

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

**2010**

**Mgr. Drahomíra KUBÍKOVÁ**

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

---

**STANOVENÍ PARACETAMOLU, KYSELINY ASKORBOVÉ  
A FENYLEFRINU VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH POMOCÍ  
MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRFIE**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

*Konzultant rigorózní práce: Doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc*

*HRADEC KRÁLOVÉ, 2010*

*Mgr. Drahomíra Kubíková*

Děkuji Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, cenné rady i připomínky při zpracování této práce. Děkuji též pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícné jednání.

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.

V Měčíně, 1. 3. 2010

Mgr. Drahomíra Kubíková

## OBSAH

OBSAH.....	3
SEZNAM ZKRATEK .....	6
1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 Kapilární elektromigrační metody .....	12
2.1.1 Elektroforetická pohyblivost.....	13
2.1.2 Iontová pohyblivost .....	13
2.1.3 Efektivní pohyblivost.....	13
2.1.4 Skutečná pohyblivost.....	14
2.1.5 Migrační čas.....	15
2.1.6 Elektroosmotický tok (EOF).....	15
2.1.7 Děje ovlivňující elektroforetickou pohyblivost .....	17
2.1.8 Děje ovlivňující separaci .....	19
2.1.9 Instrumentální uspořádání.....	22
2.1.10 Aplikace kapilární elektroforézy .....	26
2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie .....	26
2.2.1 Migrace v MEKC.....	28
2.2.2 Kapacitní faktor( $\alpha$ ).....	29
2.2.3 Rozlišení ( $\alpha$ ).....	29
2.2.4 Faktory ovlivňující separaci.....	30
2.2.5 Surfaktanty používané v MEKC.....	31
2.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	32
2.4 Kapilární izotachoforéza (ITP).....	32
2.5 Izoelektrická fokusace.....	33
2.6 Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	33

2.7	Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) .....	33
2.8	Kapilární gelová elektroforéza .....	34
2.9	Paracetamol .....	35
2.9.1	Příklady metod stanovení paracetamolu .....	35
2.10	Kyselina askorbová .....	37
2.10.1	Příklady metod stanovení kyseliny askorbové.....	37
2.11	Fenylefrin .....	39
2.11.1	Příklady metod stanovení fenylefrinu .....	39
3.	CÍL PRÁCE .....	41
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
4.1	Chemikálie .....	44
4.2	Roztoky .....	45
4.2.1	Pracovní elektrolyty .....	45
4.2.2	Optimalizace metody – roztok zkoušených látek .....	45
4.2.3	Vnitřní standard .....	45
4.2.4	Příprava kalibračních roztoků .....	45
4.2.5	Příprava vzorku HVLP .....	46
4.2.6	Příprava vzorků pro ověření správnosti metody .....	47
4.3	Přístroje .....	47
4.3.1	Kapilární elektroforetický systém Beckman.....	48
4.4	Pracovní a výpočetní postupy .....	48
4.4.1	Pracovní postup.....	48
4.4.2	Reprodukovatelnost .....	49
4.4.3	Rozlišení .....	49
4.4.4	Účinnost separace .....	50
4.4.5	Správnost .....	50
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	51

5.1	Vývoj a optimalizace metody pro separaci a současné stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu .....	52
5.1.1	Detekce – volba vlnové délky.....	52
5.1.2	Testování druhu BGE .....	53
5.1.3	Testování druhu vnitřního standardu .....	54
5.1.4	Vliv pH BGE .....	54
5.1.5	Vliv koncentrace tenzidu .....	55
5.1.6	Vliv koncentrace BGE .....	56
5.1.7	Vliv koncentrace methanolu .....	57
5.1.8	Vliv napětí.....	57
5.1.9	Vliv teploty .....	58
5.1.10	Separáční tlumiv� roztok a instrumentální parametry .....	59
5.1.11	Způsobilst systému .....	60
5.2	Kvantitativní analýza.....	62
5.2.1	Kalibrační závislost pro paracetamol.....	63
5.2.2	Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou .....	64
5.2.3	Kalibrační závislost pro fenylefrin .....	65
5.3	Reprodukovatelnost metody.....	66
5.4	Stanovení účinných látek ve farmaceutických přípravcích.....	67
5.5	Testování správnosti metody.....	75
6.	ZÁVĚRY .....	77
7.	CITOVANÁ LITERATURA .....	80
	ABSTRAKT .....	85
	ABSTRACT.....	87

## **SEZNAM ZKRATEK**



AA	kyselina askorbová
ACN	acetonitril
CD	cyklodextrin
CEC	kapilární elektrochromatografie
CMC	kritická micelární koncentrace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
FE	fenylefrin
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HVLP	hromadně vyráběný léčivý přípravek
IS	vnitřní standard
ITP	kapilární izotachoforéza
LP	léčivý přípravek
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MLC	micelární kapalinová chromatografie
MP	methylparaben
PA	paracetamol
TAPSO	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-amino-2-hydroxypropansulfonová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan

ZR IS	zásobní roztok vnitřního standardu
ZR ST	zásobní roztok standardů

## **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)

Počátky elektroforézy spadají do 80 let 19. století. Teoretické základy položil v roce 1897 Kohlrausch. (2) Elektroforéza jako separační technika byla představena v roce 1937 Tisellem, který za svou práci získal Nobelovu cenu. První významný krok ke kapilární elektroforéze učinil v roce 1967 Hjertén, který prováděl elektroforézu v podélně rotující trubici. Později Virtanen a pak Mikkers vykonávali elektroforézu v kapilárách o vnitřním průměru přibližně 200  $\mu\text{m}$  vyrobených ze skla nebo teflonu. K dalšímu významnému pokroku došlo díky práci Jorgensona a jeho spolupracovníků, kteří na počátku 80. let 20. století ukázali praktické možnosti křemenné kapiláry. (3)

Kapilární elektroforéza 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. (4) Možnost automatizace, on-line detekce a snadná úprava selektivity metody změnami v chemickém složení pracovního elektrolytu se přiřazují k dalším přednostem této metody. (3)

Kapilární elektroforéza se využívá při analýzách anorganických, organických i biologických vzorků, které jsou předmětem zájmu v nejrůznějších oborech. Umožňuje separaci i velmi složitých směsí látek. (1)

Micelární elektrokinetická chromatografie je jedna z metod kapilární elektroforézy. Zahrnuje i principy chromatografické a díky užití elektricky nabitých micel v pracovním elektrolytu působících jako pseudostacionární fáze umožňuje nejen separaci iontových, ale i neiontových sloučenin. (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 přívodními 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

Separční 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. (2; 7) V případě kapilární gelové elektroforézy jsou složky vzorku separovány podle velikosti a tvaru molekuly. (8)

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. (2)

### **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; 2)

$$v = u \cdot E$$

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

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

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

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. Pro dvojici iont – prostředí je pohyblivost charakteristickou konstantou. (2)

### **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°C vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%). (2)

### **2.1.3 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. disociačním stupněm. (6) Protože ionizační

rovnováha probíhá nepoměrně rychleji než elektromigrace, nemůže dojít k rozdělení rovnovážné směsi na nepohyblivé molekuly a pohyblivé ionty. (2) Směs putuje jednotnou rychlostí, která je úměrná disociačnímu stupni. (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

Složení rovnovážné směsi lze tedy upravit volbou pH a tím regulovat pohyblivost podle potřeby od nulové až po plnou iontovou. Úprava pH je tedy účinný prostředek k dosažení optimálního dělení směsi 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). (5)

Migrační chování komplexů lze popsat podobně. Pokud ustavení rovnovážného stavu probíhá rychlostí srovnatelnou nebo nižší než je rychlost elektromigrace (př. keto a enol formy), je možné jednotlivé formy těžké látky od sebe oddělit. (2)

#### **2.1.4 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)



### 2.1.5 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 provázána hydrodynamickým tokem (např. důsledkem elektroosmózy), je třeba znát i migrační čas nenabitých částic  $t_0$ . Elektroforetická pohyblivost se pak vypočte podle vztahu: (2)

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

$l_t$  – celková délka kapiláry [m]

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

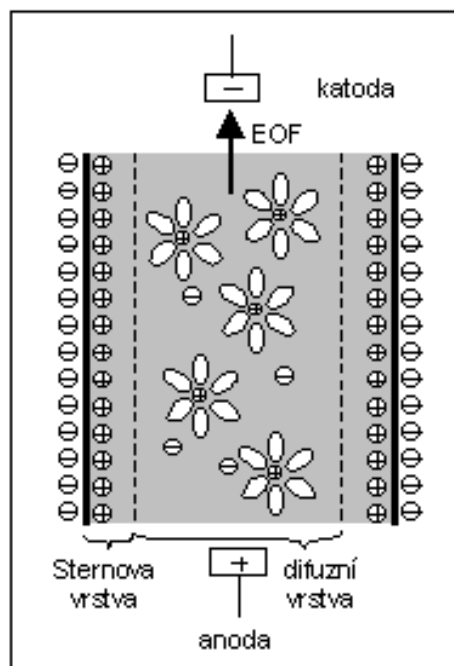
$U$  – pracovní napětí [V]

$t_m$  – migrační čas látky [s]

$t_0$  – migrační čas nenabitých částic [s]

### 2.1.6 Elektroosmotický tok (EOF)

Elektroosmotický tok je významná součást kapilárních elektroforetických separací a představuje hlavní způsob pohybu iontů v hydrodynamicky otevřeném systému. Uvnitř křemenné kapiláry dochází vlivem přítomnosti elektrolytu ke generování vrstev. První je záporně nabitá stěna kapiláry, nepohyblivá vrstva, druhou pak tvoří difusní vrstva kationtů vyrovnávající záporný náboj kapilární stěny. V elektrickém poli se pak tato přilehlá vrstva pohybuje směrem ke katodě. Takto generovaný elektroosmotický tok může být větší, než jsou vlastní elektroforetické pohyblivosti iontů obsažených ve vzorku. Důsledkem tohoto je, že kationty i anionty mohou být separovány současně během jedné analýzy. První v pořadí migrují nejmenší kationty s nejvyšším nábojem, přičemž rychlost se snižuje se snižujícím nábojem, po kationech společně s EOF migrují všechny elektroneutrální látky. Separační pořadí aniontů, migrujících po EOF, je opačné než pořadí kationtů a největší anionty s nejnižším nábojem migrují dříve než malé a více nabitě anionty. (9) 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. (10)



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]

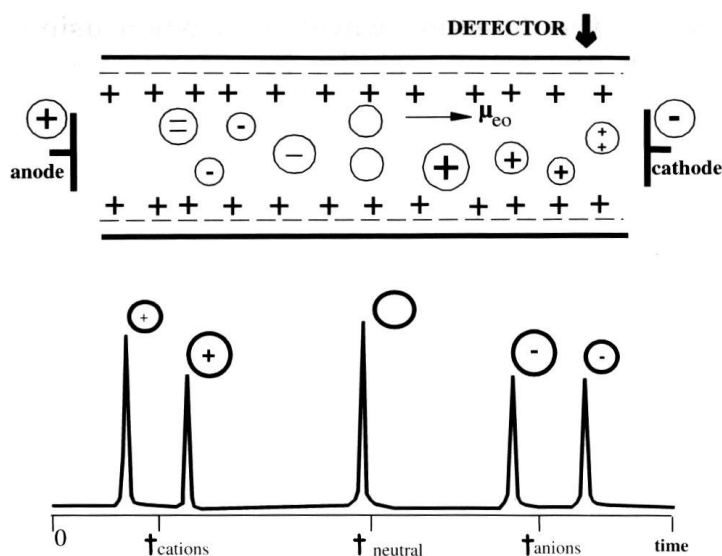
$\eta$  – viskozita roztoku [N.s.m]

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 nesený rychlostí EOF, ale nejsou od sebe separovány, anionty migrují nejpomaleji, protože jsou sice nesený 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. (2)

#### 2.1.7.1 **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. (2)

#### 2.1.7.2 **Nevodná rozpouštědla**

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. (2)

#### 2.1.7.3 **Iontové asociáty**

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. (2) 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 alkylfosfáty, alkylsulfonáty, alkylsulfáty a opticky aktivní látky jako je např. dibutyltartarát. (13)

#### 2.1.7.4 **Komplexy**

U analytů, které mohou vytvářet komplexy, může dojít ke zlepšení jejich separace přídavkem 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. (2)

#### 2.1.7.5 **Hostitelské komplexy**

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. (2)

#### 2.1.7.6 **Ionogenních smáčedla**

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. (2)

#### 2.1.7.7 **Sít'ující prostředí**

Sít'ující prostředí se využívá pro separaci polymerů, které se liší molekulovou hmotností, avšak ne hustotou elektrického náboje. Sít'ujícím prostředím s největší tradicí je polyakrylamidový gel. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší molekuly jsou při migraci sít'ujícím prostředím více zpomalovány. Dnes jsou gelové kapiláry nahrazovány roztoky lineárních polymerů, které vytvářejí síť. Nejčastěji používanými jsou deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a další. (2)

### **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. (2)

### 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 difúzí 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. (2)

### 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 pohyblivosti se ionty v ose kapiláry, kde teplota dosahuje vyšších hodnot, pohybují nejrychleji, zatímco na okraji nejpomaleji. Tento jev zaznamenává detektor jako rozšíření zóny. (2)

