

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Sledování změn obsahu účinných látek v závislosti na postupu
přípravy léčivého přípravku Coldrex Horký nápoj**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vedoucí práce : PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Mgr. Tereza Košvancová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a další zdroje, které jsem v práci využila a z kterých jsem čerpala, jsou v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání stejného nebo jiného titulu.

V Hradci Králové dne

.....

Tereza Košvancová

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, připomínky a cenné rady při vypracování rigorózní práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým nejbližším za neustálou podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra analytické chemie

Kandidát: **Mgr. Tereza Košvancová**

Konzultant: **PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.**

Název rigorózní práce:

Sledování změn obsahu účinných látek v závislosti na postupu přípravy léčivého přípravku Coldrex Horký nápoj

Byly nalezeny vhodné chromatografické podmínky pro separaci obsahových a pomocných látek v přípravku Coldrex Horký nápoj a částečně i jejich rozkladných produktů pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Optimálních výsledků bylo dosaženo na částicové analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm). Jako mobilní fáze byla použita směs methanol : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min, nastříkovaném objemu 10 µl, izokratickém režimu a laboratorní teplotě. K detekci byl použit UV detektor s vlnovými délkami 210 a 265 nm. Vnitřním standardem se stala kyselina salicylová. Látky byly eluovány v pořadí: kyselina citrónová, kyselina askorbová, p-aminofenol, fenylefrin, paracetamol, kyselina salicylová.

Byla zjištěna nejvhodnější teplota vody jako rozpouštědla léčivého přípravku, při kterém má roztok největší koncentraci obsahových látek.

Byl zjištěn rozklad obsahových látek při testování jejich stability po určitou dobu od přípravy, získané výsledky byly zkoumány a byla formulována určitá doporučení.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Department of Analytical Chemistry

Candidate: **Mgr. Tereza Košvancová**

Consultant : **PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.**

Title of Thesis:

Monitoring of changes of contents of effective substances according to the preparation process of the medicinal product Coldrex Hot drink

The High Performance Liquid Chromatography suitable conditions for the separation of effective and adjuvant substance in the medicinal product Coldrex Hot drink and some of their degradation products were found.

The particle analytical column LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm) was used for achievement of optimal results. A mobile phase composed of methanol : phosphate buffer pH 6.52 in ratio 35 : 65 (v/v), the flow-rate 0.5 ml/min, the sample volume 10 µl, the isocratic mode and laboratory temperature were chosen. The UV detection was set at 210 and 265 nm. Salicylic acid was used as an internal standard. Substances were eluted in the following order: citric acid, ascorbic acid, p-aminophenol, phenylephrine, paracetamol, salicylic acid.

The most suitable water temperature used as a solvent for medical product in which the solution contains highest concentrations of effective substances was found.

The decomposition of effective substance was monitored during the respective time after preparation, achieved results were studied and some recommendations have been proposed.

1. OBSAH

1.	OBSAH	6
2.	SEZNAM ZKRATEK	9
3.	CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
4.	TEORETICKÁ ČÁST	11
4.1	Coldrex Horký nápoj Citron	11
4.1.1	Charakteristika přípravku Coldrex Horký nápoj	11
4.1.2	Paracetamol	12
4.1.3	Fenylefrin	13
4.1.4	Kyselina askorbová	14
4.1.5	Charakteristika stability hlavních obsahových látek.....	15
4.2	Chromatografie	16
4.2.1	Základní vlastnosti vysokoúčinné kapalinové chromatografie	16
4.2.1.1	Obecný princip HPLC separace	16
4.2.1.2	Trendy ve vývoji chromatografických kolon	17
4.3	Možnosti stanovení obsahových látek	19
4.3.1	Paracetamol	19
4.3.2	Kyselina askorbová	21
4.3.3	Fenylefrin	22
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1	Použité chemikálie	24
5.2	Použité přístroje a zařízení	25
5.2.1	Přístroje a zařízení.....	25
5.2.2	Chromatografické kolony.....	25
5.3	Příprava roztoků	26
5.3.1	Zásobní roztoky	26
5.3.2	Směsný roztok standardů.....	26
5.4	Příprava mobilních fází	27
5.4.1	Roztoky fosforečnanového pufru.....	27
5.4.2	TEA pufrů.....	28

