření správnosti metody

Nejprve jsem si připravila zásobní roztok standardů. Do 10 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 10 mg paracetamolu, 5 mg kofeinu, 6 mg kyseliny askorbové a 1 mg fenylefrinu. Látky jsem rozpustila v 50 % methanolu a doplnila po rysku.

Dále jsem z rozdrčené tabletoviny navážila přesně asi 0,3747 mg, množství odpovídající polovině hmotnosti jedné tablety a kvantitativně přemístila do 25 ml odměrné baňky. Obsah jsem rozpustila asi v 10 ml 50 % methanolu a nechala 10 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Pak jsem přidala 2,5 ml zásobního roztoku vnitřního

standardu o koncentraci 2 mg/ml, 1 ml zásobního roztoku standardů a doplnila 50 % methanolem po značku.

Vložené koncentrace byly: paracetamol 10,04 mg/ml, kofein 0,52 mg/ml, kyselina askorbová 0,624 mg/ml, fenylefrin 0,104 mg/ml.

### 4.3. PŘÍSTROJE

Při práci jsem používala tyto přístroje:

- Laboratorní digitální pH metr PHM 220, Radiometer Copenhagen, Francie (přístroj byl kalibrován pomocí technických pufrů WTW)
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31, Bandelin Electronic, Německo
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
- Kapilární elektroforetický systém P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System od firmy Beckman Coulter, USA, software Karat 32

#### 4.3.1. Kapilární elektroforetický systém Beckman

Přístroj byl vybaven UV detektorem (PDA – photo diode-array).

Separace probíhala v nepotážené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  o celkové délce 31,2 cm. Efektivní délka kapiláry činila 21 cm. Komunikaci s počítačem a řízení analýzy zajišťoval software Karat 32, který zpracovává a vyhodnocuje data.

### 4.4. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY

#### 4.4.1. Pracovní postup

Před začátkem analýzy jsem uvedla do chodu počítač a elektroforetický systém. Před vlastním měřením jsem každý den kapiláru proplachovala 10 minut 1,0 M hydroxidem sodným, poté 10 minut 0,1 M hydroxidem sodným a 10 minut vodou. K docílení lepší separační účinnosti a reprodukovatelnosti jsem kapiláru před každou analýzou proplachovala 2 minuty 0,1 M hydroxidem sodným, 2 minuty vodou a 2 minuty elektrolytem, aby se odstranily absorbované látky. Po ukončení všech měření v daném dni jsem kapiláru proplachovala po 10 minutách 1,0 M hydroxidem sodným, 0,1 M hydroxidem sodným a vodou. Promývání probíhalo vždy pod tlakem 1379 mBar.

V programu jsem nastavila parametry měření. Vzorek byl dávkován hydrodynamickým tlakem 34,5 mBar po dobu 5 sekund. Elektroforetická separace probíhala při vloženém napětí 20,0 kV, teplota kapiláry byla udržována na 20°C. Detekce probíhala při 190 a při 265 nm.

Každý vzorek jsem před analýzou odplynila 15 minut v ultrazvukové lázni.

#### 4.4.1.1. Měření kalibrační závislosti

Každý kalibrační roztok jsem změřila třikrát. Kalibrační závislost byla hodnocena pomocí programu lineární regrese na PC jako závislost poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu na koncentraci stanovované látky v mg/ml.

#### 4.4.2. Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem použila roztok o koncentraci PA 5 mg/ml, CO 1 mg/ml, AA 1,2 mg/ml, FE 0,2 mg/ml. Obsah methylparabenu (IS) byl 0,2 mg/ml. Provedla jsem šest měření. Hodnoty průměru, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsem vypočítala podle následujících vztahů.

Průměr hodnot výsledků měření  $\bar{x}$  :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

n – počet měření

$x_i$  – jednotlivý výsledek měření

Směrodatná odchylka s:

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Relativní směrodatná odchylka:

$$S_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

#### 4.4.3. Rozlišení

Rozlišení  $R_s$  mezi píky lze spočítat podle obecného vzorce: (7)

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

$t_1, t_2$  - migrační časy látek [s]

$w_1, w_2$  - šířky píků při základní linii [s]

Hodnota  $R_s$  větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků až na základní linii.

#### 4.4.4. Účinnost separace

Účinnost elektroforetického systému se vyjadřuje počtem dosažených teoretických pater  $N$ , případně výškovým ekvivalentem teoretického patra  $H$ . Počet teoretických pater se počítá podle vztahu: (7)

$$N = \left( \frac{t_m}{\sigma} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_m}{w} \right)^2$$

$t_m$  - migrační čas [s]

$\sigma$  - vzdálenost, kterou urazí difúzí průměrný ion za dobu  $t$  [s]

$w$  - šířka píku při základní linii [s]

Výškový ekvivalent teoretického patra se počítá podle vztahu: (7)

$$H = \frac{l}{N}$$

$l_t$  – celková délka kapiláry (efektivní délka kapiláry) [m]

#### 4.4.5. Správnost metody

Správností metody se rozumí co největší shoda výsledků měření s absolutní správnou hodnotou. Správnost metody jsem ověřila analýzou vzorku s přidavkem standardních látek. Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery)  $R$  (53) v %.

$$R (\%) = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložena}} \cdot 100$$

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1. OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A SOUČASNÉ STANOVENÍ PARACETAMOLU, KOFEINU, KYSELINY ASKORBOVÉ, FENYLEFRINU A TERPINU

Terpin je chemicky 4-(2-hydroxyisopropyl)-1-methylcyklohexanol. Je neutrální a neabsorbuje v UV oblasti. Proto strategie výběru CE metody, resp. BGE spočívala:

1. Zvolení MEKC z existujících CE metod
2. Pracovat v módu nepřímé UV detekce

Jak vyplývá z literatury, terpin dosud nebyl analyzován elektroforetickými metodami. Byly publikovány analýzy pomocí GC s plamenově-ionizační detekcí. (27, 28)

Byly vyzkoušeny různé pufrы na základě zkušeností z vývoje CE metod na katedře i převzatých z literatury. Byly zkoušeny BGE s různými anionaktivními tenzidy, UV absorbujícími speciés, BGE s různými hodnotami pH a přísadků různých organických rozpouštědel a selektorů na bázi CD.

Nezaznamenali jsme kombinaci MEKC + nepřímá UV detekce v experimentální práci v literatuře, pouze některé obecné postřehy a obtíže této kombinace byly uvedeny v obecné rovině týkající se CZE a velmi málo MEKC v monografické literatuře. (10, 29)

Při nepřímé UV detekci (vztaženo zejména na CZE) je doporučováno pracovat s pufrem s nízkou vodivostí a co nejjednoduššího složení, používat pouze jeden UV absorbující ion, menší ID kapiláry a věnovat péči chlazení systému. Dochází k fluktuaci základní linie (detektor měří aktuální změny koncentrace absorbujícího iontu), což se zvyšuje se stoupajícím napětím a vodivostí elektrolytu. Teplotní změny generují neočekávané koncentrační disturbance a objevují se systémové píky (kritická místa jsou vialky s pufrem, pozice detektoru a místo upevnění kapiláry). (10) V souvislosti s MEKC v monografii 15 je stručně konstatováno, že nepřímou UV detekci nelze účinně použít v MEKC. Přítomnost nabitých molekul surfaktantu v BGE redukuje rychlost migrace analytu buď na základě iontopárové interakce s analytem nebo interakce surfaktantu s UV absorbujícím iontem.

Konkrétně byly testovány MEKC pufrы: borátový, borát-fosfátový, glycinový, TRIS s UV absorbujícími sloučeninami jako je kyselina benzoová, sorbová, p-methoxybenzoová, 2,6-pyridindikarboxylová, pufrы fenobarbitalový, veronalový s detergenty SDS nebo deoxycholátem (méně pokusů).

Byly testovány různé koncentrace detergentu i pufru a UV absorbujícího speciés, vliv pH, přísadek např. MeOH nebo ACN nebo CD. I když bylo provedeno poměrně velké množství pokusů, bohužel se nepodařilo zajistit separaci a detekci

terpinu, záznamy jevíly ve většíně přípádu nestabilitu nulové linie a byla patrná přítomnost neočekávaných píků, velmi často deformovaných. Proto byla dále vyvíjena CE metoda s přímou UV detekcí pro zbývající analyty, které všechny absorbují v UV oblasti.

### **5.1.1. Detekce**

Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter je vybaven UV (DAD) detektorem. Pro stanovení optimální vlnové délky jsem nejprve změřila spektra látek v borátovém pufru s 20 % methanolu od 190 nm do 300 nm. UV spektra PA, CO a AA vykazují dvě maxima, jedno v okolí 200 nm (206, 208, 196 nm), druhé u PA a AA 248 nm a u CO 273 nm. FE vykazuje tři maxima, při 204, 217 a 276 nm. Pro detekci všech analytů jsem zvolila vlnovou délku 190 nm, pro paracetamol, kofein a kyselinu askorbovou ještě kompromisní vlnovou délku 265 nm (FE neabsorbuje).

