

## 6. SOUHRN

Hořčík a draslík hrají esenciální roli v existenci živých organismů. Hořčík, čtvrtý nejčastější minerál v lidském těle, se účastní kolem 300 základních enzymatických reakcí, podílí se výrazně na transkripci DNA a na proteosyntéze, je důležitý pro energetický metabolismus [8]. Draslík je v lidském těle hlavním intracelulárním kationtem. Má zásadní význam pro elektrické děje na buněčných membránách, zejména nervů a svalů včetně srdce [9, 10]. Rovnováha těchto minerálů v těle je důležitou podmínkou potřebnou k udržení zdraví. Jejich nedostatek nebo naopak nadbytek v organismu je spojen s řadou vážných syndromů a onemocnění. Hořčík a draslík jsou využívány ve formě různých solí, oxidů, hydroxidů nebo komplexů při výrobě mnoha léčivých přípravků nebo potravinových doplňků. Často se tyto kovy vyskytují ve formě solí s organickými anionty, např. jako acetát, aspartát, citrát, glukonát, pidolát, salicylát, stearát, etc. [1, 3].

Askorbová kyselina je ve vodě rozpustný vitamín, který je důležitý pro správnou funkci a stavbu pojivové tkáně a cévní stěny, činnost enzymů a metabolismus některých látek (např. cholesterolu). Podílí se na redukci železa při jeho resorpci. Uvádí se také jeho podíl na zvýšení celkové odolnosti organismu a antioxidační působení [14]. Kyselina askorbová je součástí mnoha léčiv a potravinových doplňků, buď samotná nebo se také často vyskytuje v kombinaci s některými minerály jako je např. hořčík, železo, selen nebo zinek. Asparagová kyselina je neesenciální aminokyselina, účastní se např. metabolismu močoviny. Její sůl se nazývá aspartát, podílí se rovněž na nervovém přenosu [15].

Lékopis [3] používá ke stanovení hořčíku chelatometrickou titrací edetanem disodným v alkalickém pufru; další popsané metody jsou plamenová atomová absorpční spektrometrie [7], sekvenční injekční analýza [17] a v současné době multikomutativní průtokový systém pro multielementární analýzu [29]. Oficiální metoda pro stanovení draslíku je atomová emisní spektrometrie [3]; mezi další metody patří FIA s potenciometrickou detekcí [27] a kapilární elektroforéza s konduktometrickou detekcí [4]. Askorbovou kyselinu lékopis stanovuje přímou iodometrickou titrací v prostředí kyseliny

sírové a s přidavkem roztoku škrobu [3]; další publikované metody jsou kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí [32]; průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou [33, 34, 35], fluorimetrickou [36] a amperometrickou detekcí [37]; potenciometrické stanovení [38]; iodometrická potenciometrická titrace [39]; spektrofotometrické stanovení [41, 42, 43] nebo kapilární zónová elektroforéza [46]. Oficiální metoda pro stanovení asparagové kyseliny je alkalimetrická titrace hydroxidem sodným [3].

Kovové kationty se často vyskytují ve léčivých přípravcích společně s organickými anionty. Přesto nebyla publikovaná žádná metoda stanovující obě komponenty současně. Každý z iontů by bylo potřeba kvantifikovat odděleně. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu stanovující v jednom nástřiku anorganický kation i organický anion a tuto metodu aplikovat na léčivé přípravky.

Metoda je založena na spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie s ELSD (Evaporative Light Scattering Detection). ELS detektor je polouniverzální detektor, který v současné době nachází stále širší uplatnění, a to především u analytů, které nemají ve své molekule chromoforové skupiny a nemohou být tudíž bez derivatizace detekovány spektrofotometricky. ELSD je převážně považován za detektor kapalinové chromatografie, nicméně lze ho s úspěchem použít i při protiproudové (CCC) a superkritické fluidní chromatografii (SFC). Oproti ostatním univerzálním detektorům, jako je např. refraktometrický (RID) nebo hmotnostní (MS), ELSD vykazuje určité přednosti: a) kompatibilita s gradientovou elucí (na rozdíl od RID); b) podstatně lepší citlivost ve srovnání s RID (běžný limit detekce se pohybuje v nanogramových množstvích, v závislosti na těkavosti a molekulové hmotnosti); c) nízké náklady a snadná obsluha (na rozdíl od hmotnostního spektrometru). Nicméně je třeba uvést také určité nevýhody ELS detektoru. Tou hlavní je požadavek na těkavost mobilní fáze. Nesmí být použity netěkavé reagenty, pufrů ani jiné složky mobilní fáze. Výběr vhodných kyselin a bazí se tím značně omezuje; mezi často používané patří kyselina octová, mravenčí, triflouroctová, pentaflouropropionová a heptaflouromásečná a jejich amonné soli v nízkých koncentracích (<0.1M). ELSD je destruktivní detektor, proto musí být poslední v řadě, pokud je použit v sérii s jinými detektory. Vykazuje také nedostatečnou citlivost pro analýzu např. nečistot a reziduí, které se vyskytují v množstvích  $\text{ng ml}^{-1}$  (LOQ je obvykle vyšší než  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Tyto vzorky je

většinou třeba upravit prekoncentrací, což bývá obtížné, neboť není možné použít netěkavé reagentie [4].