5.5	Optimalizace separačních podmínek	29
5.5.1	Vlnová délka detekce	29
5.5.2	Výběr stacionární a mobilní fáze	29
5.5.3	Další chromatografické podmínky	30
5.6	Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj.....	31
5.6.1	Vliv teploty vody na přípravu horkého nápoje	31
5.6.2	Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje.....	31
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
6.1	Optimalizace separačních podmínek	32
6.1.1	Vlnová délka pro detekci.....	32
6.1.2	Stacionární a mobilní fáze	32
6.1.2.1	Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm).....	33
6.1.2.2	Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 µm).....	36
6.1.2.3	LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm)	38
6.1.2.4	Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm)	41
6.1.2.5	Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm).....	42
6.1.3	Průtoková rychlost	44
6.1.4	Souhrn zvolených chromatografických podmínek	44
6.2	Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj.....	45
6.2.1	Vliv teploty vody na přípravu horkého nápoje	45
6.2.1.1	Postup přípravy měření.....	45
6.2.1.2	Výsledky měření	46
6.2.2	Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje.....	50
6.2.2.1	Postup přípravy měření.....	50
6.2.2.2	Výsledky měření	50
6.2.3	Souhrn poznatků získaných z měření.....	53
7.	SOUHRN.....	54
7.1	Optimalizace separačních podmínek	54
7.2	Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj.....	56
7.2.1	Vliv teploty na složení horkého nápoje.....	56
7.2.2	Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje.....	56
7.3	Stabilita obsahových látek.....	58

7.4	Srovnání chromatografických metod.....	59
8.	ZÁVĚR.....	60
9.	POUŽITÁ LITERATURA.....	61

2. SEZNAM ZKRATEK

AA	Kyselina octová
ACN	Acetonitril
BEH	Etylenový hybridní most (Bridge Ethylen Hybrid)
c_a	Koncentrace kyseliny askorbové
c_f	Koncentrace fenylefrinu
c_p	Koncentrace paracetamolu
c_s	Koncentrace kyseliny salicylové
ČL	Český lékopis
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
Na_2HPO_4	Hydrogenfosforečnan sodný
LP	Léčivý přípravek
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
TEA	Triethylamin
UV	Ultrafialové spektrum (Ultra-Violet)

3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Tato rigorózní práce se zabývá zkoumáním změn obsahu účinných látek v léčivém přípravku Coldrex Horký nápoj v závislosti na podmínkách jeho přípravy. Základním cílem práce je nalezení optimálních chromatografických podmínek pro stanovení látek obsažených v LP, na jehož základě budou hledány nejvhodnější podmínky jeho přípravy.

Coldrex Horký nápoj je volně prodejný lék k vnitřnímu užití, vhodný k odstranění příznaků chřipky a nachlazení jako jsou horečka, bolesti hlavy, svalů a kloubů či ucpaného nosu. Přípravek obsahuje paracetamol s analgetickými a antipyretickými účinky, fenylefrin fungující i perorálně jako nosní dekonjestivum a kyselinu askorbovou, která podporuje obranné reakce organismu.

Zajistit pacientovi kvalitní, bezpečný a účinný lék je základním cílem farmacie. Hodnocení bezpečnosti a účinnosti léčivých přípravků, zejména polykompozitních, je prováděno různými analytickými metodami, především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Účinné látky přípravku se obvykle stanovují chemickou metodou dle českého lékopisu. Rozkladný produkt paracetamolu p-aminofenol je příčinou jeho toxicity. Je proto nutné s ohledem na riziko jeho přítomnosti stanovení i obsahu této látky v daném přípravku. Z tohoto důvodu je dalším cílem práce nalezení metody vhodné také pro zjištění přítomnosti produktu, který by během přípravy nebo po ní mohl vzniknout.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Coldrex Horký nápoj Citron

4.1.1 Charakteristika přípravku Coldrex Horký nápoj

Coldrex Horký nápoj je léčivý přípravek určený k odstranění příznaků chřipky a nachlazení, včetně horečky, bolesti hlavy, svalů a kloubů, dále ucpaného nosu a zánětu nosní sliznice. Používá se u dospělých a mladistvých v dávce 1 sáček rozpuštěný v šálku horké vody až 4x denně s odstupem mezi dávkami nejméně 4 hodiny. Vzhledem k obsahu léčivé látky přípravek není vhodný pro děti do 15 let.

Jedná se o přípravek s obsahem paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové. Paracetamol je analgetikum – antipyretikum bez protizánětlivého účinku. Fenylefrin funguje jako dekongestant nosní sliznice. Kyselina askorbová bývá součástí kombinovaných přípravků proti chřipce a nachlazení, kompenzuje ztráty a nedostatek vitamínu C v počátečním období akutních virových infekcí, podporuje obranné reakce organismu.

Nežádoucí účinky se v terapeutických dávkách vyskytují zřídka a s mírnými projevy, nejčastěji se jedná o vyrážky a kožní alergie. Vzácně se objevuje zvýšení krevního tlaku vedoucího k bolestem hlavy, případně bronchospasmus [1].

Přípravek je krystalický světle žlutý prášek citronové chuti a vůně, balen v laminovaných sáčcích obsahujících 5 g prášku, velikost balení je 5 a 10 sáčků. Přípravek je volně prodejný [2].