### **5.1.2. Volba pracovního elektrolytu**

Cílem bylo najít takové složení pracovního elektrolytu a podmínky separace, při nichž by došlo k úplné separaci jednotlivých složek tak, aby mohly být stanoveny. Vycházela jsem z výsledků získaných při snaze najít vhodný pufr pro analýzu terpinu, kde separace ostatních složek byla relativně úspěšná. V úvodních pokusech jsem tedy zkoušela tyto dva borátové elektrolytové systémy:

1) kyselina boritá 40 mM, SDS 70 mM, pH\* 8,1 upraveno amoniakem, 10 % methanol

2) kyselina boritá 200 mM, SDS 100 mM, pH\* 7,8 upravené tetraboritanem sodným 50 mM, 10 % methanol.

Zkoušené látky v těchto elektrolytových systémech migrovaly v pořadí: paracetamol, kofein, kyselina askorbová a fenylefrin.

Za použití prvního elektrolytového systému nedocházelo k úplnému oddělení paracetamolu od kofeinu, píky se překrývaly.

Za použití druhého elektrolytu (kyselina boritá + tetraboritan) došlo k oddělení prvních dvou analytů skoro až na základní linii, separace ostatních složek byla dobrá. Pro další práci jsem tedy zvolila tento elektrolytový systém.

Dále byly zkoušeny různé koncentrace kyseliny borité, SDS, methanolu. Zjišťovala jsem také vliv pH pracovního elektrolytu, teploty a vloženého napětí na separaci. Kromě kvality separace jsem hodnotila i citlivost analýzy a její trvání. Identifikace píků byla provedena pomocí přídavek standardů.

### 5.1.3. Vnitřní standard

Jako vnitřní standard jsem zkoušela methylparaben, ketoprofen, ambroxol a kyselinu 3-nitrobenzoovou. Zvolila jsem methylparaben. Důvodem bylo zejména vhodné rozlišení, citlivost a také tvar a symetrie píku. Ostatní zkoušené látky nevyhovovaly migračním časem, citlivostí, rozlišením nebo tvarem píků.

### 5.1.4. Optimalizace základního elektrolytu

Zjišťovala jsem vliv koncentrace kyseliny borité v pracovním elektrolytu na délku a citlivost analýzy. Použila jsem elektrolytové systémy o koncentracích kyseliny borité 100 mM a 200 mM. Elektrolytový systém obsahoval 100 mM SDS, 10 % methanol a pH\* bylo 7,8. Při vyšší koncentraci kyseliny borité se doba analýzy nepatrně prodloužila a separace se zhoršila. Pro další měření jsem zvolila koncentraci 100 mM.

Tab. 3 Vliv koncentrace kyseliny borité (KB) na migrační časy analytů (100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8 = konst., 15 kV, 190 nm)

Analyt	PA	CO	AA	MP (IS)	FE
$t_m$ [min] při 100 mM KB	3,500	3,846	4,904	6,638	11,833
$t_m$ [min] při 200 mM KB	3,629	3,962	5,475	7,496	12,663

### 5.1.5. Vliv koncentrace SDS

Při zjišťování vlivu koncentrace SDS na analýzu jsem použila elektrolytový systém obsahující SDS v koncentraci 80 mM, 100 mM a 120 mM. Elektrolytový systém obsahoval 100 mM kyselinou boritou, 10 % methanol a pH\* bylo 7,8. Při koncentraci 80 mM bylo zhoršené oddělení 1. a 2. píku, ale s rostoucí koncentrací se oddělování PA a CO zlepšovalo. Nejvýraznější vliv na rychlost migrace byl zjištěn u FE. S ohledem na kvalitu separace a trvání analýzy jsem pro další měření vybrala koncentraci SDS 100 mM.

Tab. 4 Vliv koncentrace SDS na migrační časy analytů (100 mM KB, 10 % methanol, pH\* 7,8 = konst., 15 kV, 190 nm)

Analyt	PA	CO	AA	MP (IS)	FE
$t_m$ [min] při 80 mM SDS	3,652	4,946	5,164	6,275	10,757
$t_m$ [min] při 100 mM SDS	3,500	3,846	4,904	6,638	11,833
$t_m$ [min] při 120 mM SDS	3,348	3,745	4,644	7,001	12,909

### 5.1.6. Optimalizace hodnoty pH

Při různém pH dochází ke změnám disociace molekul a tím k různým interakcím látek s micelami. Podle velikosti interakce látek s micelami se mění jejich elektroforetická pohyblivost. Optimalizace hodnoty pH probíhala v elektrolytovém systému, který obsahoval 100 mM kyselinu boritou, 100 mM SDS, 10 % methanol. pH\* bylo upravováno 50 mM tetraboritanem sodným na hodnoty 7,5; 7,8 a 8,1. V tomto poměrně úzkém rozmezí pH byly téměř všechny píky již rozděleny na základní linii (nejmenší rozlišení vykazují PA a CO) a ve všech případech nastalo prodloužení analýzy s vyšším pH. Nejméně výrazný byl tento vliv u PA a CO. Při pH\* 8,1 se výrazně prodloužil migrační čas MP a FE. Při pH\* 7,5 byla zhoršena základní linie. Nejvhodnější se ukázalo být pH\* 7,8.

Tab.5 Vliv pH na migrační časy analytů (100 mM KB, 100 mM SDS, 10 % methanol = konst., 15 kV, 190 nm)

Analyt	PA	CO	AA	MP (IS)	FE
$t_m$ [min] pH* 7,5	3,468	3,769	4,534	4,168	9,680
$t_m$ [min] pH* 7,8	3,500	3,846	4,904	6,638	11,833
$t_m$ [min] pH* 8,1	3,532	3,923	5,274	9,108	13,983

### 5.1.7. Vliv koncentrace methanolu

Při zjišťování vlivu přídavku methanolu byl použit elektrolytový systém obsahující 100 mM kyselinu boritou a 100 mM SDS o pH\* 7,8. Zkoušela jsem pracovní elektrolyt, který obsahoval 10 % a 20 % methanolu (V/V). Přídavek methanolu měl vliv

na rychlost migrace analytů. Při vyšší koncentraci methanolu se podle předpokladu prodloužil i migrační čas jednotlivých analytů. Pro další analýzy jsem zvolila systém s 10 % methanolu.

Tab. 6 Vliv koncentrace methanolu (MeOH) na migrační časy analytů (100 mM KB, 100 mM SDS, pH \* 7,8 = konst., 15 kV, 190 nm)

Analyt	PA	CO	AA	MP (IS)	FE
$t_m$ [min] při 10 % MeOH	3,500	3,846	4,904	6,638	11,833
$t_m$ [min] při 20 % MeOH	4,908	5,225	9,117	11,592	23,683

Až dosud byly všechny pokusy při optimalizaci elektrolytového systému prováděny při  $U = 15$  kV. Proto byl dále sledován vliv napětí na čas analýzy za účelem jejího zkrácení.

#### 5.1.8. Vliv napětí

Vliv napětí jsem prováděla v elektrolytovém systému, který obsahoval 100 mM kyseliny boritou, 100 mM SDS a 10 % methanol, pH\* elektrolytu bylo 7,8. Analýzu jsem postupně prováděla s 15 kV, 20 kV, 25 kV a 30 kV. Dle očekávání se doba analýzy s rostoucím napětím zkracovala.

Tab. 7 Vliv napětí na migrační časy analytů (100 mM KB, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8 = konst., 190 nm)

Analyt	PA	CO	AA	MP (IS)	FE
$t_m$ [min] při 15 kV	3,500	3,846	4,904	6,638	11,833
$t_m$ [min] při 20 kV	2,632	2,839	3,507	4,894	8,337
$t_m$ [min] při 25 kV	1,679	1,854	2,404	3,192	5,629
$t_m$ [min] při 30 kV	1,298	1,462	1,921	2,483	4,232

### 5.1.9. Vliv teploty

S rostoucí teplotou se zvyšuje pohyblivost iontů a analýza bývá rychlejší. Změna teploty také ovlivňuje rozdělovací koeficient látky mezi tlumivým roztokem a micelami, kritickou micelární koncentraci a viskozitu. Systém Beckman Coulter obsahuje kapalinové chlazení kapiláry a umožňuje tak průběh analýzy za dané konstantní teploty. Zkoušela jsem teplotu 20 a 25 °C. Při 25°C se zhoršila se kvalita separace. Proto jsem pro další práci zvolila teplotu 20 °C.