### 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. (2)

### 2.1.8.5 Délka detekční cely

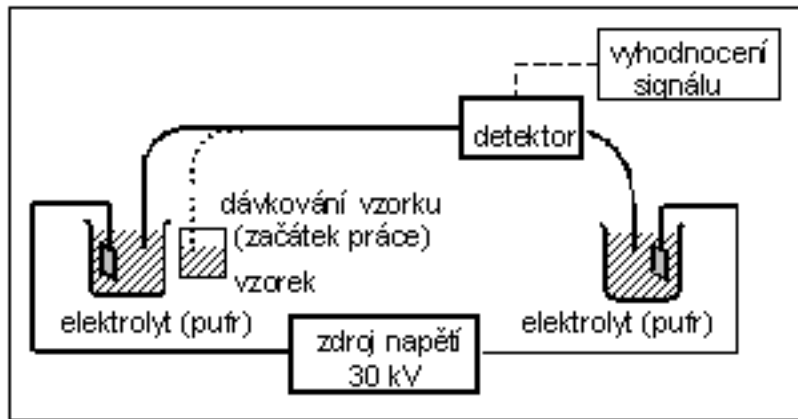
Pro zvýšení účinnosti separace je žádoucí délku detekční cely minimalizovat, to však vede ke snížení detekční citlivosti. Délka detekční cely je tedy kompromisem mezi účinností separace a citlivostí detekce. (2)

### 2.1.8.6 Délka nástřiku

Délku nástřikového pulsu je vhodné minimalizovat. (2)

### 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. (2)



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. (2)



### 2.1.9.2 Zdroj vysokého napětí

Do zásobníků pracovního elektrolytu jsou umístěny elektrody vysokonapěťového zdroje o rozsahu 0 – 30 kV. Vyšší napětí se neužívá kvůli nebezpečí ionizace vzduchu a elektrických výbojů. (2) Měla by zde být možnost přepínání polarity elektrod. (3)

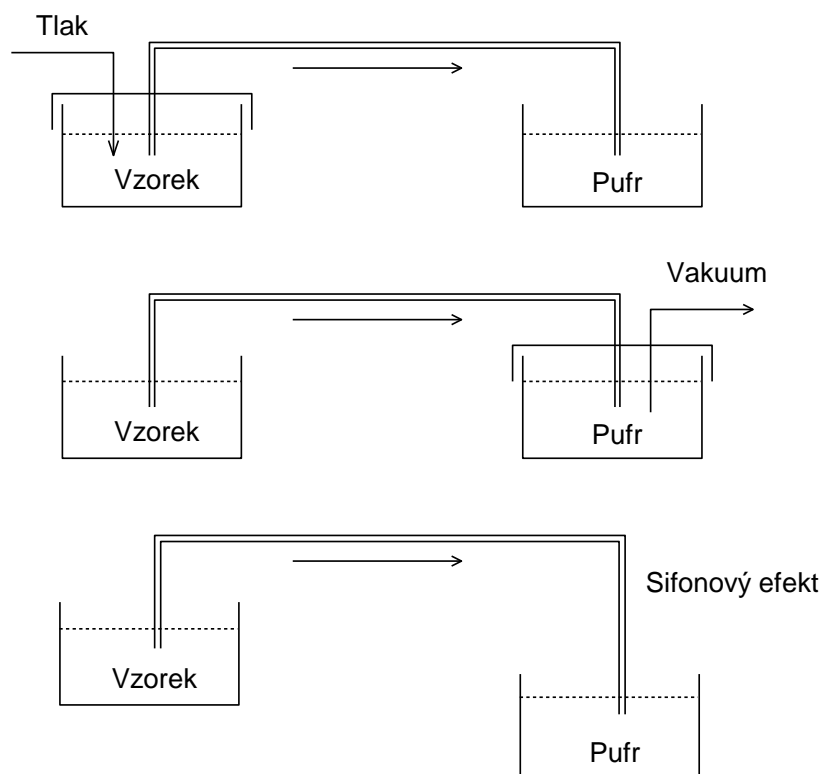
### 2.1.9.3 Dávkování vzorku

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

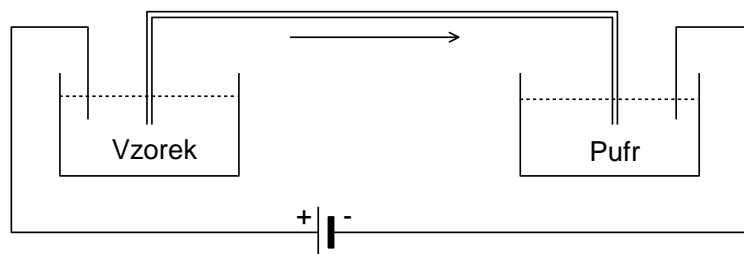
Hydrodynamické dávkování spočívá ve vtlačování úzkého sloupce roztoku vzorku do kapiláry vlivem tlakových rozdílů podél kapiláry. Existují různé mechanismy pro dosažení tlakového spádu. Jedná se o aplikaci tlaku na „dávkovací“ konec kapiláry, použití vakua na distálním konci kapiláry nebo využití tzv. 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. (2)

## 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. (16)

#### **2.1.9.4.1 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. (2)

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 elektroforeogramu projeví jako negativní pík. (17)

#### **2.1.9.4.2 Fluorescence**

Fluorescence a především laserem indukovaná fluorescence je vysoce citlivá metoda. (2)

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 flureskamin. (2; 16)

#### **2.1.9.4.3 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. (2)

#### **2.1.9.4.4 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 sacharidů, thioetherů a thiolů.

V potenciometrické a konduktometrické detekci je jako analytická odezva měřen potenciál nebo vodivost mezi dvěma elektrodami. (16)

#### **2.1.10 Aplikace kapilární elektroforézy**

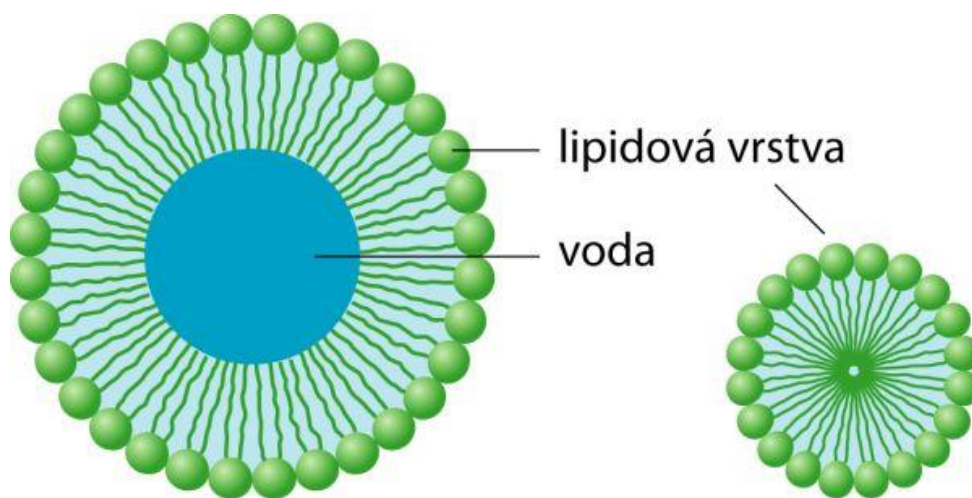
Využití kapilární elektroforézy je rozsáhlé a zasahuje do mnoha vědeckých i praktických oblastí. Lze ji aplikovat na separaci velkého množství rozmanitých chemických sloučenin – anorganických iontů, organických molekul a bioorganických makromolekul. Umožňuje určení aminokyselinového složení hydrolyzátu 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. (2; 18)

## **2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie**

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), někdy uváděná též jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), byla představena v roce 1984 Terabem. (5)

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. (19)

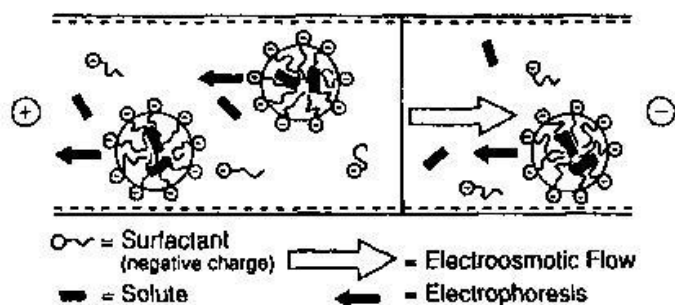
Základem této metody je přidavek povrchově aktivního činidla do základního elektrolytu o vyšší koncentraci než je kritická micelární koncentrace. Vytvoří se micely, ve kterých jsou molekuly surfaktantu orientovány tak, že hydrofobní řetězce směřují do středu a polární nabitě části jsou na povrchu micel (20)(Obr. 5).



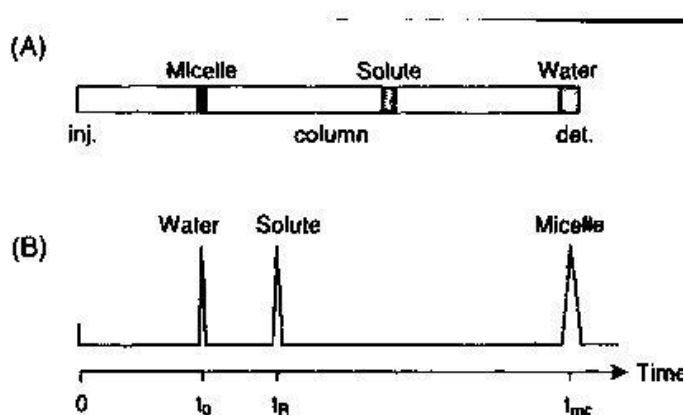
Obr. 5 Schematické znázornění struktury micely (21)

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. Nabitě soluty jsou separovány prostřednictvím iontových interakcí s micelami. (19)

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



Obr. 6 Separční princip MEKC (19)



Obr. 7 Separace v MEKC (19)

### 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. (20)

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. (5)

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  $t_{mc}$ . (5; 20)

### 2.2.2 Kapacitní faktor (20)

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 (20)

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

$N$  – 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. (5)

### **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 selektivitě.

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. (5)

### **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. (5)

## **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-methyltaurát sodný. (5; 22)

### **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). (20; 22)

### **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. (22)

### **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. (20; 22)

#### 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. (22)

### 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. (10; 23)

### 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. (10)

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. (24)

## 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. (10) V tomto místě se látka stává elektroneutrální a dojde k jejímu zakoncentrování. Vzniká tak ostrá zóna analytu. (6)

## 2.6 Kapilární elektrochromatografie (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. (25; 26)

## 2.7 Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (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. (7; 27; 28)

## **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). (10; 11)

## 2.9 Paracetamol

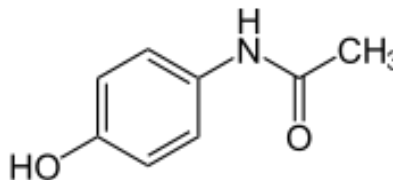
Paracetamololum

$C_8H_9NO_2$

*N*-4-(hydroxyfenyl)acetamid

$M_r = 151,16$  (29)

$pK_a = 9,5$  (30)



Vlastnosti:

Bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96 %, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu. Taje při teplotě 168 °C až 172 °C. (29)

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 Příklady metod stanovení paracetamolu

Pro stanovení paracetamolu bylo navrženo mnoho metod. Můžeme se setkat s metodami optickými (UV spektrofotometrie, VIS spektrofotometrie, průtoková injekční spektrofotometrie, IR spektrofotometrie, spektrofluorimetrie), chemiluminiscenčními, elektroanalytickými, chromatografickými (HPLC, TLC, MLC) i s kapilárními elektroforetickými metodami. (33)

- 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 (34)

- 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 (35)
- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-chloristan sodný, C 18 kolona (250 X 4,6 mm), stanovení paracetamolu, fenylefrinu, chlorfenylaminu a dextromethorfanu (36)
- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: voda-methanol, okyseleno kyselinou *o*-fosforečnou na pH 2,9; C 18 kolna (250 X 4,0 mm), stanovení paracetamolu (37)
- Spektrofotometrie, stanovení paracetamolu a *p*-aminofenolu (38)
- Spektrofluorimetrie, stanovení paracetamolu (39)

## 2.10 Kyselina askorbová

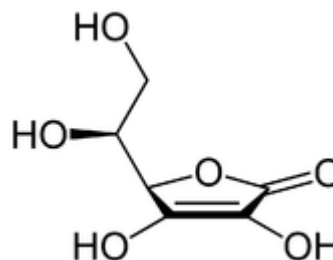
Acidum ascorbicum

(5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5*H*)-on

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

M<sub>r</sub> = 176,13 (29)

pK<sub>a</sub> = 4,04 (40)



Vlastnosti:

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru. Taje při asi 190 °C, za rozkladu. (33)

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)

### 2.10.1 Příklady metod stanovení kyseliny askorbové

Metody stanovení kyseliny askorbové lze rozdělit do několika skupin: titrační, spektrofotometrické (UV-VIS spektrofotometrie, fluorimetrie, chemiluminiscenční metody), elektrochemické, kinetické, separační (zejména chromatografické). (41)

- 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 (34)
- Elektrochemiluminiscence, stanovení kyseliny askorbové, dehydroaskorbové a celkového vitamínu C (42)
- Voltametrie, stanovení kyseliny askorbové a dopaminu (43)

- Cyklická voltametrie, stanovení kyseliny askorbové a kyseliny močové (44)
- Kinetické stanovení - Bělousovova-Žabotinského oscilující chemická reakce, spektrofotometrická detekce, stanovení kyseliny L-askorbové (41)



## 2.11 Fenylefrin

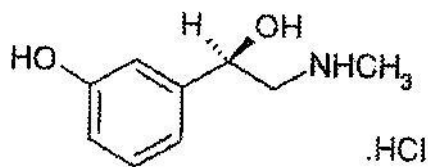
Phenylephrini hydrochloridum

$C_9H_{14}ClNO_2$

(1*R*)-1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)ethan-1-ol-hydrochlorid

$M_r = 203,67$  (29)

$pK_a = 8,9$  a  $10,1$  (30)