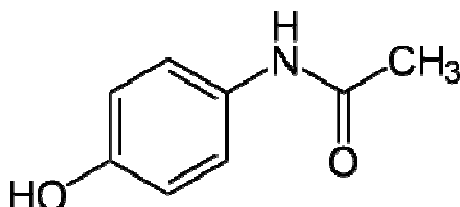
Kompletní složení přípravku Coldrex Horký nápoj Citron v 1 sáčku [2]:

Paracetamolium	750 mg
Phenylephrini hydrochloridum	10 mg
Acidum ascorbicum	60 mg

Pomocné látky : Acidum citricum, Saccharosum, Saccharinum nitricum, Flavum quinoli, Aroma citri pulveratum

4.1.2 Paracetamol

Paracetamol je bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu [3].



Obr.1 : Chemická struktura paracetamolu

Jedná se o léčivo široce používané ke snížení bolesti a horečky u nemocí jak bakteriálního, tak virového původu. Díky relativně dobré gastrointestinální snášenlivosti, neovlivňování krevní srážlivosti a hladiny cukru v krvi je používán pro pacienty, u nichž je z důvodu vředové choroby, insulinové insuficience či indikace léků ovlivňujících koagulaci krve jiná terapie nevhodná. Je také lékem první volby u dětí, těhotných žen a geriatrických pacientů.

Paracetamol svou chemickou strukturou patří mezi deriváty anilínu, řadí se do farmakoterapeutické skupiny neopioidních analgetik s antipyretickým účinkem, tj. schopností snižovat nemocí zvýšenou tělesnou teplotu tlumivým působením na termoregulační centrum v hypotalamu. Analgetický centrální účinek je dán působením na serotoninové receptory v míše. Na rozdíl od klasických nesteroidních antiflogistik chybí protizánětlivý účinek [4, 5].

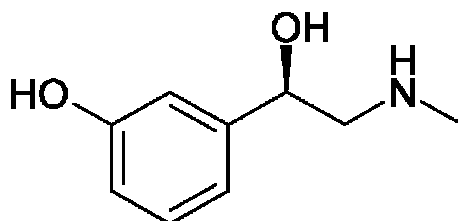
V mnoha stabilitních studiích bylo prokázáno, že tato látka postupně podléhá kyselé i alkalické hydrolyze, projevila se i citlivost na světlo či současnou přítomnost dalších látek. Hlavním rozkladným produktem těchto reakcí je p-aminofenol, který se na světle a vzduchu dále oxiduje na chinony a podobné látky, zabarvující roztok do tmavě žluta až hněda [6, 7].

Aktivovaný p-aminofenol je také reaktivním metabolitem paracetamolu. Rychle se vstřebává z gastrointestinálního traktu a distribuuje do všech tkání a tělních tekutin. V organismu se paracetamol za běžných okolností při podávání terapeutických dávek

biotransformuje na již zmíněný p-aminofenol, který se okamžitě konjuguje s glutathionem na jeho volných -SH skupinách a je vylučován močí ve formě neškodných konjugátů. Po nadměrných dávkách paracetamolu (u dospělého člověka nad 8 g/den) dochází k vyčerpání zásoby látek s těmito skupinami v játrech a toxický metabolit se kumuluje, což je příčinou akutního jaterního selhání a následného ohrožení základních fyziologických funkcí s vysokou mortalitou. Z těchto důvodů je p-aminofenol sledovanou látkou a jako hlavní nečistota v přípravcích obsahujících paracetamol je hodnota této látky limitována lékopisem [1, 4].

4.1.3 Fenylefrin

Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v ethanolu 96%. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů [3].



Obr.2 : Chemická struktura fenylefrinu

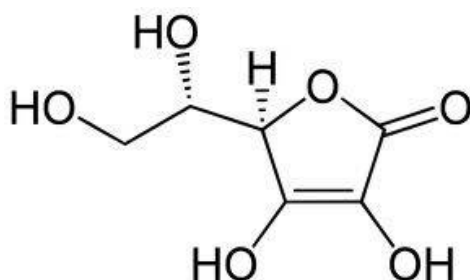
Fenylefrin je látka patřící do skupiny selektivních sympatomimetik, konkrétně alfa-1 mimetik, což jsou látky navozující stimulaci alfa-1 receptorů spasmus slizničních cév, čímž snižují překrvení sliznic, a tím navozují dekonjesci. Aplikuje se jak topicky, tak systémově (perorálně). U topické aplikace obecně platí, že přípravky s obsahem těchto látek by u dospělých osob neměly být podávány po dobu delší než 1 týden z důvodu vzniku návyku (sanorinismus) s intenzivním zduřováním sliznice za kratší dobu po aplikaci. Celkově jejich dlouhodobé používání může vést k poškození slizničního epitelu s útlumem řasinkové aktivity a k ireverzibilnímu poškození sliznice [8, 9].

Tato látka je absorbována z trávicího ústrojí a je metabolizována v játrech při prvním průchodu, fenylefrin podaný per os má tak sníženou biologickou dostupnost. Je vylučován téměř úplně do moči jako sulfátový konjugát.