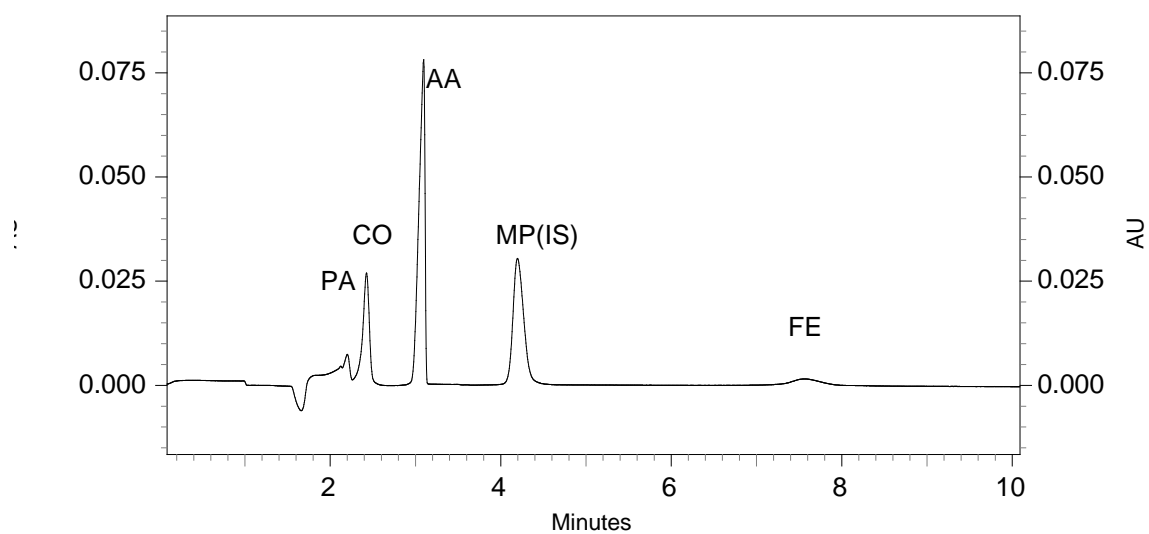
### 5.1.10. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření jsou shrnuty v Tab. 8.

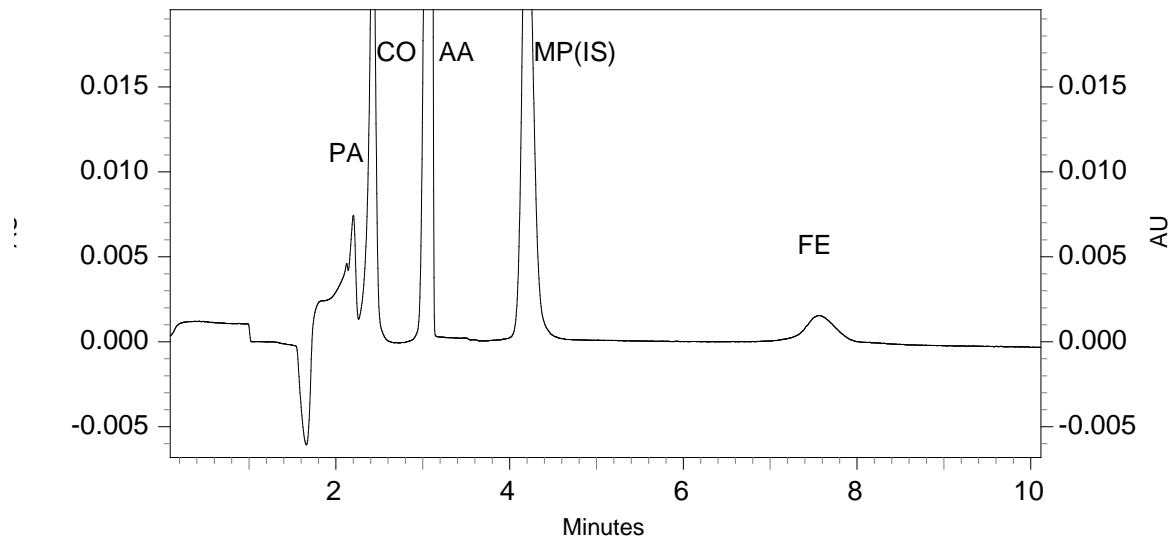
Tab. 8 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Rozpouštědlo	10 % methanol
Složky pufru, c	Kyselina boritá, 100 mM/tetraboritan sodný
Surfaktant, c	SDS, 100 mM
pH*	7,8 (upraveno tetraboritanem)
Teplota	20 °C
Napětí	20 kV
Detekce	190 nm, 265 nm
Dávkování	Hydrodynamickým tlakem 34,5 mBar, 5s

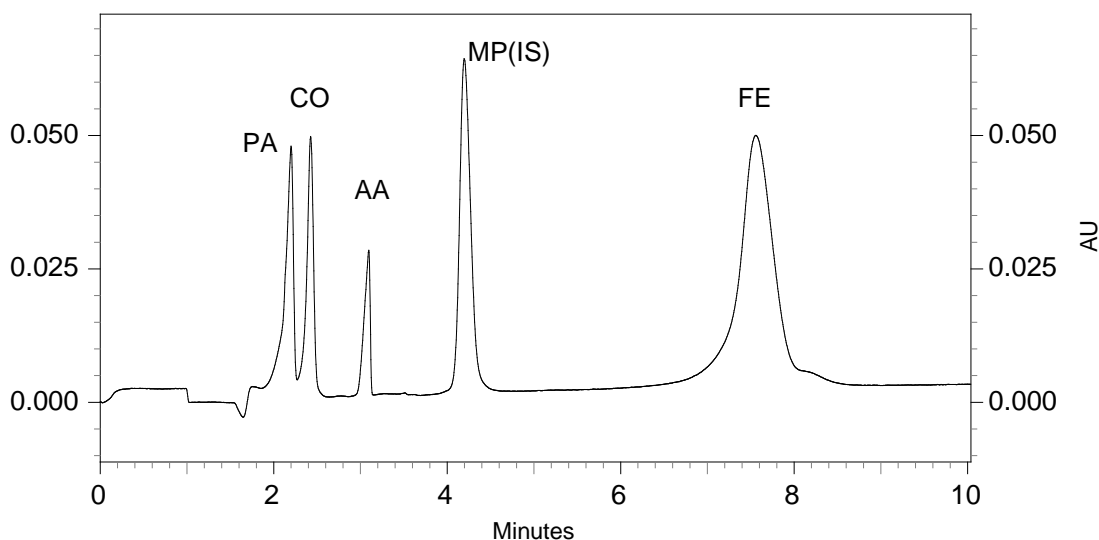
Elektroforeogram standardů získaný při měření s použitím optimálního elektrolytu za uvedených podmínek je na Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10.



Obr. 8 Elektroforeogram standardů, PA 0,5 mg/ml, CO 1,0 mg/ml, AA 1,0 mg/ml, MP (IS) 0,5 mg/ml, FE 0,5 mg/ml. BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm



Obr. 9 Elektroforeogram standardů, PA 0,5 mg/ml, CO 1,0 mg/ml, AA 1,0 mg/ml, MP (IS) 0,5 mg/ml, FE 0,5 mg/ml. BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm (zvětšeno)



Obr. 10 Elektroforeogram standardů, PA 0,5 mg/ml, CO 1,0 mg/ml, AA 1,0 mg/ml, MP (IS) 0,5 mg/ml, FE 0,5 mg/ml. BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm

Při vlnové délce měření 190 nm byla nejvyšší citlivost zjištěna pro FE, následují ve směru klesání citlivosti PA, CO a AA. Při 265 nm ve srovnání se 190 nm stoupá citlivost v pořadí FE, PA, CO, AA. FE skoro neabsorbuje.

#### 5.1.11. Rozlišení

Pro výpočet rozlišení jsem použila vzorec, uvedený na str. 42. Výsledky výpočtu jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9 Rozlišení mezi jednotlivými píky

Dvojice analytů	Rozlišení $R_s$
paracetamol – kofein	1,75
kofein – kyselina askorbová	5,67
kyselina askorbová – methylparaben	8,26
methylparaben - fenylefrin	8,10

#### 5.1.12. Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje pomocí počtu dosažených teoretických pater  $N$ , případně ekvivalentem teoretického patra  $H$ . Výpočty jsem provedla pomocí vzorců na str. 43. Hodnoty počtu teoretických pater a hodnoty  $H$  jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10 Parametry charakterizující účinnost elektroforetické separace

Analyt	N	H [ $\mu\text{m}$ ]
Paracetamol	3 781	82,52 (55,54)
Kofein	6 885	45,32 (30,50)
Kyselina askorbová	13 294	23,47 (15,80)
fenylefrin	2 503	124,65 (83,90)

Hodnoty počtu teoretických pater se pohybují od 2 503 (fenylefrin) až do 13 294 (kyselina askorbová). Hodnota H je počítána pro celkovou délku kapiláry, pro efektivní délku kapiláry jsou výsledky uvedeny v závorce.