Základní princip detektoru sestává ze tří následných kroků: a) nebulizace chromatografického eluentu; b) vypaření mobilní fáze a c) detekce netěkavých částic měřením rozptylu světla (Fig.2.1). V prvním kroku eluent z kolony vstupuje do nebulizéru Venturiho typu, kde proudem nosného plynu vzniká velké množství kapiček téměř stejné velikosti. Tento aerosol je v druhém kroku unášen do vyhřívané trubice, kde dojde k vypaření těkavé mobilní fáze a zůstanou oddělené částice netěkavého analytu. V následující fázi tyto částice vstupují do optické cely a prochází světelným paprskem. Rozptyl světla je měřen fotonásobičem nebo fotodiodou [4].

Pro separaci byla použita analytická reverzní kolona C<sub>18</sub> Waters ODS-2.

Pro separaci hořčíku, draslíku a aspartátu v přípravku Cardilan<sup>®</sup> se nejlépe osvědčila izokratická eluce s vodnou mobilní fází obsahující 0.02% trifluoroctové kyseliny (v/v) (Table 4.1, Fig 4.1). Tato mobilní fáze byla též použita pro analýzu přípravku Magnesii lactici 0.5 tbl.<sup>®</sup>. Laktátový aniont zde nebylo možné stanovit, neboť při použité vysoké teplotě v detektoru vytékal. Pro separaci askorbátu a hořčíku v přípravku Magnesium 250 mg<sup>®</sup> bylo třeba použít gradientovou eluci. Nejvhodnější složení mobilní fáze bylo zjištěno od 0 min do 2.5 min vodná nonafluoropentanová kyselina 0.5 ml l<sup>-1</sup>; od 2.5 min do 3.5 min lineární změna gradientu na vodnou TFA 1.0 ml l<sup>-1</sup> až do 11.5 min (Tables 4.4, 4.5, Fig 4.2). Snaha o separaci hořečnatých kationtů od vápenatých, zinečnatých a hliníkových skončila neúspěšně (Tables 4.2, 4.3). Pro tuto separaci by bylo třeba použít jiný typ kolony, například iontovýměnnou.

Bylo třeba stabilizovat askorbovou kyselinu v přípravku Magnesium 250 mg<sup>®</sup>. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s hydrogensířičitanem sodným přidaným v pětinasobném nadbytku. Askorbová kyselina zůstala po této úpravě stabilní v roztoku po dobu jedné hodiny.

Pro obě metody byly určeny validační parametry: rozlišení dvou sousedících píků (Table 4.6); asymetrie píků (Table 4.6); linearita a rozsah pětibodových kalibračních křivek (Table 4.7); přesnost z hlediska opakovatelnosti (Table 4.8) a reprodukovatelnosti (Table 4.9); limity detekce a kvantifikace (Table 4.10).

Značnou výhodou HPLC-ELSD metod je velice snadná úprava vzorku. Na rozdíl od spektrálních metod není zde potřeba provádět derivatizaci ani jiné často složité a zdlouhavé postupy. Přímé stanovení šetří čas a snižuje náklady na analýzu.

Validované metody byly použity k analýze tří léčivých přípravků registrovaných v České republice. Jednalo se o: Cardilan® (účinná látka hydrogenaspartát hořečnatý hemihydrát 175 mg v 1 tabletě, hydrogenaspartát draselný hemihydrát 175 mg v 1 tabletě); Magnesii lactici 0.5 tbl.® (účinná látka laktát hořečnatý dihydrát 500 mg v 1 tabletě); Magnesium 250 mg® (účinná látka oxid hořečnatý 420 mg v 1 tabletě, kyselina askorbová 150 mg v 1 tabletě). Hořčík, draslík a aspartát v přípravku Cardilan®, hořčík v Magnesii lactici 0.5 tbl.® a hořčík v Magnesium 250 mg® byly stanoveny izokratickou metodou. Askorbát v přípravku Magnesium 250 mg® byl stanoven metodou lineárního gradientu. Askorbát byl měřen ve dvou zředěních po dvou replikacích, všechny ostatní analyty ve třech zředěních po třech replikacích. Zjištěný obsah se pohyboval v rozmezí 95.0 – 105.0 % obsahu udávaného výrobcem ( $r > 0.95$ ) (Tables 4.11, 4.16, 4.21). Dalším předmětem analýzy byla recovery - měření pěti vzorků s přidavkem známého množství standardu příslušného kationtu. Stanovení proběhlo většinou ve třech replikacích a opět vyhovovala většina vzorku (Tables 4.12, 4.17, 4.22). Z naměřených údajů byla pomocí t-testu hodnocena významnost odchylky u parametru  $a$  od nulové hodnoty pro závislost koncentrace vzorku na obrácené hodnotě jeho zředění (Tables 4.14, 4.19, 4.24) a významnost odchylky u parametru  $b$  od nulové hodnoty pro závislost koncentrace formulace na obrácené hodnotě jeho zředění (Tables 4.15, 4.20, 4.25). Všechny hodnoty kromě jedné byly menší než 4,303; což je maximální hodnota předepsaná pro tři zředění zajišťující konfidenční interval 95%. Pro askorbát měřený pouze ve dvou zředěních byly hodnoty t-testu nižší než limitní hodnota 12.706.

Hlavní výhodou uvedených HPLC-ELSD metod je rychlost, snadná úprava vzorků, značná přesnost, dostatečná citlivost a nízké náklady na přístrojové vybavení.