Vlastnosti:

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Taje při asi  $143\text{ }^{\circ}\text{C}$  (29)

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

### 2.11.1 Příklady metod stanovení fenylefrinu

- MEKC, UV detekce, BGE: 10 mM dihydrogenfosfát sodný - tetraborát sodný, 10 mM SDS, pH 9, křemenná kapilára: 67 cm x 75 $\mu\text{m}$ , současné stanovení fenylefrinu, dextromethorfanu a difenhydraminu v sirupu na kašel (45)
- MEKC, UV detekce, BGE: 5 mM fosfát – 5 mM borát, 40 mM SDS, pH 8,2, křemenná kapilára: 57cm x 75 $\mu\text{m}$ , současné stanovení fenylefrinu, sufacetamidu a acetátu prednisolonu v lokálním léčivém přípravku (46)
- CZE, UV detekce, fosfátový pufr 0,063 mol/l, pH 3,72, křemenná kapilára: 70 x 75 $\mu\text{m}$ , současné stanovení fenylefrinu, nafazolinu a difenhydraminu v nosních kapkách (47)
- HPLC, elektrochemická detekce, stanovení fenylefrinu a jeho konjugátů v lidské plazmě (48)
- HPLC, nepřímá konduktometrická detekce, stanovení fenylefrinu a dalších 7 látek v sirupech na nachlazení (49)

- HPLC, UV detekce, mobilní fáze: acetonitril-chloristan sodný, C 18 kolona (250 X 4,6 mm), stanovení paracetamolu, fenylefrinu, chlorfenylaminu a dextromethorfanu (36)
- HPTLC, mobilní fáze: ethylacetát-methanol-amoniak, stanovení fenylefrinu a lignokainu (50)

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem rigorózní práce bylo vypracovat metodu micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) pro separaci a stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu. Vypracovanou a validovanou metodu aplikovat na léčivé přípravky řady Coldrex® horký nápoj.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Chemikálie

- $\alpha$ -Cyklodextrin hydrát, p.a., Aldrich
- $\beta$ -Cyklodextrin, sulfatovaná sodná sůl, p.a., Aldrich
- Acetonitril Cromasolv® pro HPLC,  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich
- Ambroxol hydrochlorid, p.a., Fluka
- Amoniak vodný roztok 25 – 27 %, p.a., Ing. Petr Švec, PENTA
- Coldrex® Horký nápoj Citron, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GlaxoSmithKline Export Ltd., Brentford, TW8 9GS, Velká Británie
- Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GlaxoSmithKline Export Ltd., Brentford, TW8 9GS, Velká Británie
- Coldrex® Junior Citron, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, GlaxoSmithKline Export Ltd., Brentford, TW8 9GS, Velká Británie
- Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., Merck
- Dodecylsírán sodný, p.a., Sigma-Aldrich
- Ethylparaben, p.a., RNDr. Jan Kulich
- Fenylefrin hydrochlorid, p.a., Sigma-Aldrich
- Ketoprofen, p.a., Sigma-Aldrich
- Kofein,  $\geq 99,9$  %, Fluka
- Kyselina 3-nitrobenzoová, 99,0 %, Aldrich
- Kyselina askorbová,  $> 99,0$  %, Sigma
- Kyselina boritá pro elektroforézu, p.a., Sigma
- Methanol Cromasolv® pro HPLC,  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich
- Methylparaben, p.a., RNDr. Jan Kulich
- Paracetamol, 98 %, Aldrich
- Sudan III pro mikroskopii, Balex, Ing. Jaroslav Kroupa, CSc.
- TAPSO,  $\geq 99,0$  %, Sigma
- Tetraboritan sodný, dekahydrát, A.C.S. reagent, 99 %, Aldrich
- TRIS, Trisma base – tris(hydroxymethyl)-aminomethan, A.C.S. reagent,  $\geq 99,8$  %, Sigma-Aldrich

## **4.2 Roztoky**

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 Pracovní elektrolyty**

Podle požadované koncentrace bylo naváženo odpovídající množství tetraboritanu sodného, dihydrofosforečnanu draselného a SDS, vše bylo rozpuštěno na ultrazvukové lázni v 10 % methanolu. pH\* bylo upraveno na hodnotu 8,2 pomocí kyseliny borité. Roztok byl v odměrné baňce doplněn po rysku 10 % methanolem na požadovaný objem.

### **4.2.2 Optimalizace metody – roztok zkoušených látek**

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo přesně asi 50 mg paracetamolu, 50 mg kyseliny askorbové, 50 mg fenylefrinu a 50 mg methylparabenu (IS). Látky byly rozpuštěny v 50 % methanolu. Roztok byl doplněn po rysku a odplyněn 15 minut na ultrazvukové lázni.

### **4.2.3 Vnitřní standard**

Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo přesně asi 50 mg paracetamolu, 50 mg kyseliny askorbové a 50 mg fenylefrinu. Látky byly rozpuštěny v 50 % methanolu, roztok byl doplněn po rysku. Dále byly připraveny jednotlivé roztoky IS (ethylparaben, ketoprofen, kofein, ambroxol, kyselina 3-nitrobenzoová, methylparaben). Jednotlivé látky byly naváženy do 5 ml odměrných baněk, rozpuštěny v 50 % methanolu a doplněny po rysku. Koncentrace roztoků IS byla 1,0 mg/ml. Roztoky byly odplyněny 15 minut na ultrazvukové lázni. Před analýzou byly roztoky IS smíchány s roztokem zkoušených látek v poměru 1:1.

### **4.2.4 Příprava kalibračních roztoků**

Přesně asi 50 mg methylparabenu bylo naváženo do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěno v 50 % methanolu a doplněno po rysku (ZR IS). Roztok byl odplyněn 15 minut na ultrazvukové lázni.

Dále byl připraven roztok zkoušených látek. Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo přesně asi 750 mg paracetamolu, 600 mg kyseliny askorbové a 100 mg fenylefrinu. Látky byly rozpuštěny v 50 % methanolu a doplněny po rysku.(ZR ST) Roztok byl odplyněn 15 minut na ultrazvukové lázni.

Tyto dva roztoky byly ředěny do 5 ml odměrných baněk podle schématu (Tab. 1). Byla získána série roztoků s koncentrací paracetamolu od 0,375 mg/ml do 9,0 mg/ml, kyseliny askorbové od 0,3 mg/ml do 7,2 mg/ml a fenylefrinu od 0,05 mg/ml do 1,2 mg/ml. K ředění byl použit 50 % methanol. Koncentrace IS byla ve všech roztocích 0,4 mg/ml.

Tab. 1 Ředění kalibračních roztoků (ml ZR ST + 2,0 ml ZR IS ad 5 ml methanol 50 %)

ZR ST [ml]	0,125	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
c PA [mg/ml]	0,375	0,75	1,5	3,0	4,5	6,0	9,0
c AA [mg/ml]	0,3	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	7,2
c FE [mg/ml]	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2

#### 4.2.5 Příprava vzorku HVLP

##### **Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, Citron a Coldrex® Junior citron**

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo přesně množství odpovídající průměrné hmotnosti obsahu jednoho sáčku (Coldrex® Junior Citron dva sáčky), tj. 4,9803 g homogenizovaného prášku léčivého přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, resp. 5,0109 g přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron, resp. 5,9650 g přípravku Coldrex® Junior citron. Obsah baňky byl rozpuštěn v 50 % methanolu, doplněn po rysku a 15 minut odplyněn na ultrazvuku. Z tohoto roztoku byly odebrány 2 ml a převedeny do 10 ml odměrné baňky. Dále byly přidány 4 ml ZR IS o koncentraci 1 mg/ml. Roztok byl doplněn 50 % methanolem po rysku a odplyněn 15 minut na



ultrazvukové lázni. Teoretické výsledné koncentrace analytů byly pro Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz a Coldrex® Horký nápoj Citron: PA 6 mg/ml, AA 0,48 mg/ml a FE 0,08 mg/ml a pro Coldrex® Junior: PA 4,8 mg/ml, AA 0,32 mg/ml, a FE 0,08 mg/ml. Koncentrace IS byla 0,4 mg/ml.

Vzorky byly před měřením filtrovány přímo do vialky přes membránový filtr.

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

A. Byly nově připraveny vzorky HVLP- *Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, Citron a Coldrex® Junior citron-* podle postupu 4.2.5. Každý vzorek byl připraven na 3 navážky a roztoky byly změřeny. Současně byl změřen nově připravený srovnávací roztok standardů o koncentracích PA 6,0 mg/ml; AA 0,6 mg/ml a FE 0,1 mg/ml a proveden výpočet nalezené koncentrace analytů v roztocích vzorků farmaceutických přípravků - c(HVLP) .

B. Opět byly připraveny na 3 navážky roztoky všech tří HVLP podle postupu 4.2.5, ale po přidání IS před finálním doplněním 50% methanolem po rysku v 5 ml odměrné baňce bylo přidáno definované množství standardů PA, AA a FE. U přípravků Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz a Coldrex® Horký nápoj Citron byly vloženy koncentrace PA 1,5 mg/ml, AA 0,6 mg/ml a FE 0,1 mg/ml; u HVLP Coldrex® Junior citron- PA 3,0 mg/ml, AA 0,3 mg/ml, a FE 0,1 mg/ml-c(přídavek). Po změření roztoků a porovnáním se srovnávacím roztokem standardů (bod A) byl proveden výpočet nalezené koncentrace vzorků s přídavkem standardů analytů v měřených roztocích – c(HVLP+přídavek).

C. Výpočet správnosti byl proveden podle vzorce:

$$R(\%) = \frac{c(\text{HVLP} + \text{přídavek}) - c(\text{HVLP})}{c(\text{přídavek})} \times 100$$

#### **4.3 Přístroje**

Při práci byly použity 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 nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 µm 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 byl uveden do chodu počítač a elektroforetický systém. Před vlastním měřením byla kapilára každý den proplachována 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 byla kapilára proplachována ještě před každou analýzou 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 byla kapilára opět proplachována po 10 minutách 1,0 M hydroxidem sodným, 0,1 M hydroxidem sodným a vodou. Promývání probíhalo vždy pod tlakem 1379 mBar.

V programu byly nastaveny 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 byl před analýzou odplyněn 15 minut na ultrazvukové lázni.

#### 4.4.1.1 Měření kalibrační závislosti

Každý kalibrační roztok byl změřen 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 Reprodukovatelnost

Pro zjištění reprodukovatelnosti byl použit roztok o koncentraci PA 3 mg/ml, AA 2,4 mg/ml, FE 0,4 mg/ml. Obsah methylparabenu (IS) byl 0,4 mg/ml. Bylo provedeno šest měření. Hodnoty průměru, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky byly vypočítány 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  $s$ :

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

Relativní směrodatná odchylka  $S_r$ :

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

#### 4.4.3 Rozlišení

Rozlišení  $R_s$  mezi píky lze spočítat podle obecného vzorce: (2)

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

$t_1, t_2$  - 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: (2)

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

$t_m$  - migrační čas [s]

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

$w$  - šířka píku při základní linii

Výškový ekvivalent teoretického patra se počítá podle vztahu: (2)

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

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

#### 4.4.5 Správnost

Správností metody se rozumí co největší shoda výsledků měření s absolutní správnou hodnotou. Správnost metody byla ověřena analýzou vzorku s přidavkem standardních látek.

Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery)  $R$  (51) v %.

$$R (\%) = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložená}} \times 100$$

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 5.1 Vývoj a optimalizace metody pro separaci a současné stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu

Studovaná léčiva mají rozdílné acidobazické vlastnosti – viz.  $pK_a$  v Teoretické části. Paracetamol je velmi slabě kyselá látka a pro její migraci by bylo potřebné vysoké pH při zvolení CZE metody. Kyselina askorbová je slabší kyselina a v silně alkalickém prostředí se oxiduje. Fenylefrin je slabá base a jako léčivo je ve formě hydrochloridu, navíc má ve své molekule slabě kyselou skupinu Ar-OH. Z těchto důvodů se dalo předpokládat, že z elektroforetických metod bude vhodná pro analýzu uvedených léčiv micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).

Je zřejmé, že optimalizace separace je komplexní proces, ve kterém hrají důležitou roli separační parametry. Je třeba optimalizovat instrumentální parametry a také parametry, které charakterizují roztok elektrolytu, ve kterém probíhá elektromigrace. Mezi základní parametry instrumentální patří volba separačního napětí, teploty a také rozměry kapiláry, jako je délka a vnitřní průměr. Mezi základní parametry separačního tlumivého roztoku patří typ tlumivého roztoku a jeho koncentrace, hodnota pH BGE, v případě MEKC typ a koncentrace smáčedla a dále druh a koncentrace modifikátorů, jako jsou třeba organická rozpouštědla a další selektory, jako např. cyklodextriny. Většina těchto parametrů byla v předložené práci testována.

Byla použita křemenná kapilára s rozměry: 31,2 cm x 50  $\mu$ m, efektivní délka 21 cm.

Rozměry kapiláry ovlivňují čas analýzy a účinnost separace.

### 5.1.1 Detekce – volba vlnové délky

Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter je vybaven UV (DAD) detektorem. Pro stanovení optimální vlnové byla nejprve změřena spektra látek v borátovém pufru s 20 % methanolu od 190 nm do 300 nm. UV spektra PA a AA vykazují dvě maxima, jedno v okolí 200 nm (206, 196 nm), druhé u PA a AA 248 nm. FE vyazuje tři maxima, při 204, 217 a 276 nm. Pro detekci všech analytů byla zvolena vlnová délka 190 nm, pro paracetamol a kyselinu askorbovou ještě kompromisní vlnová délka 265 nm (FE neabsorbuje).