## 5.2. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Kalibrační závislost jsem proměřila za použití optimálního pracovního elektrolytu. Jako kvantitativní parametr jsem použila poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu. Velikosti ploch píků jsem získala ze záznamu automaticky vyhodnoceného počítačovým programem. Pro každou koncentraci jsem provedla tři měření. Kalibrační závislost jsem zpracovala metodou lineární regrese.

Obecný tvar rovnice přímky:

$$y = kx + q$$

x – koncentrace látky [mg/ml]

y – plocha píku analytu / plocha píku vnitřního standardu

k – směrnice přímky

q – absolutní člen

### 5.2.1. Kalibrační závislost pro paracetamol

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml.

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 4

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$k = 2,9809 \pm 0,0561$

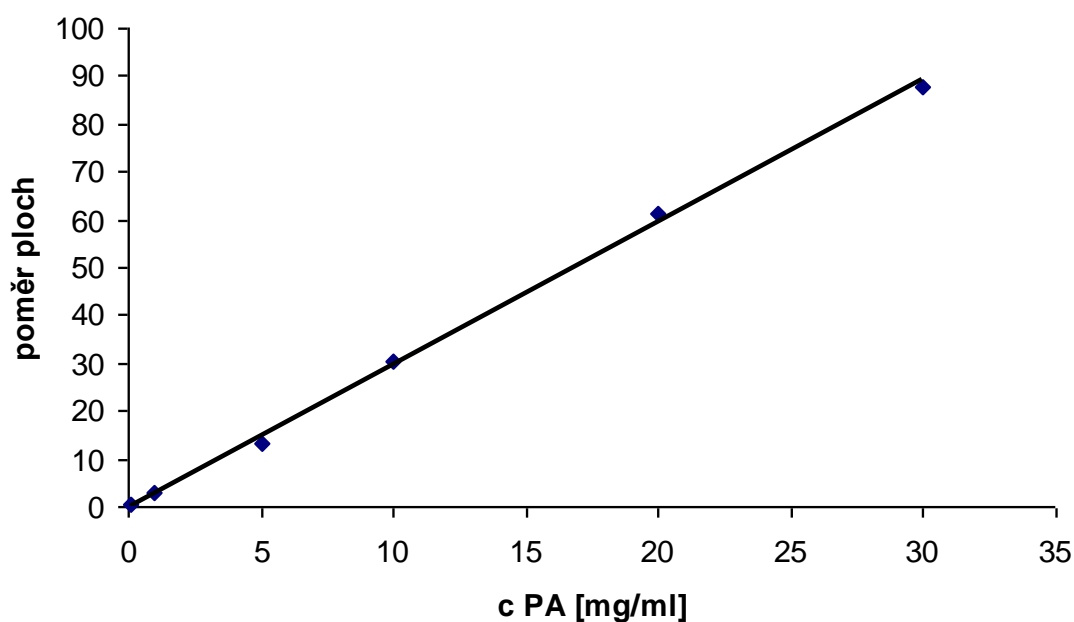
$q = -0,145 \pm 0,864$

Koeficient korelace: 0,9993

Reziduální odchylka: 1,4810

Hodnota F-statistiky:  $2,83 \cdot 10^3$

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%



Obr. 11 Kalibrační závislost pro paracetamol; BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8

V sledovaném rozmezí koncentrací paracetamolu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9993)

### 5.2.2. Kalibrační závislost pro kofein

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,8 mg/ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$k = 1,3818 \pm 0,0585$

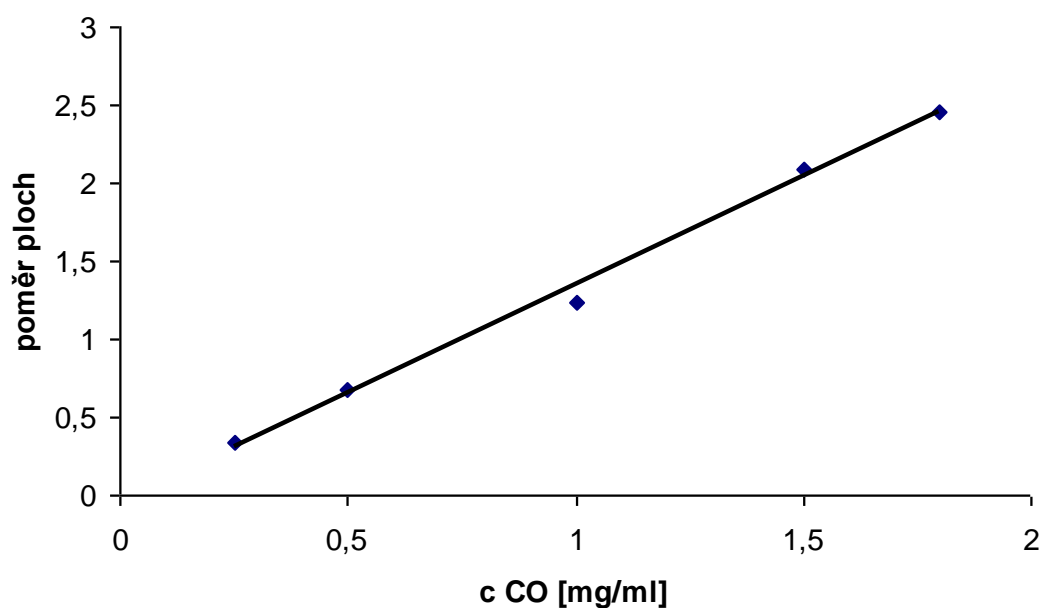
$q = -0,038 \pm 0,068$

Koeficient korelace: 0,9973

Reziduální odchylka: 0,0762

Hodnota F-statistiky: 559

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%



Obr. 12 Kalibrační závislost pro kofein; BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8

V sledovaném rozmezí koncentrací kofeinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9973)

### 5.2.3. Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou

Měření byla prováděna pro následující koncentrace: 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,8 mg/ml, 2,16 mg/ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$k = 0,6082 \pm 0,0256$

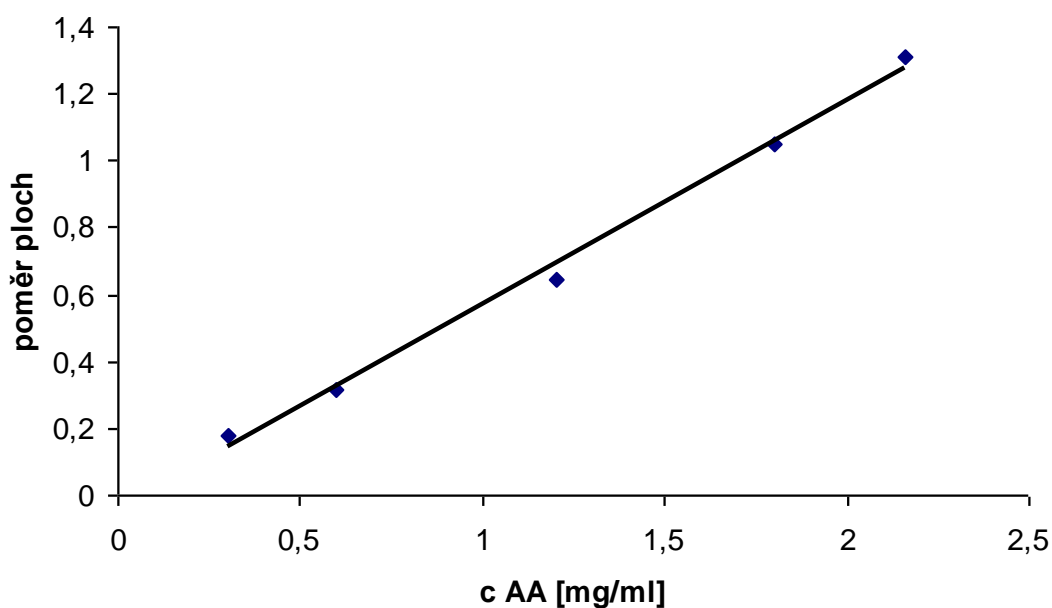
$q = -0,036 \pm 0,036$

Koeficient korelace: 0,9974

Reziduální odchylka: 0,0048

Hodnota F-statistiky: 565

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%



Obr. 13 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou; BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8

V sledovaném rozmezí koncentrací kyseliny askorbové je závislost lineární (korelační koeficient 0,9974)

#### 5.2.4. Kalibrační závislost pro fenylefrin

Měření byla prováděna pro následující koncentrace: 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,36 mg/ml.