Z nežádoucích účinků je možné zmínit především zvýšení krevního tlaku provázeného bolestí hlavy, dále pak závratí, zvracením, průjmem, nespavostí a zřídka palpitacemi. Tyto účinky však byly zaznamenány pouze ojediněle. Z důvodu změny krevního tlaku se doporučuje vyhnout večernímu podání, neboť by mohl narušit usínání a spánek [10].

4.1.4 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo se jedná o bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu 96% [3].



Obr. 3: Chemická struktura kyseliny askorbové

Její přesný chemický název je kyselina L-askorbová neboli L-enantiomer (optický izomer) kyseliny askorbové, je to poměrně nestabilní látka citlivá na světlo, teplo a oxidaci.

Jedná se o vitamín rozpustný ve vodě, který je nezbytný k životu a udržení tělesného zdraví. Člověk patří na celém světě k jednomu z mála organismů, který si ho není schopen sám syntetizovat, což je patrně následkem genetického defektu.

Vitamín C se vyskytuje především v zelenině a ovoci. Je potřebný pro metabolismus aminokyselin, podílí se na syntéze kolagenu. Také podporuje vstřebávání železa, stimuluje tvorbu bílých krvinek, vývoj kostí a chrupavek, čímž podporuje růst [4]. Názor o účinku proti chřipce nebyl doposud podepřen klinickým důkazem, nejsou ani přesvědčivé důkazy o jeho preventivním účinku při samostatném

podání. Určité pozitivní výsledky byly dosaženy při kombinaci vitamínu C s betakarotenem a zinkem u vrcholových sportovců. Předpokládá se však, že účinek této kombinace spíše spočívá v mobilizaci obranných reakcí imunitního systému, takže se tělo snáze vypořádá s nastupující infekcí [10].

Nedostatek vitamínu C se projevuje menší pevností cévní stěny a zvýšenou krvácivostí, dále sníženou pevností vazivového aparátu zubu končící jeho vypadnutím. Dalšími projevy jsou zpomalený růst, deformace kostí, zvýšená únava a žaludeční problémy.

Při nadbytečném příjmu dochází k podráždění trávicího traktu, ale vitamín C je velmi rychle vylučován močí. Dlouhodobě může docházet k odvápnění kostí a tvorbě ledvinových kamenů [10].

4.1.5 Charakteristika stability hlavních obsahových látek

Jak bylo dříve popsáno, paracetamol je poměrně stabilní látka, avšak v kyselé oblasti pH rychleji podléhá hydrolyze za vzniku rozkladného produktu p-aminofenolu. Paracetamol je taktéž citlivý na světlo a přítomnost dalších látek [8, 11].

Kyselina askorbová působí jako redukční činidlo, je snadno oxidovatelná působením kyslíku či zvýšené teploty, jejím degradačním produktem je kyselina dehydroaskorbová. Míra oxidace závisí na koncentraci a teplotě roztoku, jeho pH, druhu rozpouštědla, dále na přítomnosti kyslíku a světla [12]. Optimálním prostředím pro roztok kyseliny askorbové je pH v kyselé oblasti (3 až 4,5), při nižší teplotě (okolo 5 °C), v obalu zabraňujícím průchodu světla, ve vyšších koncentracích (alespoň 1 mg/100 ml) [13, 14].

Fenylefrin je považován za stabilní látku, která by však měla být skladována při nižší teplotě. Je citlivý na teplo, světlo a vzdušnou vlhkost. Stabilita v kyselé oblasti pH při přítomnosti dalších látek nebyla v literatuře doposud dostatečně popsána [15].

4.2 Chromatografie

Chromatografie je vysoce účinná separační metoda, sloužící k oddělování složek testovaného vzorku a současně k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.

V průběhu analýzy je vzorek vnášen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, má schopnost různou měrou zachycovat jednotlivé složky vzorku. Mobilní fáze je pohyblivá a jejím tokem přes stacionární fázi jsou součástí vzorku unášeny soustavou. Konečná separace závisí na míře zadržení složek nepohyblivou fází [16].

4.2.1 Základní vlastnosti vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.2.1.1 Obecný princip HPLC separace

HPLC patří k nejprogresivnějším analytickým metodikám, našla velké uplatnění ve všech oblastech analýzy látek.

Hlavními přednostmi této separační metody je již zmíněná možnost současného kvalitativního a kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi, dále rychlost a citlivost stanovení. K analýze je potřeba pouze minimální množství vzorku. Výhodná je taktéž možnost automatizace [17]. Dělení látek nastává mezi stacionární fází zakotvenou na nosiči uvnitř chromatografické kolony a mobilní fází, která je přes ni protlačována za vysokého tlaku [16].