### 5.1.2 Testování druhu BGE

Cílem bylo najít takové složení pracovního elektrolytu a podmínky separace, při nichž by došlo k úplné separaci jednotlivých složek tak, aby mohly být stanoveny. Vhodný separační pufr má přiměřenou tlumivou kapacitu ve vybrané oblasti pH a nízkou elektrickou vodivost, aby nebyl příliš vysoký procházející elektrický proud. V optimálním případě se pohyblivost iontu tlumivého roztoku přibližuje pohyblivosti analytu.

Byly zkoušeny tyto elektrolytové systémy:

- 200 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, pH\* 8 (upraveno 50 mM tetraboritanem sodným), 10 % methanol
- 40 mM kyselina boritá, 70 mM SDS, pH\* 7,6 (upraveno 0,1 M roztokem amoniaku), 10 % methanol
- 20 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 40 mM SDS, pH\* 7,6 (upraveno 0,1 M NaOH); 10 % methanol
- 20 mM TAPSO, 30 mM SDS, pH\* 8 (upraveno pomocí TRIS), 10 % methanol
- 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 40 mM SDS, pH\* 8,2 (přirozené); 10 % methanol

Zkoušené látky většinou migrovaly v pořadí paracetamol, kyselina askorbová, fenylefrin.

Při použití pufru obsahujícího kyselinu boritou a SDS docházelo k separaci všech analytů, fenylefrin však nebyl oddělen až na základní linii a pík nebyl symetrický.

U fosfátového pufru docházelo k velmi špatné separaci kyseliny askorbové a fenylefrinu. Při kombinaci kyseliny borité s tetraboritanem sodným došlo k oddělení všech složek směsi. Také kombinace borátového a fosfátového pufru byla úspěšná. Při použití TAPSO a TRIS organického pufru byla separace velmi špatná. Pro další práci se tedy rozhodovalo mezi elektrolytovým systémem kyselina boritá/tetraboritan a fosfát/borát. Vzhledem k vysokým koncentracím kyseliny borité a tetraboritanu byl zvolen fosfátový-borátový pufr.

V další práci byly zkoušeny různé koncentrace tetaboritanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného, dodecylsíranu sodného a methanolu, byl zjišťován vliv pH pracovního elektrolytu, druh vnitřního standardu, teploty a vloženého napětí na kvalitu separace. Kromě kvality separace byla hodnocena i citlivost analýzy a její

trvání. Identifikace píků byla provedena pomocí přídavek standardů ***Testování druhu vnitřního standardu***

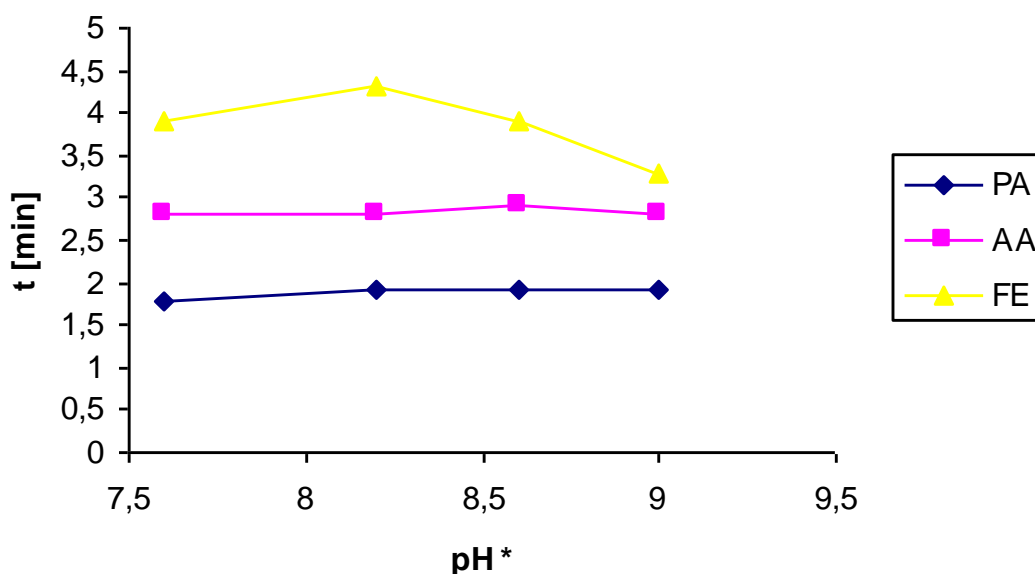
Jako vnitřní standard byl zkoušen ketoprofen, kofein, ambroxol, ethylparaben a kyselina 3-nitrobenzoová. Nejprve byl vybrán ketoprofen. Důvodem bylo zejména vhodné rozlišení, citlivost a také tvar a symetrie píku. Ostatní zkoušené látky nevyhovovaly migračním časem, citlivostí, rozlišením nebo tvarem píku. Při aplikaci již vyvinuté metody na HVLP se ale ukázalo, že zvolený IS ketoprofen migruje v čase nečistoty. Z tohoto důvodu byl jako IS dále vyzkoušen methylparaben. Vykazoval také dobré rozlišení, citlivost, tvar a symetrii píku a proto byl dodatečně zvolen.

#### ***5.1.4 Vliv pH BGE***

Při neutrálním a zásaditém pH tlumivého roztoku používaného v MEKC, dochází k různým interakcím látek s micelami. Podle velikosti interakce se mění migrační rychlost analytů. V případě neutrálních látek je migrační rychlost dána rozdělovacím koeficientem látky mezi micelami a tlumivým roztokem, zatímco u elektricky nabitých analytů závisí jak na rozdělovacím koeficientu, tak na jejich elektroforetické pohyblivosti v roztoku neobsahujícím micely. pH tlumivého roztoku také ovlivňuje velikost EOF v nepokryté kapiláře, zvýšení pH elektrolytu obecně zvyšuje EOF a tím zkracuje dobu analýzy.

Optimalizace hodnoty pH probíhala v elektrolytovém systému, který obsahoval 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 40 mM SDS a 10 % methanol. pH\* bylo upravováno amoniakem nebo kyselinou boritou na hodnoty 7,6; 8,2; 8,6 a 9. K nejlepší separaci došlo při pH\* 8,2. Při pH\* 7,6 nebyl oddělen paracetamol až na základní linii, při vyšších hodnotách pH\* se zhoršovala separace kyseliny askorbové a fenylefrinu.

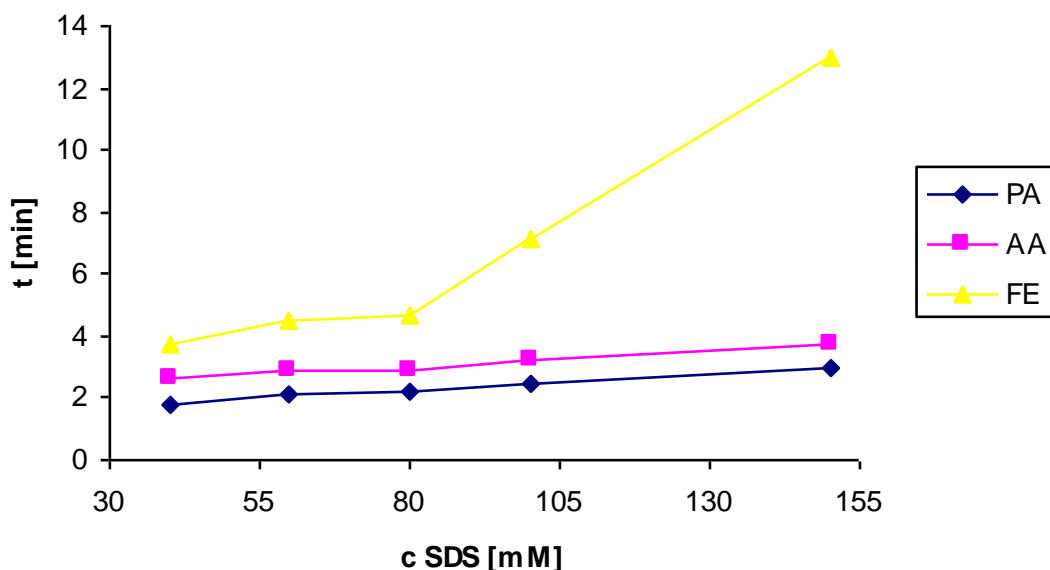




Obr. 8 Vliv pH\* na migrační čas analytů, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 40 mM SDS, 10 % methanol

### 5.1.5 Vliv koncentrace tenzidu

Typ tenzidu ovlivňuje rozlišení, protože je spoluodpovědný za selektivitu separace. Při zjišťování vlivu koncentrace SDS na analýzu byl použit elektrolytový systém obsahující SDS v koncentraci 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM a 150 mM. Elektrolytový systém obsahoval 5 mM tetraboritanu sodného, 5 mM dihydrogenfosforečnanu draselného, 10 % methanolu, pH\* bylo 8,2. Při koncentraci 20 mM bylo velmi špatné rozlišení a symetrie píků paracetamolu a kyseliny askorbové, fenylefrin na záznamu vůbec nebyl patrný. Při koncentracích 40 mM, 60 mM a 80 mM došlo k separaci všech analytů v krátkém čase, ale byl zhoršen tvar a symetrie píků. Se zvyšující se koncentrací SDS se sice prodlužovala doba analýzy, ale zlepšovalo se rozlišení, tvar a symetrie píků. Pro další měření byla vybrána koncentrace SDS 150 mM.



Obr. 9 Závislost migračních časů na koncentraci SDS, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 10 % methanol, pH\* 8,2

### 5.1.6 Vliv koncentrace BGE

Byl zjišťován vliv koncentrací tetraboritanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného v pracovním elektrolytu na délku a citlivost analýzy a kvalitu separace. Byly použity elektrolytové systémy o koncentracích tetraboritan sodný – dihydrofosforečnan draselný 5 mM – 5 mM, 10 mM – 10 mM a 40 mM – 40 mM. Elektrolytový systém obsahoval 150 mM SDS, 10% methanol a pH\* bylo 8,2. Se zvyšujícími se koncentracemi se doba analýzy prodlužovala a separace se výrazně zhoršovala. Při koncentraci 40 mM nebyly jednotlivé analyty vzájemně rozeznatelné. Pro další práci byla zvolena koncentrace tetraboritan sodný – dihydrogenfosforečnan draselný 5 mM – 5 mM.

Tab. 2 Vliv koncentrace tetraboritanu sodného a dihydrofosforečnanu draselného na migrační čas analytů, BGE: 150 mM SDS, 10% methanol, pH\* 8,2

Analyt	PA	AA	FE
$t_m$ [min] při c F-B 5 mM-5 mM	3,032	3,714	12,997
$t_m$ [min] při c F-B 10 mM-10 mM	4,893	15,115	26,046

### 5.1.7 Vliv koncentrace methanolu

Pro zlepšení MEKC separace hydrofobních látek se osvědčil přídavek organického rozpouštědla do BGE. Obvykle se snižuje migrační čas analytů a selektivita separace

Při zjišťování vlivu přídavku methanolu byl použit elektrolytový systém obsahující 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný a 150 mM SDS o pH\* 8,2. Byl zkoušen 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 byl zvolen systém s 10 % methanolu.

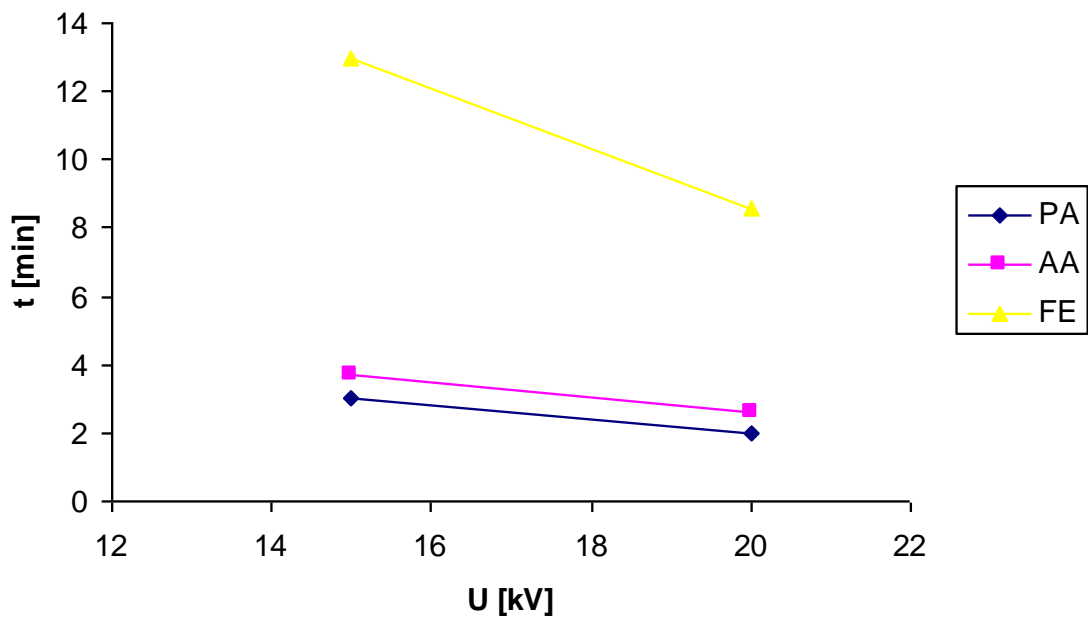
Tab. 3 Vliv koncentrace methanolu na migrační čas analytů, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 150 mM SDS, pH\* 8,2

Analyt	PA	AA	FE
$t_m$ [min] při 10 % MeOH	2,574	3,132	7,016
$t_m$ [min] při 20 % MeOH	3,526	5,387	13,229

Až dosud byly všechny pokusy při optimalizaci elektrolytového systému prováděny při  $U = 15$  kV. Proto byl dále sledován vliv napětí na separaci.