Počet bodů: 5

Počet stupňů volnosti: 3

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

$k = 11,1349 \pm 0,5221$

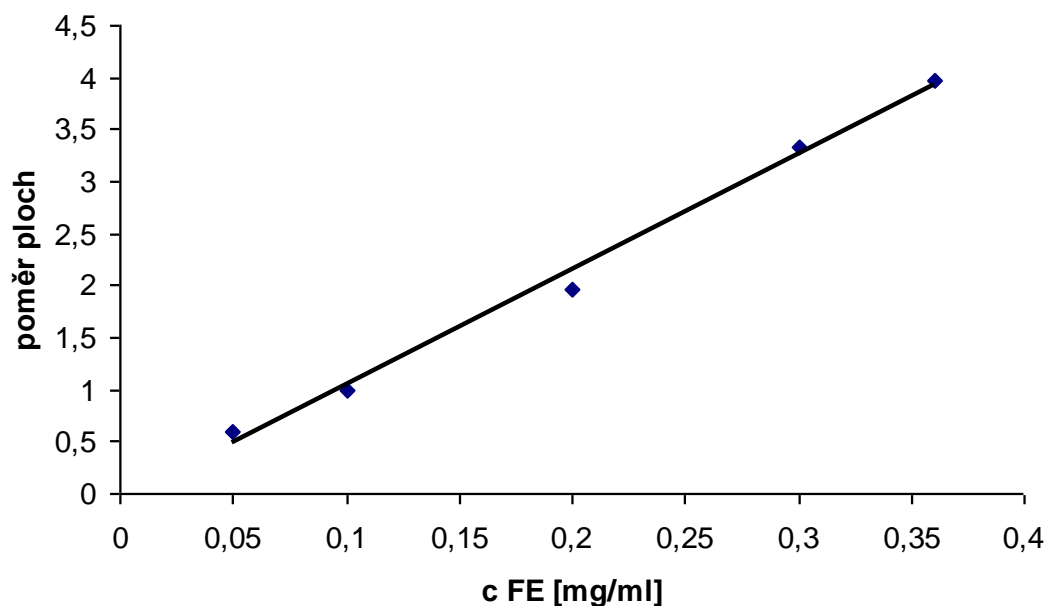
$q = -0,078 \pm 0,122$

Koeficient korelace: 0,9967

Reziduální odchylka: 0,1362

Hodnota F-statistiky: 455

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9%



Obr. 14 Kalibrační závislost pro fenylefrin; BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8

V sledovaném rozmezí koncentrací fenylefrinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9967)

### 5.3. OPAKOVATELNOST METODY

Pro ověření opakovatelnosti poměrů ploch píků a migračních časů jsem provedla šest měření pro danou koncentraci. Směrodatnou odchylku jsem vypočítala podle vztahů na str. 42.

Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 11 a Tab. 12.

Tab. 11 Opakovatelnost poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu (n=6)

Analyt	c [mg/ml]	Plocha píku/ plocha píku IS	s	s <sub>r</sub> [%]
PA	5	13,1677	0,0810	0,62
CO	1	1,2209	0,0108	0,89
AA	1,2	0,6355	0,0070	1,10
FE	0,2	1,9365	0,0380	1,96

Relativní směrodatná odchylka velikosti poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu se pohybuje v rozmezí 0,69 – 1,96 %. Největší hodnota byla zjištěna pro fenylefrin, který migruje v nejdelším čase.

Tab. 12 Opakovatelnost migračních časů (n=6)

Analyt	c [mg/ml]	t <sub>m</sub> [min]	s	s <sub>r</sub> [%]
PA	5	2,5652	0,0080	0,31
CO	1	2,8328	0,0113	0,40
AA	1,2	3,5762	0,0152	0,42
FE	0,2	8,7487	0,0306	0,35

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybuje v rozmezí 0,31-0,42 % a prakticky u všech analytů je podobná a velmi dobrá.

#### 5.4. ANALÝZA HVLP

Vypracovanou metodu jsem použila pro analýzu léčivého přípravku Coldrex tablety metodou vnitřního standardu.

Léčivý přípravek obsahuje paracetamol 500 mg, fenylefrin 5 mg, kofein 25 mg, terpin 20 mg, kyselinu askorbovou 30 mg v 1 tabletě.

Při kontrole obsahu účinných látek v přípravku Coldrex tabl. byla směs standardů připravena tak, že kopírovala vzájemný poměr, v jakém jsou obsaženy v tabletě, tj. PA : CO : AA : FE = 100 : 5 : 6 : 1 (pouze konc. PA byla 10 x snížena). Měření byla prováděna při  $\lambda = 190$  nm, 214 nm a 265 nm.

Při 190 nm absorbují všechny analyty, přičemž citlivost stoupá v řadě AA - CO - PA - FE.

Při 265 nm ve srovnání se 190 nm citlivost stoupá opačně od FE - PA - CO - AA, FE skoro neabsorbuje. Citlivost pro PA klesá mnohem více než u CO, podobně je trend absorpce pro tyto dva analyty při  $\lambda = 214$  nm.

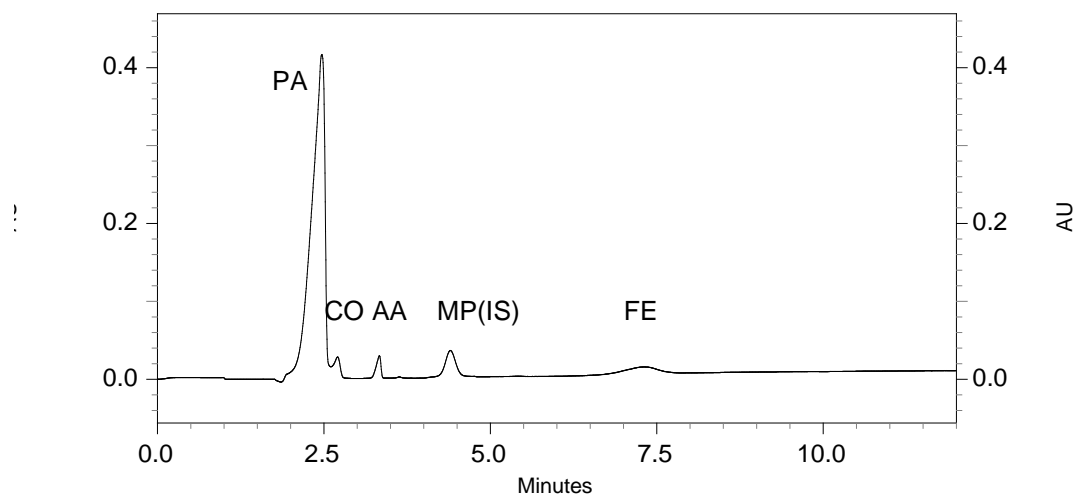
Z výše uvedeného plyne strategie pro stanovení účinných látek v Coldrexu:

1. při 190 nm -stanovení všech analytů

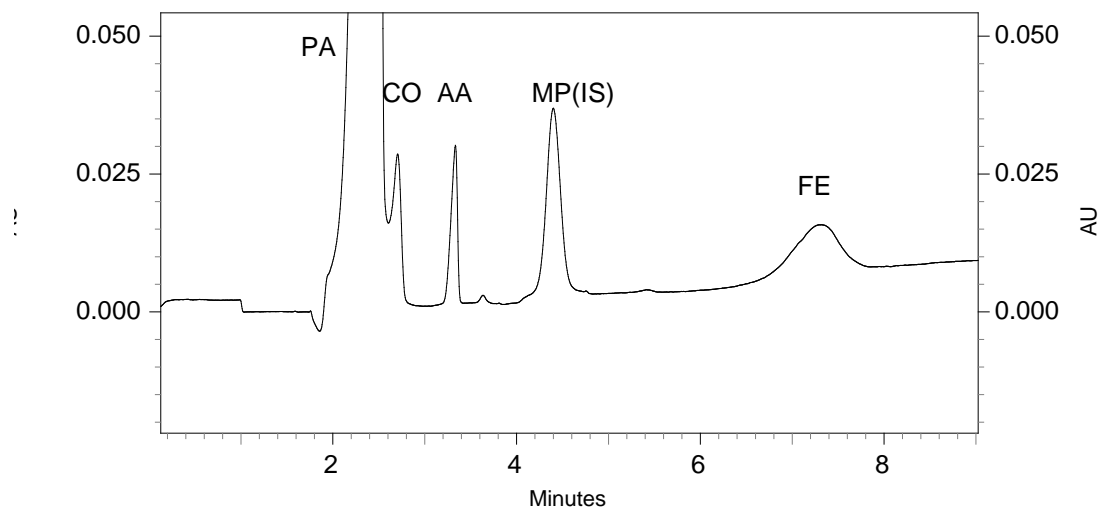
PA stanovit ještě pro ověření po naředění 1 : 10 (v jedné tabletě je 500 mg PA a píky PA a CO vykazují nejmenší rozlišení)

2. při 214 nm a 265 nm - alternativní stanovení CO pro zvýšení selektivity a přesnosti - (malé rozlišení PA a CO, PA absorbuje mnohem méně než při 190 nm). Při 265 nm lze také stanovit PA a zejména AA (vyšší citlivost)