Z hlediska použitých fází se dá HPLC rozdělit na techniku s tzv. normální fází nebo, v současnosti více užívanou, reverzní neboli obrácenou fází. Chromatografie s normální fází je vhodná při separaci polárních látek. Metodika s reverzní fází využívá jako stacionární fáze nepolární uhlíkaté řetězce (C18 apod.) navázané na nosič (silikagel). Mobilní fáze mají pak polárnější charakter (MeOH, ACN,...) [18].

HPLC je také možno rozdělit podle typu použité eluce. Izokratická eluce je charakteristická neměnným složením mobilní fáze po celou dobu analýzy. Pro zkrácení doby analýzy u směsi různě polárních látek je možno zvolit eluci gradientovou, při které je použito více mobilních fází s vzájemně proměnným poměrem a se vzrůstající eluční silou [19].

4.2.1.2 Trendy ve vývoji chromatografických kolon

Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou dlouhé nejčastěji 5 – 30 cm, s vnitřním průměrem 2 – 8 mm a konstruované tak, aby náplň kolony byla rovnoměrná a odolala vysokým tlakům i chemickému působení mobilní fáze či separovaných látek. S rostoucí délkou analytické kolony se zvyšuje účinnost separace, ale i doba analýzy. Separace je založena na povrchových interakcích sorbentu a analytu [16].

V moderní kapalinové chromatografii je trendem miniaturizace kolon a vývoj nových sorbentů pro separaci. Používány jsou především malé rigidní porézní částice nebo monolity s velkou plochou povrchu. Zmenšováním velikosti částic a průměru kolony se snižuje spotřeba mobilní fáze i vzorku a také objem vyprodukovaného odpadu obsahujícího organická rozpouštědla.

Výběr analytické kolony je třeba důkladně zvážit, protože každý typ nabízí jiné možnosti a má různá omezení v závislosti na pH mobilní fáze, na tlaku vyvíjeném na kolonu či vlastnostech jednotlivých složek vzorku.

Monolitické kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřní prostor analytické kolony. Mají velkou výhodu v jejich struktuře bimodálních pórů, zajišťujících velmi dobré hydrodynamické vlastnosti. Obsahují velké póry (*makropóry*) a středně velké póry (*mesopóry*). Makropóry tvořící prostorovou síť snižují zpětný tlak kolony, zajišťují rychlý tok mobilní fáze a podstatně zrychlují přenos vzorku mezi mobilní a stacionární fází, čímž zároveň zkracují dobu analýzy. Mesopóry vytváří vnitřní porézní strukturu a poskytují monolitu dostatečně veliký aktivní povrch pro vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje používání monolitů při poměrně vysokých průtokových rychlostech mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i při separaci makromolekul [20].

Klasické částicové kolony vykazují velice dobrou separační účinnost vhodnou pro běžnou analýzu, ale s klesající velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Z tohoto důvodu je omezená také rychlost analýzy a délka kolony. Navíc při dalším zmenšování velikosti částic vysoký zpětný tlak podstatně snižuje životnost kolony. Tyto skutečnosti spolu s faktem, že je potřeba analyzovat stále více látek s různými vlastnostmi vedly k hledání nosiče spojujícího dělicí účinnost silikagelu s chemickou inertností a stabilitou polymerů. Materiály

na bázi silikagelu vynikají svou účinností, ale jsou schopny pracovat pouze v omezeném rozsahu pH. Naopak polymery jsou stabilní v širokém rozmezí pH na úkor účinnosti separace [21, 22].

Objevily se nové technologie, používající silikagelové částice s organokřemičitým krunýřem. Takovéto hybridy si zachovávají mechanickou pevnost, rigiditu a dobrou dělicí účinnost silikagelu, krunýř stabilizuje celý povrch, čímž rozšiřuje rozmezí pH, ve kterém se dá kolona použít. Jinou technologií byly vytvořeny kolony s BEH částicemi (Bridge Ethylen Hybrid), které obsahují organickou (organosiloxany) i anorganickou (silikagel) část spojené ethylenovými můstky. Díky těmto můstkům může být kolona použita v širokém rozpětí pH [18, 23].

4.3 Možnosti stanovení obsahových látek

V dostupné literatuře nebyla nalezena metoda zabývající se současným stanovením paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu. Literatura však obsahuje značné množství prací, ve kterých se autoři snažili stanovovat jednotlivé látky samostatně nebo v kombinaci s jinými látkami v různých médiích s využitím odlišných chromatografických podmínek.