### 5.1.8 Vliv napětí

Vliv napětí byl prováděn v elektrolytovém systému, který obsahoval 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* elektrolytu bylo 8,2. Analýza byla prováděna s 15 kV a 20 kV. Čas separace je nepřímo úměrný vloženému napětí a tak dle očekávání se doba analýzy s rostoucím napětím zkrátila. Dalším zvyšováním napětí se nedosáhlo kvalitnější separace, pravděpodobně pro větší tvorbu tepla s následky tvorby gradientů teploty a viskozity v kapiláře, což je jev pozorovatelný zejména u MEKC. Roztoky pufrů jsou v důsledku přítomnosti micel vysoce vodivé. Nedostatečný odvod tepla pak způsobuje rozšíření zón analytů v kapiláře.



Obr. 10 Vliv napětí na migrační čas analytů, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2

### 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. Byly zkoušeny teploty 20 a 25 °C. Při 25°C se zhoršila se kvalita separace. Proto byla pro další práci zvolena teplota 20 °C.

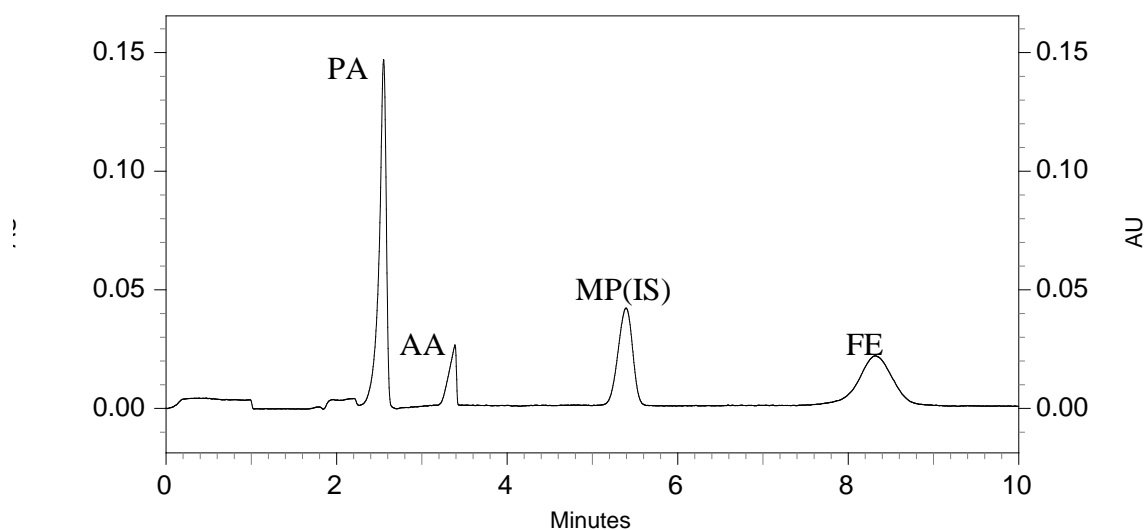
### 5.1.10 *Separační tlumivý roztok a instrumentální parametry*

Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření jsou shrnuty v Tab. 4.

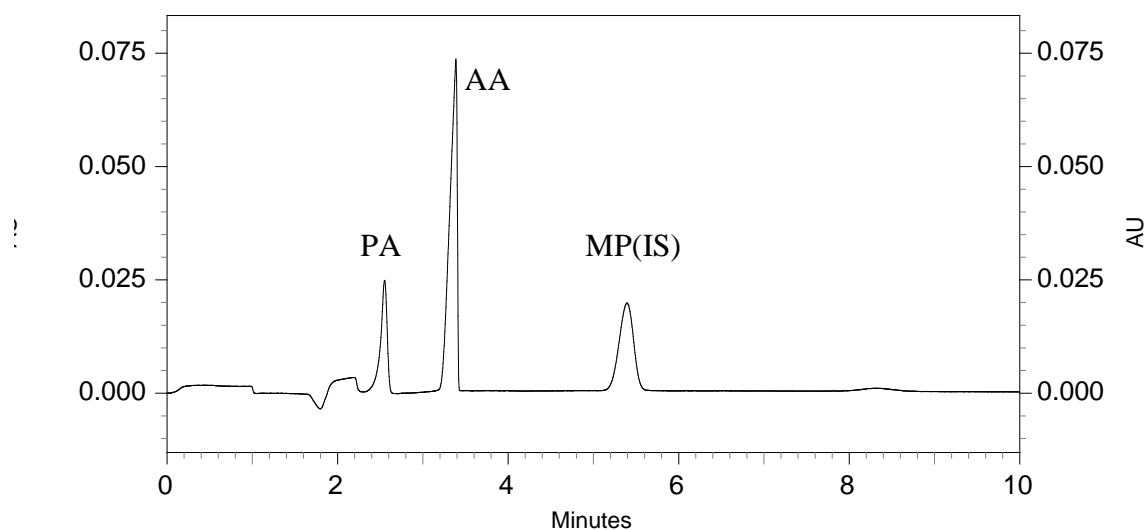
Tab. 4 Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

Rozpouštědlo	10 % methanol
Složky pufru, c	Tetraboritan sodný, 5 mM Dihydrogenfosforečnan draselný, 5 mM
Surfaktant, c	SDS, 150 mM
pH*	8,2
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. 11 a 12. Roztok standardů byl připraven v poměru, v jakém jsou obsaženy v HVLP, jen obsah PA je 10 x nižší.



Obr. 11 Elektroforeogram standardů, PA 1,5 mg/ml, AA 1,2 mg/ml, FE 0,2 mg/ml, MP (IS) 0,4 mg/ml. BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm



Obr. 12 Elektroforeogram standardů, PA 1,5 mg/ml, AA 1,2 mg/ml, FE 0,2 mg/ml, MP (IS) 0,4 mg/ml. BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 265 \text{ nm}$

### 5.1.11 Způsobilost systému

#### 5.1.11.1 Rozlišení

Pro výpočet rozlišení byl použit vzorec, uvedený na str. 49. Výsledky výpočtu jsou uvedeny v Tab. 5. Rozlišení je pro všechny analyzované sloučeniny dostatečné a píky jsou rozděleny na základní linii. Podle ČSL 2009 v kapitole „Chromatografické separační metody, separační data“, rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

Tab. 5 Rozlišení mezi jednotlivými píky

Dvojice analytů	Rozlišení $R_s$
paracetamol – kyselina askorbová	2,43
kyselina askorbová - methylparaben	4,84
methylparaben - fenylefrin	3,01

### 5.1.11.2 Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje pomocí počtu dosažených teoretických pater  $N$ , případně ekvivalentem teoretického patra  $H$ . Výpočty byly provedeny pomocí vzorců na str. 50. Hodnoty počtu teoretických pater a hodnoty  $H$  jsou uvedeny v Tab. 6.

**Tab. 6** Parametry charakterizující účinnost elektroforetické separace

Analyt	$N$	$H$ [ $\mu\text{m}$ ]
Paracetamol	618,9	504,12 (339,12)
Kyselina askorbová	2 342,6	133,19 (89,64)
Fenylefrin	572,8	544,69 (366,62)

Hodnoty počtu teoretických pater se pohybují od 572,8 (fenylefrin) až do 2 342,6 (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 byla proměřena za použití optimálního pracovního elektrolytu. Jako kvantitativní parametr byl použit poměr plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu. Velikosti ploch píků byla získána ze záznamu automaticky vyhodnoceného počítačovým programem. Pro každou koncentraci byla provedena tři měření. Kalibrační závislost byla zpracována metodou lineární regrese.

Obecný tvar rovnice přímky:

$$y = kx + q$$

*x* – koncentrace látky (v mg/ml)

*y* – plocha píku analytu / plocha píku vnitřního standardu

*k* – směrnice přímky

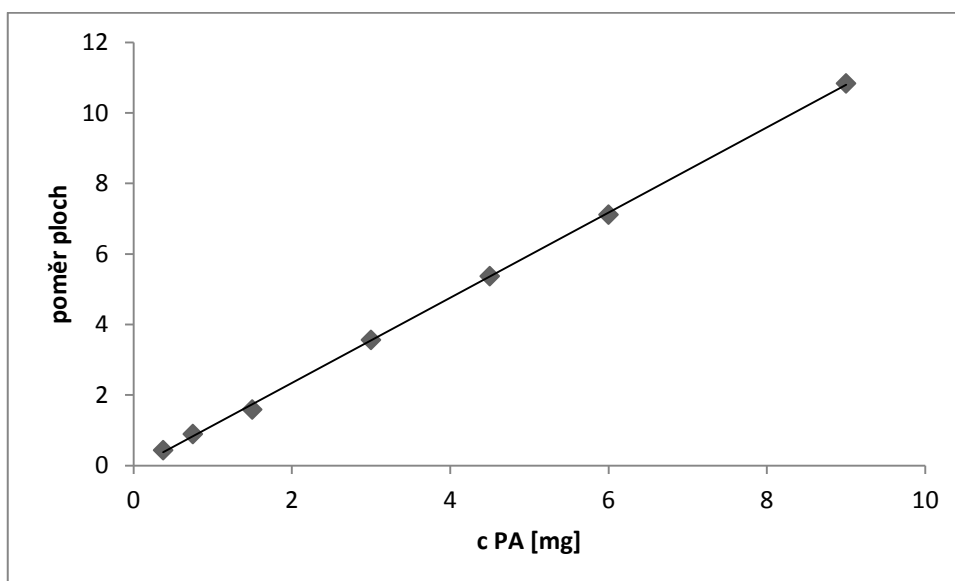
*q* – absolutní člen



### 5.2.1 Kalibrační závislost pro paracetamol

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,375 mg/ml; 0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 3,0 mg/ml; 4,5 mg/ml; 6,0 mg/ml; 9,0 mg/ml.

- Počet bodů: 7
- Počet stupňů volnosti: 5
- Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:
- $k = 1,2083 \pm 0,0108$
- $q = -0,0782 \pm 0,0498$
- Koeficient korelace: 0,9998
- Reziduální odchylka: 0,0828
- Hodnota F-statistiky:  $12,56 \cdot 10^3$
- Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9 %.



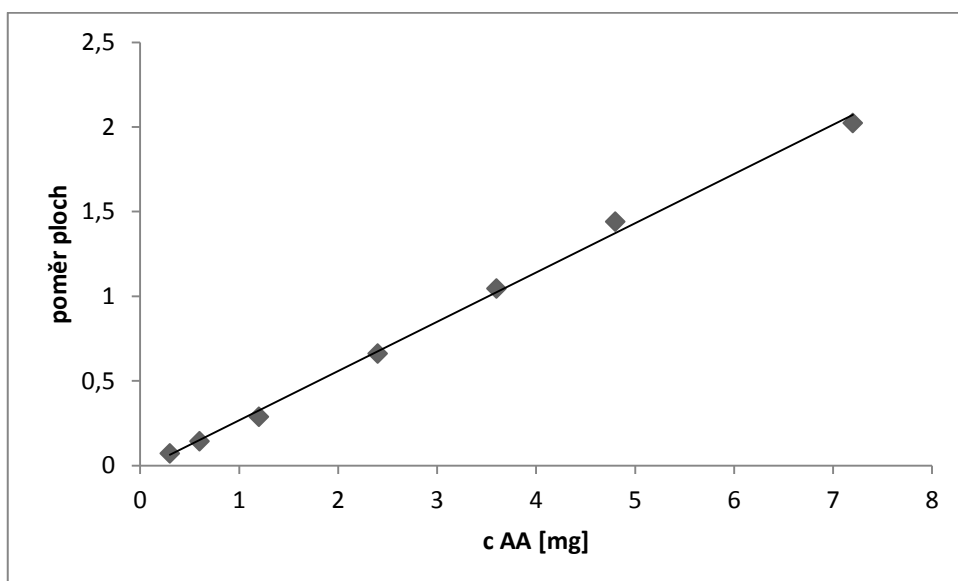
Obr. 13 Kalibrační závislost pro paracetamol; BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2

V sledovaném rozmezí koncentrací paracetamolu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9998).

### 5.2.2 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,3 mg/ml; 0,6 mg/ml; 1,2 mg/ml; 2,4 mg/ml; 3,6 mg/ml; 4,8 mg/ml; 7,2 mg/ml.

- Počet bodů: 7
- Počet stupňů volnosti: 5
- Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:
  - $k = 0,2911 \pm 0,0069$
  - $q = -0,0248 \pm 0,0256$
- Koeficient korelace: 0,9986
- Reziduální odchylka: 0,0426
- Hodnota F-statistiky:  $1,77 \cdot 10^3$
- Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9 %.



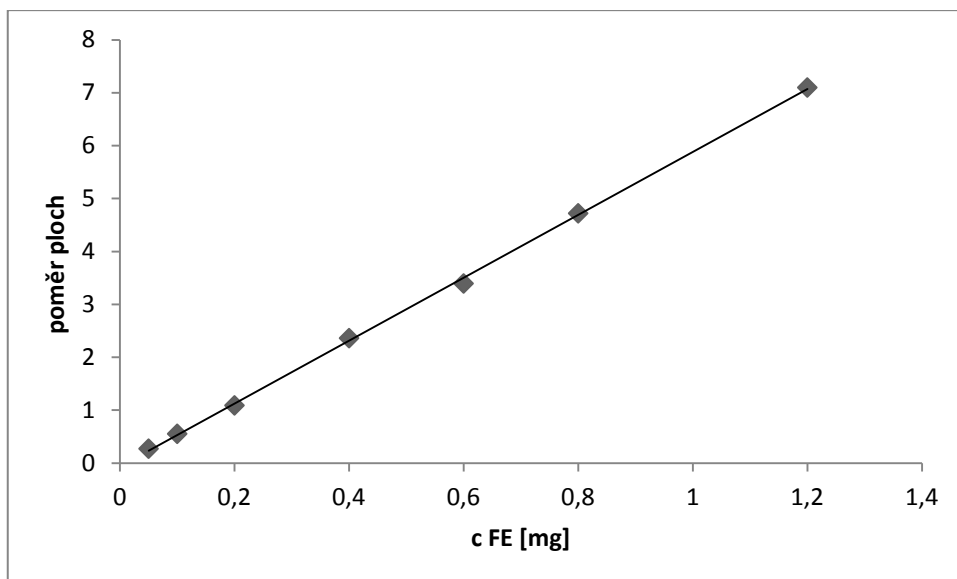
Obr. 14 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou; BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2

V sledovaném rozmezí koncentrací kyseliny askorbové je závislost lineární (korelační koeficient 0,9986).