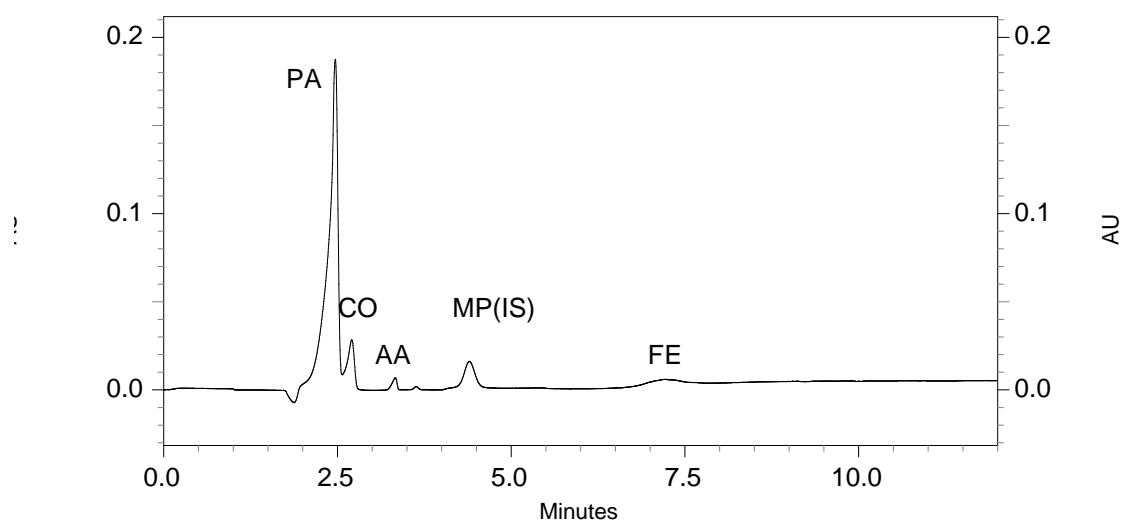
Elektroforeogramy jsou zachyceny na Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18 a Obr. 19.



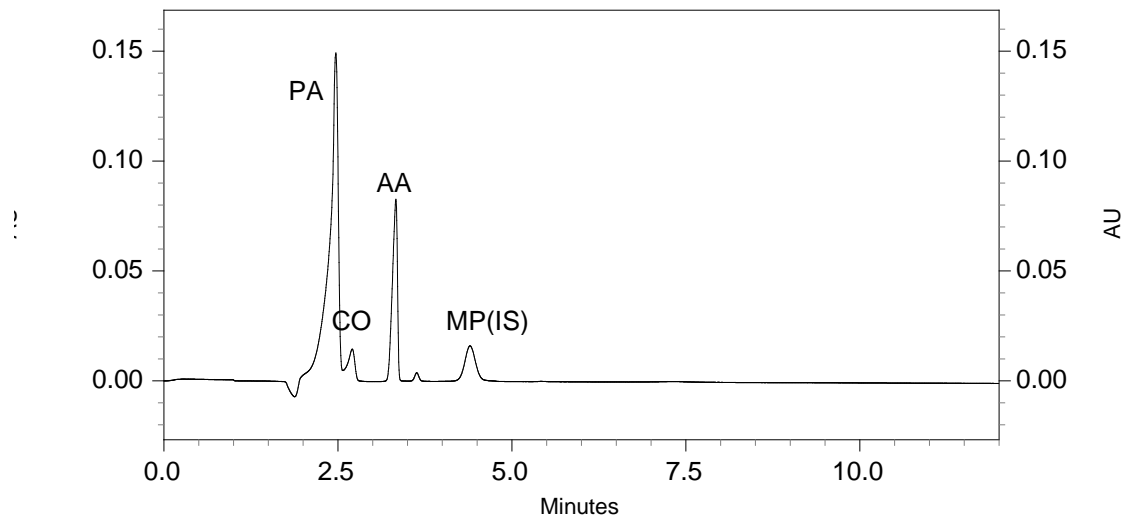
Obr. 15 Elektroforeogram přípravku Coldrex tbl., BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm



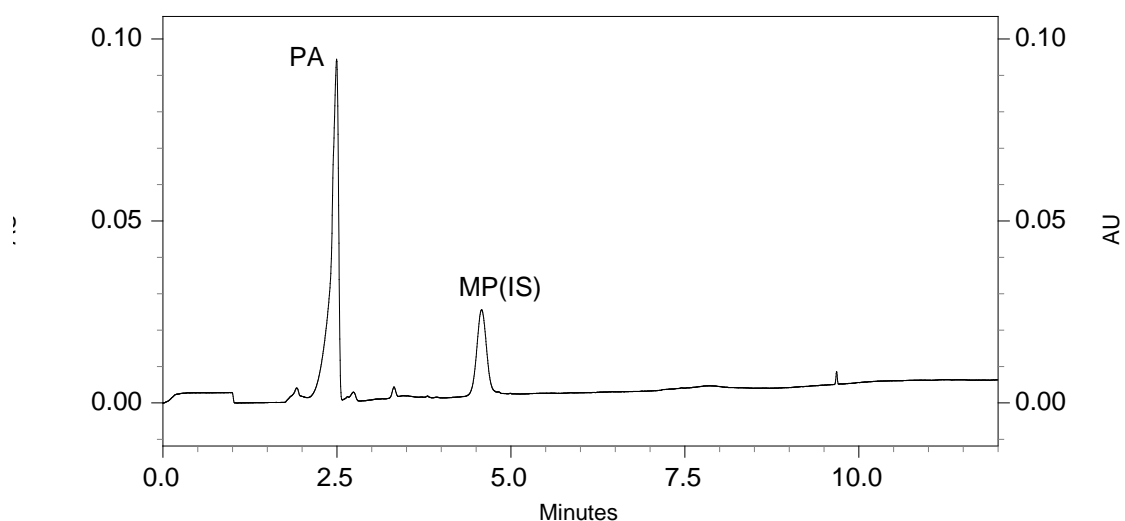
Obr. 16 Elektroforeogram přípravku Coldrex tbl., BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm (zvětšeno)



Obr. 17 Elektroforeogram přípravku Coldrex tbl., BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 214$  nm



Obr. 18 Elektroforeogram přípravku Coldrex tbl., BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm



Obr. 19 Elektroforeogram přípravku Coldrex tbl., snížená koncentrace PA 10krát, BGE: 100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 7,8; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm

Oproti analýze standardů se na záznamu vyskytuje ještě navíc pík mezi kyselinou askorbovou a methylparabenem (IS), který nebyl identifikován.

Měření HVLP tablet jsem provedla pro dvě navážky po šesti měřeních, pro navážku standardů tři měření (standardy namíchaný v poměru, v jakém jsou v HVLP, jen PA 10krát nižší). Všechny látky jsem stanovila při 190 nm, PA navíc při této vlnové délce po dalším naředění 10krát (Obr. 19). CO byl stanoven ještě při 214 nm a PA, CO i AA lze pohodlně stanovit při 265 nm.

Množství stanovovaných látek jsem vypočítala podle vzorce:

$$m = \frac{c_{st} \cdot P_{vz} \cdot V \cdot m_p}{P_{st} \cdot n}$$

$m$  – obsah látky v tabletě [mg]

$c_{st}$  – koncentrace standardu [mg/ml]

$P_{vz}$  – poměr plochy píky analytu k ploše píky vnitřního standardu ve vzorku tablety

$P_{st}$  – poměr plochy píky analytu k ploše píky vnitřního standardu ve vzorku standardů

$m_p$  – průměrná hmotnost tablety [g]

$V$  – objem měřeného roztoku vzorku [ml]

$n$  – navážka tabletoviny [g]

Výsledky analýzy přípravku Coldrex tabl. jsou uvedeny v Tab. 13 a Tab. 14. Není zásadní rozdíl ve výsledcích při stanovení při obou vlnových délkách.

Tab. 13 Analýza přípravku Coldrex tablety metodou MEKC při 190 nm (n=6)

Analyt	Obsah [mg/tabl] MEKC	s <sub>r</sub> [%]	Deklarovaný obsah [mg/tabl]
PA	488,5	2,30	500
CO	24,2	2,25	25
AA	28,9	1,56	30
FE	4,8	3,81	5

Tab. 14 Analýza přípravku Coldrex tablety metodou MEKC při 265 nm (n=6)

Analyt	Obsah [mg/tabl] MEKC	s <sub>r</sub> [%]	Deklarovaný obsah [mg/tabl]
PA	487,7	1,84	500
CO	24,6	1,44	25
AA	29,3	1,24	30

## 5.5. OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY

Správnost metody byla ověřena metodou analýzy vzorku přidavkem standardních látek.

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15.