4.3.1 Paracetamol

a) HPLC stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu v tabletách [24]

kolona: *Nucleosil 100-5 C18 (250 x 4,5 mm, 5 μm)*

mobilní fáze: *voda : methanol (20 : 80 (v/v))*

vnitřní standard: *cetrimid*

detekce: *UV 254 nm*

dávkovaný objem: *10 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *1 ml/min*

teplota: *laboratorní*

režim: *izokratický*

Analýza byla určena k současnému stanovení těchto látek v tabletách. Délka analýzy je 6 minut.

b) HPLC stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu v tabletách [25]

kolona: *Spherisorb 5 ODS1, 250 x 4,6 mm*

mobilní fáze: *fosfátový pufr : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 : 15 : 3 : 32 (v/v/v/v))*

detekce: *UV 273 nm*

dávkovaný objem: *5 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *0,5 ml/min*

teplota: *25 °C*

režim: *izokratický*

Analýza byla určena k současnému stanovení látek v tabletách. Analýza trvala 10 minut.

c) Separace paracetamolu, kofeinu, propyfenazonu a 4-aminofenolu [26]

kolona: *Discovery RP-AMIDE C-16 (250 x 4,6 mm, 5 μm)*

mobilní fáze: *ACN : voda (bez úpravy pH)*

detekce: *UV 270 nm*

rychlost průtoku mobilní fáze: *1 ml/min*

teplota: *40 °C*

režim: *gradientový: 0. – 1. min (5 : 95 (v/v))*

1. – 8. min (40 : 60 (v/v))

8. – 9. min (5 : 95 (v/v))

9. – 13. min (5 : 95 (v/v))

Analýza byla zaměřena na nalezení optimálních podmínek pro současné stanovení těchto látek v léčivém přípravku Valetol. Z důvodu velmi rozdílné retence jednotlivých látek byla dána přednost gradientovému režimu před izokratickým a výše uvedené chromatografické podmínky byly zvoleny jako nejvhodnější. Délka analýzy činila 10 minut.

d) HPLC stanovení paracetamolu, kofeinu a propyfenazonu v tabletách [27]

kolona: *Hypersil ODS (250 mm x 4.6 mm, 5 μm)*

mobilní fáze: *voda : 2-propanol : diethylamin : methanol (50 : 15 : 3 : 32 (v/v/v/v))*

upraveno kys. fosforečnou na pH 7,5

detekce: *UV 273 nm*

dávkovaný objem: *5 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *0,5 ml/min*

teplota: *laboratorní*

režim: *izokratický*

Analýza byla zaměřena na upravení a validaci HPLC metody pro stanovení těchto látek v tabletách léčivého přípravku Valetol. Délka jejího trvání byla 17 minut.

4.3.2 Kyselina askorbová

a) HILIC stanovení kyseliny askorbové [28]

kolona: *ZIC – HILIC (150 mm x 2.1 mm, 3,5 μm)*

mobilní fáze: *ACN : 50 mM pufr octanu amonného o pH 6,8 (78 : 22 (v/v))*

detekce: *UV 268 nm*

dávkovaný objem: *5 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *0,3 ml/min*

teplota: *23 °C*

režim: *izokratický*

vnitřní standard: *kyselina chlorogenová*

Práce se zabývala vyvinutím vhodné HILIC metody pro stanovení kyseliny askorbové. Analýza trvala asi 6 minut.

b) HPLC stanovení kyseliny askorbové [29]

kolona: *LiChrospher 100- RP 18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm)*

mobilní fáze: *0.2 % kyselina m-fosforečná : MeOH : ACN (90 : 8 : 2 (v/v/v))*

detekce: *UV 254 nm*

dávkovaný objem: *10 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *1,0 ml/min*

teplota: *laboratorní*

režim: *izokratický*

vnitřní standard: *kyselina nikotinová*

Práce se zabývala stanovením kyseliny askorbové v polotuhých kosmetických a farmaceutických přípravcích spolu s dalšími antioxidanty. Analýza trvala 8 minut.

4.3.3 Fenylefrin

a) Stanovení paracetamolu, fenylefrinu a kyseliny askorbové pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie [30]

Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (31,2 cm x 50 μm , 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 v 10 % methanolu. pH elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 8,2. Jako vnitřní standard byl použit methylparaben. Délka analýzy byla 10 minut.

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro stanovení a separaci těchto látek, aby se validovaná metoda dala aplikovat na LP řady Coldrex Horký nápoj.

b) Separace a stanovení paracetamolu, fenylefrinu, kofeinu a kyseliny askorbové pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie [31]

Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře (31,2 cm x 50 μm , efektivní délka 21 cm) při 20 kV. Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnových délkách 190 nm a 265 nm. Optimální základní elektrolyt měl složení: 100 mM kyselina boritá s obsahem 100 mM dodecylsíranu sodného v 10 % methanolu. pH elektrolytu bylo upraveno na hodnotu 7,8 pomocí 50 mM tetraboritanu sodného. Jako vnitřní standard byl použit methylparaben. Délka analýzy činila 10 minut.