### 5.2.3 Kalibrační závislost pro fenylefrin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; 1,2 mg/ml.

- Počet bodů: 7
- Počet stupňů volnosti: 5
- Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:
- $k = 5,9432 \pm 0,06$
- $q = -0,0612 \pm 0,0369$
- Koeficient korelace: 0,9997
- Reziduální odchylka: 0,0614
- Hodnota F-statistiky:  $9,82 \cdot 10^3$
- Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9 %.



Obr. 15 Kalibrační závislost pro fenylefrin; BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2

V sledovaném rozmezí koncentrací fenylefrinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9997)

### 5.3 Reprodukovatelnost metody

Pro ověření reprodukovatelnosti poměrů ploch píků a migračních časů bylo provedeno šest měření pro danou koncentraci. Směrodatná odchylka byla vypočítána podle vztahů na str. 49.

Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 7 a Tab. 8.

**Tab. 7 Reprodukovatelnost 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	3,0	3,4896	0,0769	2,20
AA	2,4	0,6660	0,0211	3,16
FE	0,4	2,3198	0,0578	2,49

Relativní směrodatná odchylka velikosti poměru plochy píku analytu k ploše píku vnitřního standardu se pohybuje v rozmezí 2,20 – 3,16 %. Největší hodnota byla zjištěna pro kyselinu askorbovou.

**Tab. 8 Reprodukovatelnost migračních časů (n=6)**

Analyt	c [mg/ml]	t <sub>m</sub> [min]	s	s <sub>r</sub> [%]
PA	3,0	2,5362	0,0247	0,97
AA	2,4	3,3267	0,0278	0,84
FE	0,4	8,1700	0,0724	0,89

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybuje v rozmezí 0,84 – 0,97 % a prakticky u všech analytů je téměř shodná a velmi dobrá.

## 5.4 Stanovení účinných látek ve farmaceutických přípravcích

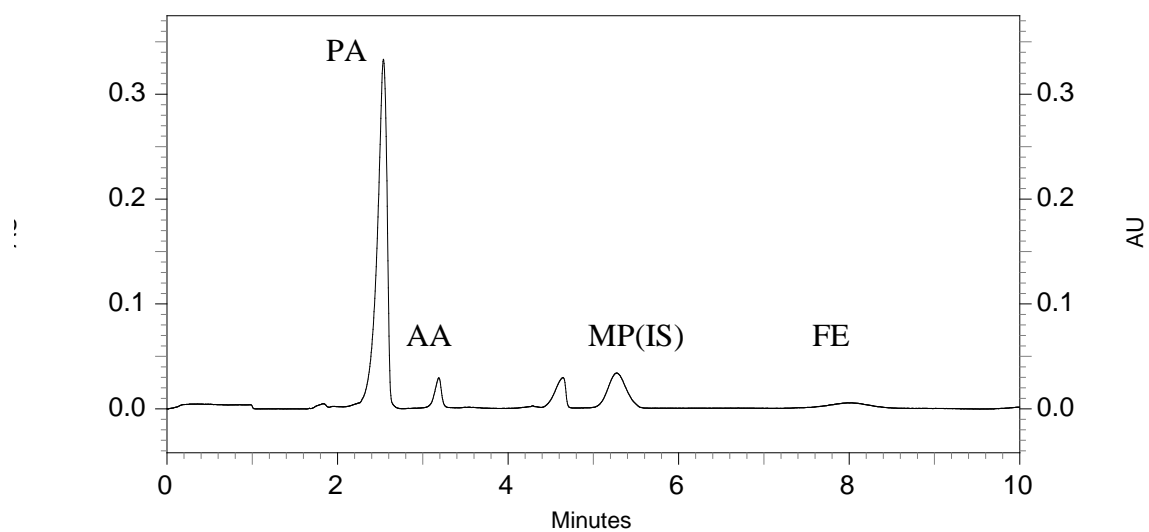
Vypracovaná metoda byla použita pro analýzu léčivého přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, Coldrex® Horký nápoj Citron a Coldrex® Junior Citron metodou vnitřního standardu.

Léčivé přípravky Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz a Coldrex® Horký nápoj Citron obsahují paracetamol 750 mg, kyselinu askorbovou 60 mg a fenylefrin 10 mg v jednom sáčku. Léčivý přípravek Coldrex® Junior Citron obsahuje 300 mg paracetamolu, 20 mg kyseliny askorbové a 5 mg fenylefrinu v jednom sáčku. V obou přípravcích je řádově více PA ve srovnání s ostatními účinnými látkami, poměr PA : AA : FE = 75 : 6 : 1, resp. 60 : 4 : 1. Jelikož rozlišení mezi PA a AA je dostatečné, není tato okolnost na závadu při stanovení obsahu léčiv v přípravcích Coldrex®. Jako srovnávací roztok pro výpočet obsahu analytů v přípravcích byl připraven paralelně roztok č. 3 z kalibrační závislosti.

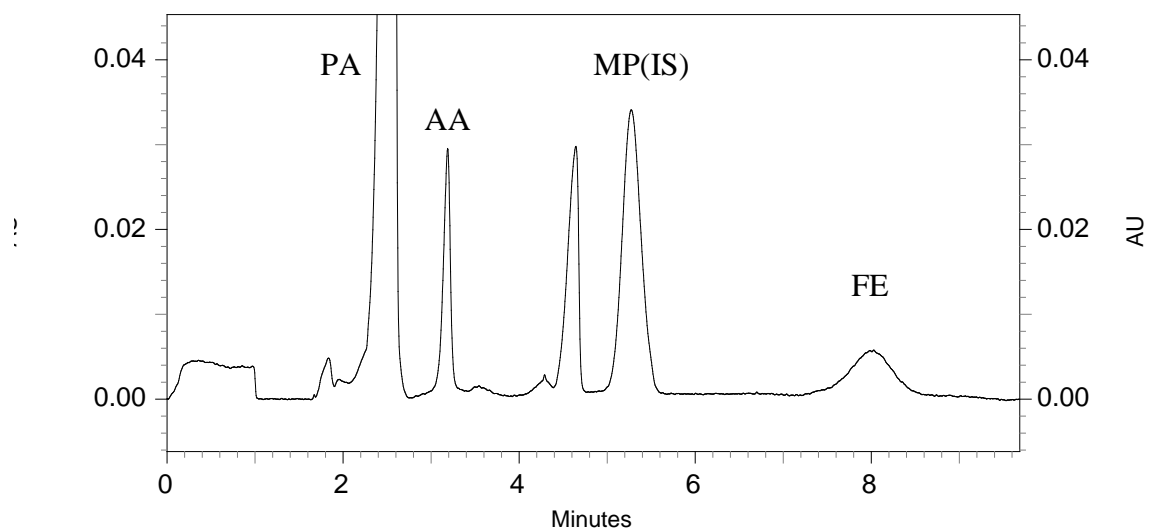
Při 190 nm absorbují všechny analyty, citlivost stoupá v řadě AA – PA – FE. Při 265 nm ve srovnání se 190 nm citlivost stoupá opačně FE – PA – AA, FE téměř neabsorbuje.

PA, AA a FE byly analyzovány při vlnové délce 190 nm. Stanovení obsahu PA a AA bylo provedeno ještě při vlnové délce 265 nm. PA absorbuje sice méně než při  $\lambda = 190$ , ale v léčivém přípravku je jeho obsah řádově vyšší než obsah AA a FE. Detekce při 265 nm je výhodná pro AA, která při této délce vykazuje vyšší citlivost než při 190 nm.

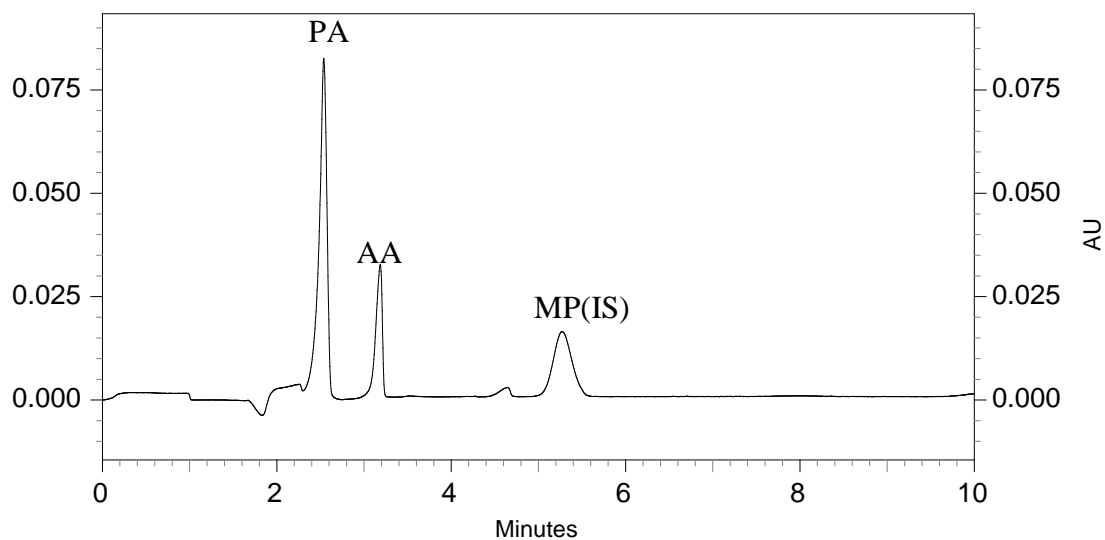
Elektroforeogramy jsou zachyceny na Obr. 16 – Obr. 24.



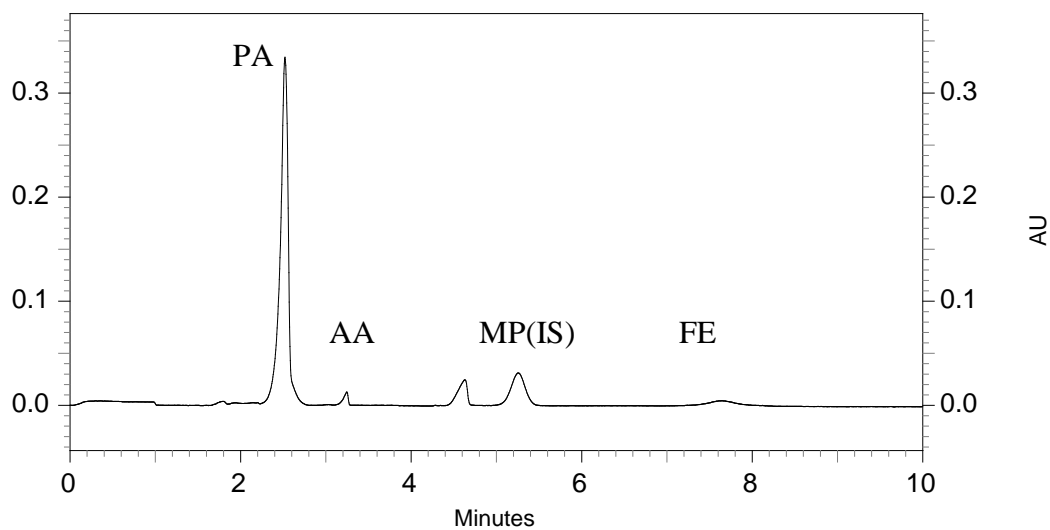
Obr. 16 Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm



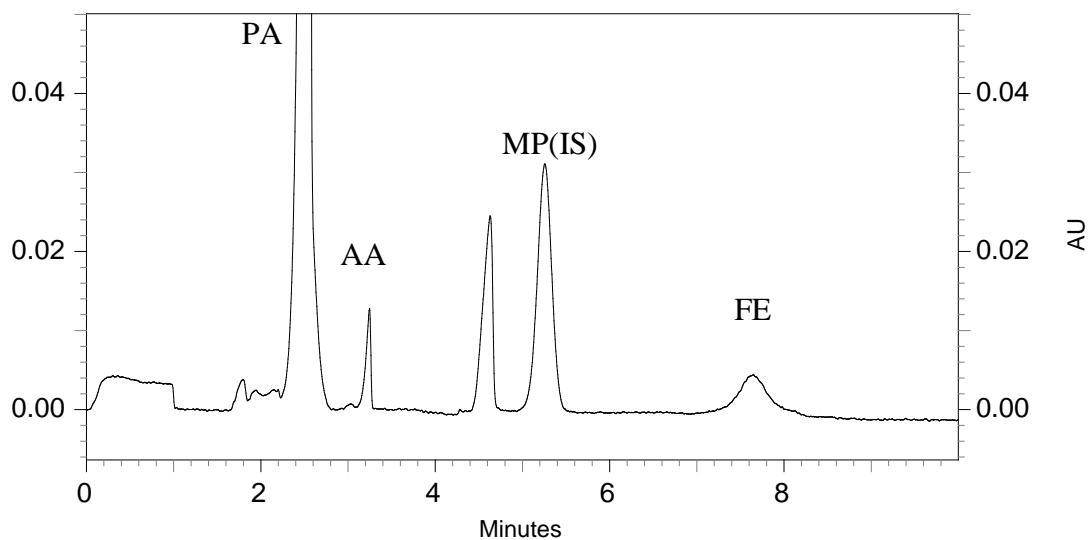
Obr. 17 Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm (zvětšeno)