Tab. 15 Recovery zjištěné metodou přidavku standardů k HVLP při 190 nm

Analyt	Vložená [mg/ml]	Nalezená [mg/ml]	Recovery [%]
PA	10,04	9,849	98,10
CO	0,52	0,509	97,88
AA	0,624	0,610	97,76
FE	0,104	0,100	96,15

Na základě dosažených výsledků lze říci, že byla vypracována metoda MEKC, kterou lze stanovit účinná protichřipková léčiva v přípravku Coldrex tabl., tj. paracetamol, kofein, kyselina askorbová a fenylefrin, a tím provést kontrolu jakosti

přípravku. Bohužel se nepodařilo stanovit obsah terpinu, který byl v předloženém BGE elektroforeticky inaktivní.

## **6. ZÁVĚRY**

Z výsledků práce vyplývají závěry:

- Pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC) byly analyzovány paracetamol, kofein, kyselina askorbová a fenylefrin.
- Bylo vyzkoušeno několik elektrolytových systémů, jako nejvhodnější se ukázal elektrolytový systém kyselina boritá/tetraboritan sodný. Použitým surfaktantem byl dodecylsírán sodný. V daném systému se nepodařilo analyzovat terpin.
- Byly hledány optimální podmínky pro separaci – pH, koncentrace kyseliny borité, SDS a přídavek methanolu, velikost pracovního napětí a teplota.
- Optimální základní elektrolyt měl složení: 100 mM kyselina boritá s obsahem 100 mM SDS v 10 % methanolu, pH\* elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 7,8 pomocí 50 mM tetraboritanu sodného.
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 31,2 cm a efektivní délce 21 cm. Bylo vkládáno napětí 20 kV, teplota kapiláry byla udržována na 20 °C. Detekce probíhala při vlnových délkách 190 nm, 214 nm a 265 nm.
- Jako vnitřní standard pro kvantitativní analýzu byl použit methylparaben.
- Byly měřeny kalibrační závislosti analytů metodou s vnitřním standardem. Kalibrační závislosti byly měřeny pro koncentrace c(PA) 0,1 – 30 mg/ml, c(CO) 0,25 – 1,8 mg/ml, c(AA) 0,3 – 2,16 mg/ml, c(FE) 0,05 – 0,36 mg/ml. Korelační koeficient vyšel pro PA 0,9993, CO 0,9973, AA 0,9974 a pro FE 0,9967.
- Byla ověřena opakovatelnost metody. Pro ověření bylo provedeno šest po sobě jdoucích měření pro koncentraci PA 5 mg/ml, CO 1 mg/ml, AA 1,2 mg/ml, FE 0,2 mg/ml. Obsah MP (IS) byl 0,2 mg/ml. Relativní směrodatná odchylka poměru plochy analytu a IS se pohybovala v rozmezí 0,62 – 1,96 %, relativní směrodatná odchylka migračních časů byla 0,31 – 0,42 %.
- Migrační čas paracetamolu byl 2,57 minut, kofeinu 2,83 minut, kyseliny askorbové 3,58 minut a fenylefrinu 8,74 minut. Methylparaben (IS) migroval jako čtvrtý v čase 5,02 minut.
- Bylo vypočítáno rozlišení mezi jednotlivými píky. Hodnoty  $R_s$  byly v rozmezí 1,75 – 8,26.
- Bylo vypočítáno množství teoretických pater  $N$  a výškový ekvivalent teoretického patra  $H$ . Hodnota  $N$  se pohybuje v rozmezí 2 503 – 13 294 a hodnota  $H$  pro celkovou délku kapiláry 23,47 – 124,65, pro efektivní délku 15,80 – 83,90.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení paracetamolu, kofeinu, kyseliny askorbové a fenylefrin v průmyslově vyráběném přípravku Coldrex tablety, v němž jsou všechny tyto látky obsaženy. Nemohl být stanoven obsah terpinu v tabletách, protože vypracovaná metoda MEKC není vhodná pro jeho separaci a

detekci. Zjištěný obsah účinných látek v přípravku odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem. Relativní směrodatná odchylka obsahu se pohybovala v rozmezí 1,56 – 3,81 % při 190 nm, při 265 nm byla v rozmezí 1,24 – 1,84 %.

- Správnost metody byla ověřena metodou analýzy vzorku s přidavkem standardních látek. Zjištěné recovery bylo pro PA 98,10 %, CO 97,88 %, AA 97,76 % a pro FE 96,15 %.

## **7. SEZNAM ZKRATEK**

EOF	elektroosmotický tok
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ITP	kapilární izotachoforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
GC	plynová chromatografie
MLC	micelární kapalinová chromatografie
PA	paracetamol
CO	kofein
AA	kyselina askorbová
FE	fenylefrin
TE	terpin
MP	methylparaben
SDS	dodecylsírán sodný
MeOH	methanol
ACN	acetonitril
IS	vnitřní standard
CMC	kritická micelární koncentrace
CD	cyklodextrin
ZR ST	zásobní roztok standardů
ZR IS	zásobní roztok vnitřního standardu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek

## **8. LITERATURA**

1. Churáček J. a kolektiv: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha, 1993
2. Tůma, P., Opekar, F., Jelínek, I.: Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu, Chem. Listy 93, 1999, 533-535
3. Heiger, D. N.: High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction, France: Hewlett-Packard Company, 1992
4. Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, Chem. Listy 91, 1997, 320-329
5. Nishi, H, Terabe, S.: Application of elektrokinetic chromatography to pharmaceutical analysis, J. Pharm. and Biomed. Anal. 11, 1993, 1277-1287
6. Majer, J.: Analytická chemia, 1.vyd. Osveta, Martin, 1989
7. Dolník, V.: Úvod do kapilární elektroforézy. 1. vyd. Ústav analytické chemie, Brno
8. Altria, K. D.: Application of microemulsion elektrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. J. Chromatogr. A, 1999, 844(1-2), 377-386
9. Foret, F., Křivánková, L., Boček, P.: Capillary zone electrophoresis, VHC Verlagsgesellschaft mbH, Wenheim, Germany, 1993
10. Khaledi, M. G.: High-performance capillary electrophoresis, Theory, Techniques and Applications, John Wiley & Sons, INC, New York, 1998
11. Klouda, P.: Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003
12. Marina, M. L.: Analysis and detection by capillary electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, Elsevier B. V., 2005
13. Lunte, S. M., Radzik, D. M.: Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis, Pergamon, Elsevier Science Ltd, Oxford, UK, 1996
14. Drbal, K., Křížek, M.: Analytická chemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1989
15. Grossmann, P. D. Coburn, J. C.: Capillary electrophoresis, Academic Press, Inc., London, 1992
16. Foret, F., Fanali, S., Ossicini, L., Boček, P.: Indirect photometric detection on capillary electrophoresis, J. Chromatogr. 470, 1989, 299-308
17. Issaq, H. J.: A decade of capillary electrophoresis, Electrophoresis 21, 2000, 1921-1939
18. Boček, P., Deml, M. et al.: Analytická kapilární izotachoforéza. Academia, Praha 1987
19. Vincent T. Remcho: Capillary elektrokinetic chromatography (CEC): An introduction to a high-efficiency microanalytical technique, The Chemical Educator, 2, 1997

20. Huiyan, Y.: Reversed capillary electrochromatography: Investigation of peak symmetry for eluting curves of solutes, National Chromatography Research & Analysis Center, 58, 2003, 317–320
21. Kaniansky, D., Masár, M., Marák, J., Bodor, R.: Capillary electrophoresis of inorganic anions, J. Chromatogr. 834, 1999, 133-178
22. Altria, K. D.: Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. A 892, 2000, 171-186
23. Pedersen-Bjergaard, S., Halvorsen, T. G.: Analysis of pharmaceuticals by microemulsion electrokinetic chromatography in a suppressed electroosmotic flow environment, Chromatographia, 52, 2000, 593-598
24. Monzurova, T. G.: Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, Pharm. Chem. J., 2006, 40, 158-170
25. Nishi, H., Terabe, S.: Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis, J. Chromatogr. A, 735, 1996, 3-27
26. Holland, L., A.: Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, Pharm. Research, 14, No. 4, 1997, 372-386
27. Wesselman, H. J.: Assay of terpin hydrate and codeine elixir by gas chromatography, J. Pharm. Sci., 57, No. 8, 1968, 1412-1415
28. Kubiak, E. J.: Determination of terpin hydrate by gas-liquid chromatography, J. Pharm. Sci, 57, No. 3, 1968, 473 - 474
29. X. Xu, W. Th. Kok, H. Poppe: Noise and baseline disturbance in indirect UV detection in capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, 786, 1997, 333-345
30. Muiselaar, P. G., Otsuka, K., Terabe, S.: Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. A, 780, 1997, 41-61
31. Lincová, D., Farghali, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. 1. vyd. Galén, Praha, 2002
32. Mikro-verze Automatizovaného informačního systému léčivých přípravků (AISLP) 2006.1 pro MS Windows
33. Český lékopis 2005. 1. vyd. Grada Publishing a. s., Praha, 2005
34. Gomez, M. R., Olsina, R. A. et al.: Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis, J. Pharm. Biomed. Anal., 30, 2002, 791-799
35. Lemus Gallego, J. M., Arroyo, J. P.: Determination of prednisolone acetate, sulfacetamide and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography, J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 2003, 873-884