Cílem práce bylo vypracovat elektroforetickou metodu pro separaci a stanovení zmíněných látek, aby se validovaná metoda dala aplikovat na léčivé přípravky Coldrex tablety.

c) HPLC stanovení paracetamolu, fenylefrinu, kofeinu a kyseliny askorbové [32]

kolona: *Onyx Monolithic C18 (100 mm x 4.6 mm)*

mobilní fáze: *ACN : fosforečnanový pufr pH 6,5 (10 : 90 (v/v))*

detekce: *UV 210 a 235 nm*

dávkovaný objem: *10 μl*

rychlost průtoku mobilní fáze: *1,0 ml/min*

teplota: *laboratorní*

režim: *izokratický*

vnitřní standard: *kyselina salicylová*

Cílem této práce bylo nalézt vhodné chromatografické podmínky pro stanovení těchto látek a validovanou metodu aplikovat na léčivý přípravek Coldrex tablety. Analýza trvala 5 minut.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Acetonitril, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Coldrex Horký nápoj citron, 5 sáčků, SmithKline Beecham (Madrid, Španělsko)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Merk (Darmstadt, Německo)

Fenylefrin, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan sodný, Merk (Darmstadt, Německo)

Kyselina askorbová, Fluka, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Kyselina citrónová, Penta (Chrudim, Česká republika)

Kyselina dehydroaskorbová, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Kyselina octová, Fluka, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Kyselina salicylová, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Methanol, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Paracetamol, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

P- aminofenol, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Triethylamin, Fluka, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

5.2 Použité přístroje a zařízení

5.2.1 Přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf Waters (USA):

Software Breeze (Waters, USA) - ovládací program

Waters 1525 Binary HPLC Pump - dvoupístové čerpadlo

Waters 2487 Dual λ Absorbance Detektor - spektrofotometrický detektor

Waters 717 Plus Autosampler - automatický dávkovač vzorků

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo

Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK52, Berlín, Německo

5.2.2 Chromatografické kolony

Chromolith Fast Gradient RP-18e, 50 x 2 mm, Merck (Německo)

Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, předkolona (5 x 4,6 mm), Merck (Německo)

Discovery HS PEG, 150 x 4,0 mm; 3 μ m; Supelco (USA)

LiChroCART LiChrospher RP-18e, 250 x 4 mm; 5 μ m; Merck (Německo)

Onyx Monolithic C18, 100 x 4,6 mm, Phenomenex (USA)

5.3 Příprava roztoků

5.3.1 Zásobní roztoky

Při výběru koncentrací zásobních roztoků se vycházelo z obsahu jednotlivých látek v léčivém přípravku.

Všechny zásobní roztoky byly vzhledem k velmi dobré rozpustnosti obsahových látek připraveny za použití methanolu jako vhodného rozpouštědla. Byly uchovávány v chladicím zařízení při stálé teplotě 4 °C, tyto podmínky byly dostatečné pro zachování vlastností roztoků, tudíž nedocházelo k jejich rozkladu.

Koncentrace zásobního roztoku paracetamolu byla 3,75 mg/ml. Methanolický roztok fenylefrinu měl koncentraci 50 µg/ml, roztok kyseliny askorbové 300 µg/ml a roztok kyseliny salicylové, která v měření plnila roli vnitřního standardu, také 50 µg/ml. Koncentrace obsahových látek odpovídají přípravě uvedeného léčivého přípravku rozpuštěním do 200 ml vody.

5.3.2 Směsný roztok standardů

Směsný roztok standardů byl připraven ze zásobních roztoků doplněných vodou, jejíž použití bylo nezbytné z důvodu porovnávání s reálnými vzorky, které jsou také během přípravy rozpouštěny ve vodě. Výsledný vodný roztok obsahoval paracetamol o koncentraci $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, 50 µg/ml fenylefrinu (c_f), 12 µg/ml kyseliny askorbové (c_a) a 50 µg/ml kyseliny salicylové (c_s). Koncentrace paracetamolu a kyseliny askorbové neodpovídají obsahu těchto látek v přípravku, byly 25krát zmenšeny z důvodu přesnějšího hodnocení a zviditelnění případné separace obsahových látek a rozkladného produktu v průběhu optimalizace separačních podmínek.

5.4 Příprava mobilních fází

Konečná mobilní fáze se vždy skládala ze dvou oddělených složek, které byly připraveny zvlášť a míseny až v HPLC systému.

5.4.1 Roztoky fosforečnanového pufru

Bylo naváženo 2,7231 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), toto množství bylo kvantitativně převedeno do kádinky a bylo k němu přidáno 300 ml ultračisté vody. Po rozpuštění pevné látky byl roztok zfiltrován a převeden do zásobní lahve, uchovávan v chladícím zařízení spolu se zásobními roztoky při teplotě 4 °C. Vzniklý roztok KH_2PO_4 měl koncentraci 9,078 mg/ml.

Obdobný proces byl použit k přípravě roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4). Bylo naváženo 2,3751 g Na_2HPO_4 , přidáno 200 ml ultračisté vody, zfiltrováno a uchováno za stejných podmínek. Vzniklý roztok měl koncentraci 11,876 mg/ml.