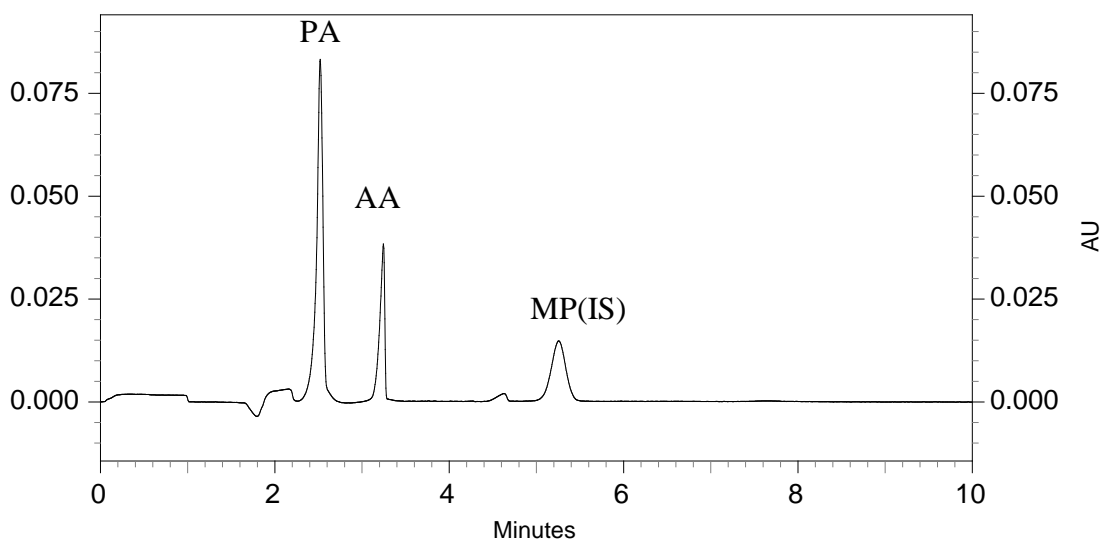
Obr. 18 Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm



Obr. 19 Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm

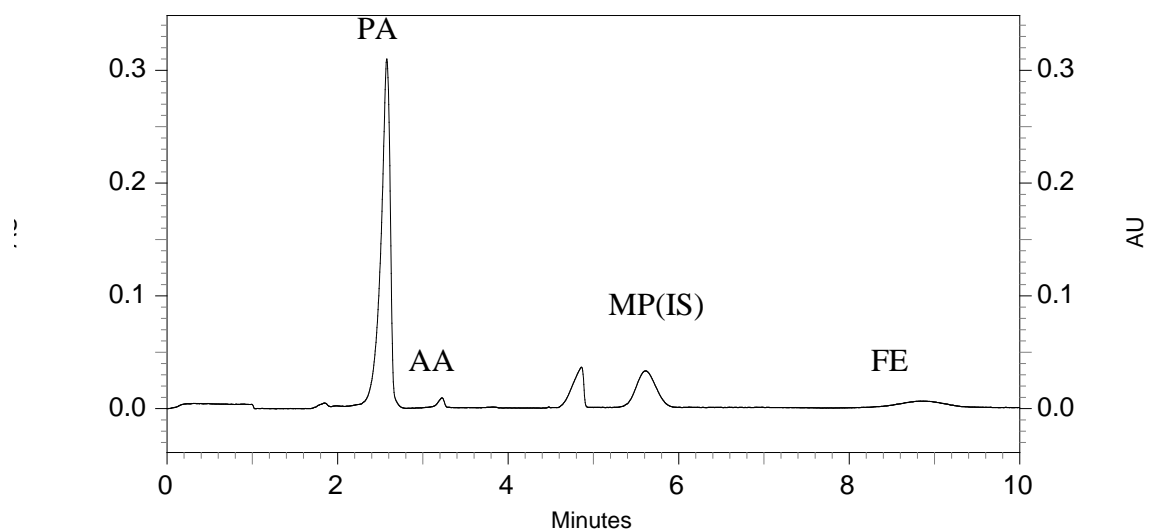


**Obr. 20** Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm (zvětšeno)

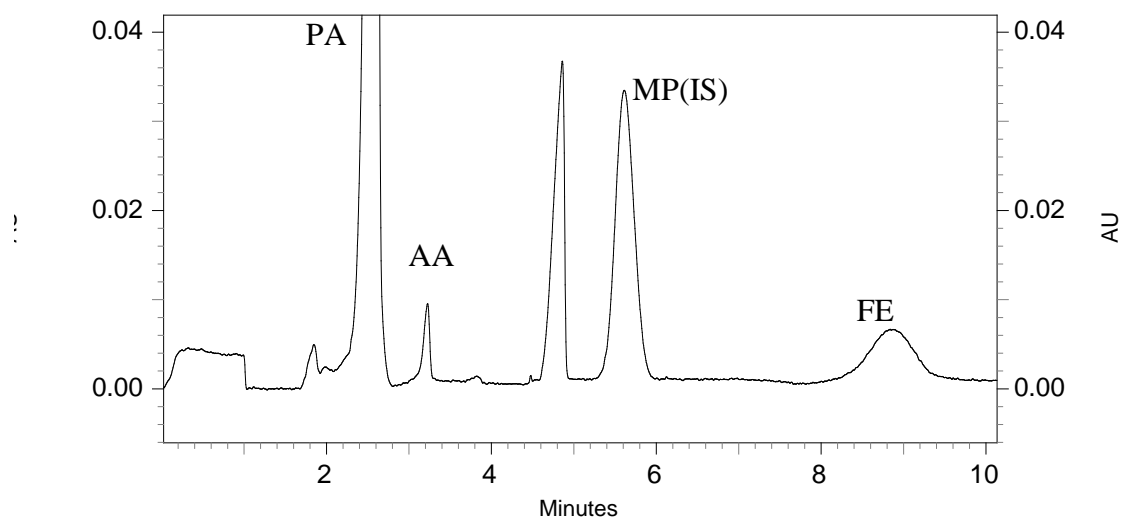


**Obr. 21** Elektroforeogram přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm

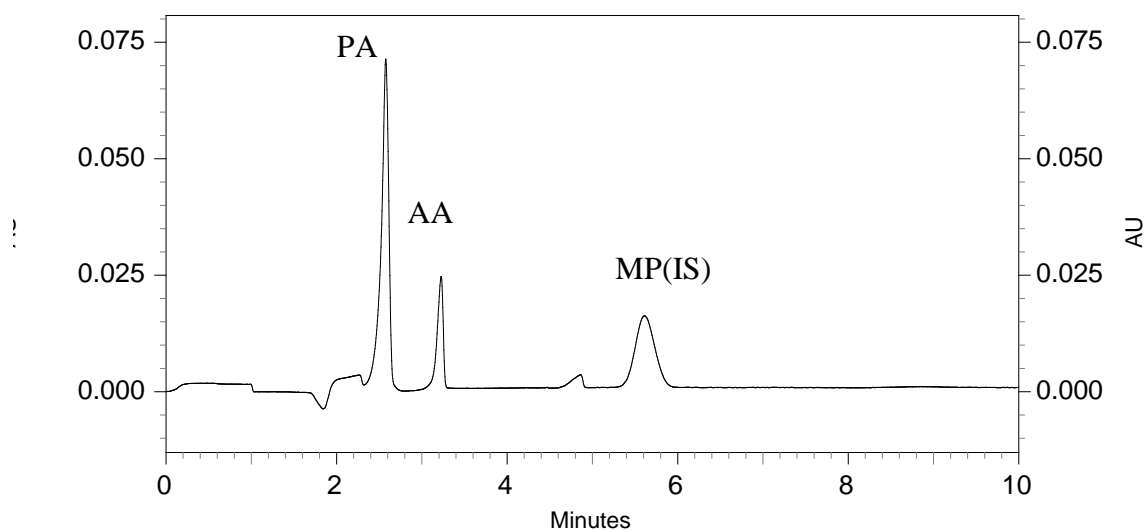




**Obr. 22** Elektroforeogram přípravku Coldrex® Junior Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm



**Obr. 23** Elektroforeogram přípravku Coldrex® Junior Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 190$  nm (zvětšeno)



**Obr. 24** Elektroforeogram přípravku Coldrex® Junior Citron, BGE: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný, 150 mM SDS, 10 % methanol, pH\* 8,2; teplota 20 °C,  $\lambda = 265$  nm

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

Měření HVLP bylo provedeno pro jednu navážku po šesti měřeních, pro navážku standardů tři měření. Všechny látky byly stanoveny při 190 nm, PA i AA lze stanovit také při 265 nm. Pro stanovení AA při 265 nm je analýza citlivější a přesnější.

Množství stanovovaných látek bylo vypočítáno podle vzorce:

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

*m* – obsah látky v sáčku [mg]

*c<sub>st</sub>* – koncentrace standardu [mg/ml]

*P<sub>vz</sub>* – poměr plochy píky analytu k ploše píky vnitřního standardu ve vzorku HVLP

*P<sub>st</sub>* – poměr plochy píky analytu k ploše píky vnitřního standardu ve vzorku standardů

*m<sub>p</sub>* – průměrná hmotnost jednoho sáčku [g]

*V* – objem měřeného roztoku vzorku [ml]; (*V*=10ml)

*n* – navážka prášku HVLP [g]

*Z* – zředění (*Z* = 12,5)

Zjištěné obsahy účinných látek se pohybovaly v rozmezí 92 % - 98 %, což koresponduje s obsahy deklarovanými výrobcem v SPC. Ve všech případech bylo u AA a PA zjištěna příznivější přesnost u stanovení při  $\lambda = 265$  nm.

Výsledky analýzy HVLP jsou uvedeny v Tab. 9 až Tab. 14.

**Tab. 9 Analýza přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz metodou MEKC při 190 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	$s_r$ [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	718,6	2,47	750
AA	55,2	2,94	60
FE	9,5	2,77	10

**Tab. 10 Analýza přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz metodou MEKC při 265 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	$s_r$ [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	726,7	1,08	750
AA	58,6	1,49	60

**Tab. 11 Analýza přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron metodou MEKC při 190 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	$s_r$ [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	720,2	2,12	750
AA	56,3	2,83	60
FE	9,6	2,73	10

**Tab. 12 Analýza přípravku Coldrex® Horký nápoj Citron metodou MEKC při 265 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	s <sub>r</sub> [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	731,2	1,36	750
AA	58,8	1,11	60

**Tab. 13 Analýza přípravku Coldrex® Junior Citron metodou MEKC při 190 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	s <sub>r</sub> [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	287,6	2,32	300
AA	19,1	2,48	20
FE	4,8	3,26	5

**Tab. 14 Analýza přípravku Coldrex® Junior Citron metodou MEKC při 265 nm (n=3)**

Analyt	Obsah [mg/sáček] MEKC	s <sub>r</sub> [%]	Deklarovaný obsah [mg/sáček]
PA	290,7	1,29	300
AA	19,2	1,91	20

## 5.5 Testování správnosti metody

Správnost metody byla ověřena metodou analýzy modelového vzorku s přidavkem standardních látek, protože nebylo k dispozici placebo ani jiná validovaná metoda pro stanovení studovaných účinných látek v daných farmaceutických přípravcích. Správnost byla hodnocena pro vlnovou délku 190 nm, kdy byly stanoveny všechny účinné látky i při 265 nm pro stanovení PA a AA.

Co se týče množství přidané standardní látky, je možné zaznamenat z různých postupů přidavek 10% nebo 50% až 120% obsahu stanovované látky, SÚKL požaduje přidavek menší než 100%, aby se výsledek nedostal mimo kalibrační závislost a to u jedné koncentrační hladiny opakovaně 6 x.

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15 až Tab. 17.

**Tab. 15 Recovery zjištěné metodou přidavku standardů k LP Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz při 190 nm**

Analyt	Vloženo [mg/ml]	Nalezeno [mg/ml]	Recovery [%]	$s_r$ [%]; n=6
PA	1,5	1,464 (1,428)*	97,6 (95,2)*	2,86 (2,40)*
AA	0,6	0,551 (0,581)*	91,9 (96,8)*	3,05 (1,98)*
FE	0,1	0,104	104,0	2,70

\* údaje v závorce pro PA a AA jsou pro  $\lambda = 265$  nm

**Tab. 16 Recovery zjištěné metodou přidavku standardů k LP Coldrex® Horký nápoj Citron při 190 nm**

Analyt	Vložená [mg/ml]	Nalezená [mg/ml]	Recovery [%]	$s_r$ [%]; n=6
PA	1,5	1,520 (1,509)	101,3 (100,6)**	2,65 (2,20)**
AA	0,6	0,542 (0,564)	90,3 (94,0)**	2,56 (2,11)**
FE	0,1	0,096	96,0	3,12

\*\* údaje v závorce pro PA a AA jsou pro  $\lambda = 265$  nm

Tab. 17 Recovery zjištěné metodou přidavku standardů k LP Coldrex® Junior Citron při 190 nm

Analyt	Vložená [mg/ml]	Nalezená [mg/ml]	Recovery [%]	$s_r$ [%]; n=6
PA	3,0	3,125 (3,096) <sup>***</sup>	104,2 (103,2) <sup>***</sup>	2,96 (2,12) <sup>***</sup>
AA	0,3	0,290 (0,295) <sup>***</sup>	96,7 (98,3) <sup>***</sup>	2,35 (2,05) <sup>***</sup>
FE	0,1	0,096	96,0	3,01

<sup>\*\*\*</sup> údaje v závorce pro PA a AA jsou pro  $\lambda = 265$  nm

Na základě dosažených výsledků lze říci, že byla vypracována metoda MEKC, kterou lze stanovit účinná protichřipková léčiva paracetamol, kyselinu askorbovou a fenylefrin v přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, Coldrex® Horký nápoj Citron a Coldrex® Junior Citron, a tím provést kontrolu jakosti přípravku. Metoda poskytuje spolehlivé výsledky;  $s_r$  v rozmezí 1,1 až 3,3% a recovery v rozmezí 90,3 až 104,2%.