36. Marchesini, A. F., Williner, M. R. et al.: Simultaneous determination of naphazoline, difenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 2003, 39-46
37. Gumbhir, K., Mason, W. D.: High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and its conjugates in human plasma using solid-phase extraction and electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14, 1996, 623-630
38. Lau, O.-W. Mok Ch.-S.: High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection, *J. Chromatogr. A*, 693, 1995, 45-54
39. Devarajan, P., V., Adani, M., H. et al.: Simultaneous determination of lignocaine hydrochloride and phenylephrine hydrochloride by HPTLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22, 2000, 685-690
40. Okamoto, H., Nakajima, T. et al.: Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37, 2005, 517-528
41. Okamoto, H., Nakajima, T. et al.: Simultaneous determination of ingredients in vitamin-enriched drink by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 2002, 815-822
42. Bosch, M., E., Sánchez, A., J., R. et al.: Review: Determination of paracetamol: Historical evolution, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 42, 2006, 291-321
43. Nemetu, T., Jankovics, P. et al.: Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47, 2008, 746-749
43. Goto, T., Yoshida, Y. et al.: Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea, *J. Chromatogr. A*, 749, 1996, 295-299
44. Onur, F.: The simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, paracetamol, chlorpheniramine maleate and dextromethorphan hydrobromide in pharmaceutical preparations, *Chromatographia*, 66, 2007, 93-96
45. Takahashi, F., Jin, J.: Rapid determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and total vitamin C by electrochemiluminescence with a thin-layer electrochemical cell, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 2009, 1669-1675
46. Shaidarova, L. G., Chelnokova, I. A. et al.: Simultaneous voltammetric determination of dopamine and ascorbic acid at an electrode modified with the gold-palladium binary system, *J. Anal. Chem.*, 64, No. 1, 2009, 36-43
47. Wang, M. Y., Xu, X. Y. et al.: Development of an amperometric sensor for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using 2-[bis(2-

- aminoethyl)amino]ethanol, 4,4'-bipyridine bridged dicopper (II) complex, J. Appl. Electrochem., 38, 2008, 1269-1274
48. Marin, A., Barbar, C.: LC/MS for the degradation profilig of cough-cold products under forced conditions, J. Pharm. Biomed. Anal., 35, 2004, 1035-1045
49. Hirokawa, T., Nishino, M. et al.: Table of isotachophoretic indices : I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range ph 3–10, J. Chromatogr. A, 271, 1983, D1-D106
50. Lai, E. P. C., Feng, S. Y.: Solid phase extraction - Non-aqueous capillary electrophoresis for determination of metformin, phenformin and glyburide in human plasma, J. Chromatogr. B, 843, 2006, 94-99
51. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (nahlíženo 17.4.2009)
52. [http://fch.upol.cz/vyzkum/texty/micelles\\_cz.htm](http://fch.upol.cz/vyzkum/texty/micelles_cz.htm) (nahlíženo 9.5.2009)
53. Šabartová, J.: Věstník SÚKL 1/1994, Validace analytických metod, str. 6, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha 1993

## **9. OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	10
2.1.1. Elektroforetická pohyblivost	11
2.1.2. Iontová pohyblivost	11
2.1.3. Skutečná pohyblivost	11
2.1.4. Efektivní pohyblivost	11
2.1.5. Migrační čas	12
2.1.6. Elektroosmotický tok	13
2.1.7. Děje ovlivňující pohyblivost	15
2.1.7.1. <i>Vliv pH pracovního elektrolytu</i>	15
2.1.7.2. <i>Tvorba komplexů</i>	15
2.1.7.3. <i>Tvorba iontových asociátů</i>	16
2.1.7.4. <i>Tvorba hostitelských komplexů</i>	16
2.1.7.5. <i>Vliv nevodných rozpouštědel</i>	16
2.1.7.6. <i>Vliv síťujícího prostředí</i>	16
2.1.7.7. <i>Vliv ionogenních smáčedel</i>	17
2.1.8. Děje ovlivňující separaci	17
2.1.8.1. <i>Difúze</i>	17
2.1.8.2. <i>Elektromigrační disperze</i>	18
2.1.8.3. <i>Jouleův ohřev</i>	18
2.1.8.4. <i>Sorpce</i>	18
2.1.8.5. <i>Délka detekční cely</i>	19
2.1.8.6. <i>Délka nástřiku</i>	19
2.1.9. Instrumentální uspořádání	19
2.1.9.1. <i>Separační kapilára</i>	19
2.1.9.2. <i>Zdroj vysokého napětí</i>	20
2.1.9.3. <i>Dávkování vzorku</i>	20
2.1.9.4. <i>Detekce</i>	21
2.1.10. Aplikace kapilární elektroforézy	24
2.2. MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE	24
2.2.1. Migrace v MEKC	26
2.2.2. Kapacitní faktor	26
2.2.3. Rozlišení	27
2.2.4. Faktory ovlivňující separaci	27
2.2.4.1. <i>Typ a koncentrace surfaktantu</i>	27
2.2.4.2. <i>Modifikátory</i>	27

2.2.4.3. <i>Vliv pH a teploty</i>	28
2.2.5.    Surfaktanty používané v MEKC	28
2.2.5.1. <i>Aniontové surfaktanty s dlouhým alkylovým řetězcem</i>	28
2.2.5.2. <i>Kationtové surfaktanty</i>	28
2.2.5.3. <i>Neiontové surfaktanty</i>	28
2.2.5.4. <i>Žlučové soli</i>	28
2.2.5.5. <i>Chirální surfaktanty</i>	29
2.3.    KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	29
2.4.    KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA	29
2.5.    IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE	29
2.6.    KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRFIE	30
2.7.    MIKROEMULZNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRFIE	30
2.8.    KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	30
2.9.    PARACETAMOL	31
2.9.1.    Metody stanovení paracetamolu	31
2.10.    KOFEIN	32
2.10.1.    Metody stanovení kofeinu	32
2.11.    Kyselina askorbová	32
2.11.1.    Metody stanovení kyseliny askorbové	33
2.12.    FENYLEFRIN	33
2.12.1.    Metody stanovení fenylefrinu	33
2.13.    TERPIN	34
2.13.1.    Metody stanovení terpinu	34
<b>3.    CÍL PRÁCE</b>	<b>35</b>
<b>4.    EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>37</b>
4.1.    CHEMIKÁLIE	38
4.2.    PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	39
4.2.1.    Roztoky pracovních elektrolytů	39
4.2.2.    Roztoky standardů pro optimalizaci metody	39
4.2.3.    Hledání vnitřního standardu	39
4.2.4.    Kalibrační roztoky	39
4.2.5.    Příprava vzorku HVLP	40
4.2.6.    Příprava vzorků pro ověření správnosti metody	40
4.3.    PŘÍSTROJE	41
4.3.1.    Kapilární elektroforetický systém Beckman	41
4.4.    PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY	41
4.4.1.    Pracovní postup	41

4.4.1.1. <i>Měření kalibrační závislosti</i>	42
4.4.2. Opakovatelnost metody	42
4.4.3. Rozlišení	42
4.4.4. Účinnost separace	43
4.4.5. Správnost metody	43
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>44</b>
5.1. OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A SOUČASNÉ STANOVENÍ PARACETAMOLU, KOFEINU, KYSELINY ASKORBOVÉ, FENYLEFRINU A TERPINU	45
5.1.1. Detekce	46
5.1.2. Volba pracovního elektrolytu	46
5.1.3. Vnitřní standard	47
5.1.4. Optimalizace základního elektrolytu	47
5.1.5. Vliv koncentrace SDS	47
5.1.6. Optimalizace hodnoty pH	48
5.1.7. Vliv koncentrace metanolu	48
5.1.8. Vliv napětí	49
5.1.9. Vliv teploty	50
5.1.10. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření	50
5.1.11. Rozlišení	52
5.1.12. Účinnost separace	52
5.2. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	54
5.2.1. Kalibrační závislost pro paracetamol	55
5.2.2. Kalibrační závislost pro kofein	56
5.2.3. Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou	57
5.2.4. Kalibrační závislost pro fenylefrinu	58
5.3. OPAKOVATELNOST METODY	59
5.4. ANALÝZA HVLP	60
5.5. OVĚŘENÍ SPRÁVNOSTI METODY	64
<b>6. ZÁVĚRY</b>	<b>66</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>69</b>
<b>8. LITERATURA</b>	<b>71</b>
<b>9. OBSAH</b>	<b>76</b>