## **6. ZÁVĚRY**

- Cílem práce bylo vypracovat elektroforetickou metodu pro separaci a stanovení vybraných léčiv používaných k léčbě chřipky a nachlazení a tuto metodu aplikovat na stanovení léčiv v léčivém přípravku. Vytýčený cíl se podařilo splnit.
- Paracetamol (PA), kyselina askorbová (AA) a fenylefrin (FE) byly analyzovány metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC).
- Z několika vyzkoušených elektrolytových systémů byl jako nejvhodnější vyhodnocen elektrolytový systém obsahující tetraboritan sodný a dihydrofosforečnan draselný s dodecylsíránem sodným jako surfaktantem.
- Optimalizací tohoto elektrolytového systému byly nalezeny vhodné podmínky pro separaci.
- Optimální základní elektrolyt měl složení: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný s obsahem 150 mM SDS v 10 % methanolu, pH\* elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 8,2.
- Bylo vkládáno napětí 20 kV, teplota kapiláry byla udržována na 20 °C.
- Detekce probíhala při vlnových délkách 190 nm (PA, AA, FE) a 265 nm (PA a AA).
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm, celkové délce 31,2 cm a efektivní délce 21 cm.
- Jako vnitřní standard (IS) pro kvantitativní analýzu léčiv jako surovin lze použít ketoprofen. Při analýze léčivých přípravků se migrační čas IS shodoval s migračním časem nečistoty a je nutné použít methylparaben.
- Byly změřeny kalibrační závislosti analytů metodou s vnitřním standardem. Kalibrační závislosti byly měřeny pro koncentrace c(PA) 0,375 – 9,0 mg/ml, c(AA) 0,3 – 7,2 mg/ml, c(FE) 0,05 – 1,2 mg/ml. Korelační koeficient vyšel pro PA 0,9998, AA 0,9986 a pro FE 0,9997.
- Pro ověření reprodukovatelnosti metody bylo provedeno šest po sobě jdoucích měření pro koncentraci PA 3,0 mg/ml, AA 2,4 mg/ml, FE 0,4 mg/ml. Obsah MP (IS) byl 0,4 mg/ml. Relativní směrodatná odchylka poměru plochy analytu a IS se pohybovala v rozmezí 2,20 – 3,16 %, relativní směrodatná odchylka migračních časů byla 0,84 – 0,97 %.
- Migrační čas paracetamolu byl 2,54 minut, kyseliny askorbové 3,33 minut a fenylefrinu 8,17 minut. Methylparaben (IS) migroval jako třetí v pořadí v čase 5,28 minut.
- Bylo vypočítáno rozlišení mezi jednotlivými píky. Hodnoty  $R_s$  byly v rozmezí 2,43 – 4,84.



- Bylo vypočítáno množství teoretických pater N a výškový ekvivalent teoretického patra H. Hodnota N se pohybovala v rozmezí 572,8 – 2 342,6 a hodnota H pro celkovou délku kapiláry 133,19 – 544,69, pro efektivní délku 89,64 – 366,62.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu v průmyslově vyráběném léčivém přípravku Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, Coldrex® Horký nápoj Citron a Coldrex® Junior Citron, v nichž jsou všechny tyto látky obsaženy. Zjištěný obsah účinných látek v přípravku odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem. Relativní směrodatná odchylka obsahu se pohybovala v rozmezí 2,47 – 2,94 % při 190 nm a 1,08 – 1,49 % při 265 nm pro LP Coldrex® Horký nápoj Černý rybíz, 2,12 – 2,83 % při 190 nm a 1,11 – 1,36 % při 265 nm pro LP Coldrex® Horký nápoj Citron, 2,32 – 3,26 % při 190 nm a 1,29 – 1,91 % při 265 nm pro LP Coldrex® Junior Citron.
- Správnost metody MEKC byla ověřena metodou analýzy vzorku s přidavkem standardních látek. Zjištěné recovery bylo v rozmezí 90,3 % až 104,2%.

## **7. CITOVANÁ LITERATURA**

1. **Churáček, J. a kolektiv.** *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod.* Praha : Academia, 1993.
2. **Dolník, V.** *Úvod do kapilární elektroforézy.* Brno : Ústav analytické chemie, 1994.
3. **Heiger, D. N.** *High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction.* France : Hewlet-Packard Company, 1992.
4. **Tůma, P., Opekar, F. et al.** Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu. *Chem. Listy.* 93, 1999, stránky 533-535.
5. **Khaledi, M. G.** *High-performance capillary electrophoresis, Theory, Techniques and Applications.* New York : John Wiley & Sons, INC, 1998.
6. **Majer, J.** *Analytická chemia.* Martin : Osveta, 1989.
7. **Altria, K. D.** Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. *J. Chromatogr. A.* 844(1-2), 1999, stránky 377-386.
8. **Foret, F., Krivánková, L., Boček, P.** *Capillary zone electrophoresis.* Weinheim : VHC Verlagsgesellschaft mbH, 1993.
9. **Dušek, M.** Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin, Disertační práce. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004.
10. **Kašička, V.** Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy.* 91, 1997, stránky 320-329 .
11. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody.* Ostrava : Nakladatelství Pavel Klouda, 2003.
12. **Marina, M. L.** *Analysis and detection by capillary electrophoresis.* Amsterdam : Elsevier, 2005.
13. **Lunte, S. M., Radzik, D. M.** *Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis.* Oxford : Pergamon, 1996.
14. **Drbal, K., Křížek, M.** *Analytická chemie.* České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta., 1989.
15. **Grossmann, P. D., Coburn, J. C.** *Capillary electrophoresis.* London : Academic Press, Inc., 1992.

16. **Holland, L. A.** Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharm. Research.* 14, 1997, stránky 372-386.
17. **Foret, F., Fanali, S. et al.** Indirect photometric detection on capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 470, 1989, stránky 299-308.
18. **Issaq, H. J.** A decade of capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 21, 2000, stránky 1921-1939.
19. **Nishi, H., Terabe, S.** Application of elektrokinetic chromatography to pharmaceutical analysis. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 11, 1993, 1277-1287.
20. —. Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *J. Chromatogr. A.* 735, 1996, stránky 3-27.
21. Micela. [Online] [Citace: 26. 1 2010.] [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/micela.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/micela.html).
22. **Muiselaar, P. G., Otsuka, K. et al.** Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.* 780, 1997, stránky 41-61.
23. **Monzurova, T. G.** Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharm. Chem. J.* 40, 2006, stránky 158-170.
24. **Boček, P., Deml, M. et al.** *Analytická kapilární izotachoforéza.* Praha : Academia, 1987.
25. **Remcho, V. T.** Capillary electrokinetic chromatography (CEC): An introduction to a high-efficiency microanalytical technique. *The Chemical Educator.* 2, 1997, stránky 1-16.
26. **Huiyan, Y.** Reversed capillary electrochromatography: Investigation of peak symmetry for eluting curves of solutes. *National Chromatography Research & Analysis Center.* 58, 2003, stránky 317–320.
27. **Altria, K. D.** Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.* 892, 2000, stránky 171-186.
28. **Pedersen-Bjergaard, S., Halvorsen, T. G.** Analysis of pharmaceuticals by microemulsion electrokinetic chromatography in a suppressed electroosmotic flow environment. *Chromatographia.* 52, 2000, stránky 593-598.
29. *Český lékopis 2009.* Praha : Grada Publishing a. s., 2009.

30. **Marin, A., Barbar, C.** LC/MS for the degradation profilig of cough-cold products under forced conditions. 35, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, stránky 1035-1045.
31. **Lincová, D., Farghali, H. et al.** *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha : Galén, 2002.
32. *Mikro-verze AISLP*. **Škop, B.** Praha : Škop, Bohuslav, 2009.
33. **Bosch, M., E., Sanches, A., J., R. et al.** Review: Determination of paracetamol: Historical evolution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 2006, stránky 291-321.
34. **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, stránky 517-528.
35. **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, stránky 746-749.
36. **Onur, F.** The simultaneous determination of phenylephrin hydrochloride, paracetamol, chlorpheniramine maleate and dextromethorphan hydrobromide in pharmaceutical preparations. *Chromatographia*. 66, 2007, stránky 93-96.
37. **Procházková, D., Drašar, P. et al.** Stanovení paracetamolu v lidském séru pomocí HPLC. *Chem. Listy*. 91, 1997, stránky 373-376.
38. **Cekic, S. D., Filik, H. et al.** Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol and p-Aminophenol in Pharmaceutical Products with Tiron Using Dissolved Oxygen as Oxidant. *J. Anal. Chem.* 60, 2005, stránky 1019-1023.
39. **Oliva, M., Olsina, L. A. et al.** Selective spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation. *Talanta*. 66, 2005, stránky 229-235.
40. **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, stránky D1-D106.
41. **Záděrová, L., Lubal, P.** Kinetické stanovení kyseliny L-askorbové s využitím oscilujícího chemického systému. *Chem. Listy*. 100, 2006, stránky 277-281.

42. **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, stránky 1669-1675.
43. **Shaidarova, L. G., Chelnokova, I. A. et al.** Simultaneous voltammetric determination of dopamin and ascorbic acid at an electrode modified with the gold-paladium binary system. *J. Anal. Chem.* 64, 2009, stránky 36-43.
44. **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, stránky 1269-1274.
45. **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, stránky 791-799.
46. **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, stránky 873-884.
47. **Marchesini, A. F., Williner, M. R. et al.** Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 2003, stránky 39-46.
48. **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, stránky 623-630.
49. **Lau, I. W., Mok Ch. S.** High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. *J. of Chromatogr A.* 693, 1995, stránky 45-54.
50. **Devarajan, P. V., Adani, M. H. et al.** Simultaneous determination of lignocaine hydrochloride and phenylephrine hydrochloride by HPTLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 2000, stránky 685-690.
51. **Šabartová, J.** Validace analytických metod. *Věstník SÚKL.* 1, 1994, str. 6.

## **ABSTRAKT**

# STANOVENÍ PARACETAMOLU, KYSELINY ASKORBOVÉ A FENYLEFRINU VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH POMOCÍ MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRAFIE

---

**Autor:** Kubíková D.

**Konzultant rigorózní práce:** Pospíšilová M., Katedra analytické chemie,  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

V této práci je zachycen vývoj a optimalizace metody pro separaci a stanovení paracetamolu (PA), kyseliny askorbové (AA) a fenylefrinu (FE) v léčivých přípravcích pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC) s UV detekcí při 190 nm a 265 nm. Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (31,2 cm x 50  $\mu$ m, efektivní délka 21 cm) při 20 kV, teplotě 20°C a hydrodynamickém dávkování při tlaku 34,5 mbar po dobu 5 s. Optimální základní elektrolyt měl složení: 5 mM tetraboritan sodný, 5 mM dihydrofosforečnan draselný s obsahem 150 mM dodecylsíranu sodného (SDS) v 10 % methanolu. pH\* elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 8,2. Jako vnitřní standard byl použit methylparaben (MP). Analýza trvala méně jak 9 minut, s promýváním kapiláry méně jak 15 minut. Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí koncentrací 0,375 – 9,0 mg/ml (PA), 0,3 – 7,2 mg/ml (AA) a 0,05 – 1,2 mg/ml (FE). Korelační koeficient byl v rozmezí 0,9986 - 0,9998. Validovaná metoda byla úspěšně použita pro kvalitativní a kvantitativní analýzu paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu ve farmaceutických přípravcích řady Coldrex® horký nápoj ( $s_r=1,08$  % až 2,94 %).



## **ABSTRACT**

# DETERMINATION OF PARACETAMOL, ASCORBIC ACID AND PHENYLEPHRINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

---

**Author: Kubikova D.**

**Tutor: Pospisilova M.,** Dept. of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague

A new method of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with UV detection at 190 nm and 265 nm for the determination of paracetamol (PA), ascorbic acid (AA) and phenylephrine (FE) in pharmaceutical preparations was devised and optimised. The analysis was carried out in a fused-silica capillary (internal diameter 50  $\mu\text{m}$ , total length 31,2 cm and effective length 21 cm), with voltage 20 kV, temperature 20 °C and sample injection for 5 seconds under the pressure of 34,5 mbar. Optimum background electrolyte (BGE) was 5 mM sodium tetraborate and 5 mM potassium dihydrogen phosphate containing 150 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) as a surfactant and 10 % (v/v) of methanol. pH\* 8,2 was found to be optimal. Methylparaben (MP) was used as internal standard. The peaks of the drugs were satisfactorily separated from the peak of internal standard as well as from the EOF. The separation took less than 9 minutes and the overall analysis time involving appropriate rinsing of the capillary was less than 15 minutes. The calibration curves were linear in the range 0.375-9.0 mg/ml (PA), 0.3-7.2 mg/ml (AA) and 0.05-1.2 mg/ml (FE) . The correlation coefficients were from 0.9986 to 0.9998. The method is applicable for qualitative as well as quantitative assay of paracetamol, ascorbic acid and phenylephrine in pharmaceuticals of Coldrex® family, hot drink (RSD = 1.08 % - 2.94 %).