Základní fosforečnanový pufr o pH 6,50 a objemu 200 ml byl připraven v poměru 7 ml roztoku KH_2PO_4 na 3 ml roztoku Na_2HPO_4 po doplnění ultračistou vodou.

V průběhu měření bylo připraveno více variant fosforečnanového pufru o různých hodnotách pH, které budou konkretizovány u příslušných metod. Tyto pufrы vznikly smísením roztoků KH_2PO_4 a Na_2HPO_4 v různých poměrech, vždy však podle schématu: a ml roztoku KH_2PO_4 se smísí s $(10 - a)$ ml roztoku Na_2HPO_4 . Orientační hodnoty a jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1)

Tab. 1: Tlumivé roztoky

pH	a	pH	a	pH	a
5,59	9,5 ml	6,64	6,0 ml	7,38	2,0 ml
5,91	9,0 ml	6,81	5,0 ml	7,73	1,0 ml
6,24	8,0 ml	6,98	4,0 ml	8,04	0,5 ml
6,47	7,0 ml	7,17	3,0 ml		

5.4.2 TEA pufry

TEA pufry byly připraveny v průběhu měření z ultračisté vody, triethylaminu (TEA) a kyseliny octové (AA), přičemž TEA a AA byly použity pro úpravu pH pufry na požadovanou hodnotu. Tyto roztoky byly připraveny individuálně pro určité metody především proto, aby se zjistil rozdíl vlastností mobilní fáze obsahující ACN (MeOH) s fosforečnanovým pufrem o různém, dále neupravovaném pH, a mobilní fáze ACN (MeOH) s vodnou složkou o pH upraveném pomocí TEA a AA.

5.5 Optimalizace separačních podmínek

První část práce byla věnována výběru vhodných separačních podmínek pro zvolený přípravek, poté následovala druhá část, zabývající se pokusy separovat od sebe obsahové látky, pomocnou látku a rozkladný produkt, především kyselinu askorbovou od kyseliny citrónové a fenylefrin od p-aminofenolu.

5.5.1 Vlnová délka detekce

Při hledání vlnové délky vhodné pro měření bylo použito UV spekter stanovovaných látek. Nakonec byly vybrány dvě vlnové délky, při kterých se měření provádělo.

5.5.2 Výběr stacionární a mobilní fáze

Při výběru vhodné analytické kolony a mobilní fáze bylo prostudováno několik prací řešících separaci obdobných látek. Vyzkoušeny byly především separační podmínky z práce, která se zabývala HPLC stanovením obsahových látek v přípravku Coldrex tablety [32].

Uvedené podmínky separace se ale ukázaly jako nevyhovující pro přípravek Coldrex Horký nápoj z důvodů obsahu jiné pomocné látky a také potřeby zajistit separaci rozkladného produktu, který v původní práci stanovován nebyl. Proto byly během měření testovány další možnosti.

Při hledání vhodných separačních podmínek byly připraveny modelové vzorky obsahující směsný roztok standardů, ke kterému byla přidána nepatrná množství kyseliny citrónové a p-aminofenolu. Tato množství nebyla standardizována z důvodu nutnosti zjištění pouze kvalitativního hlediska. Proto mohou koncentrace těchto látek přesáhnout koncentraci v reálném vzorku.

První testovanou kolonou byla monolitická kolona Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm) s vnitřní náplní oktadecylsilikagelem. Původní mobilní fází byla směs acetonitril (ACN) : fosforečnanový pufr o pH 6,50 v poměru 10 : 90 (v/v). Další zkoušené MF byly složeny z ACN : fosforečnanový pufr o pH 6,50 v poměrech 5 : 95,

2 : 98 a 0 : 100 (v/v) a dále byl tento pufr zaměněn za TEA pufr o pH 6,49. Následující testované MF byly složeny z isopropanolu a fosforečnanového pufru v poměru 10 : 90 (v/v) a MeOH s tímto pufrům v poměru 10 : 90 (v/v). Poté byly ještě připraveny fosforečnanové pufrы o pH 5,77 a 7,49, které byly otestovány v MF ACN : pufr v poměru 10 : 90 (v/v).

Druhou testovanou kolonou byla částicová kolona Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 μ m), u které bylo zkoušeno celkem 10 mobilních fází – směsi ACN s fosf. pufrům nebo TEA pufrům v poměrech 10 : 90 (v/v). Byly použity i další fosforečnanové pufrы s pH 5,77; 6,10 a 7,49 a TEA pufrы o pH 3,50; 4,51; 5,14; 5,54 a 6,49. Nakonec byly vyzkoušeny ještě 2 mobilní fáze: samotný fosf. pufr s pH 6,10 a směs ACN : fosforečnanový pufr s pH 6,10 v poměru 20 : 80 (v/v).

Další zkoušenou kolonou se stala částicová kolona LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μ m), u které bylo testováno celkem 8 mobilních fází. Methanol : TEA pufr s pH 3,0 v poměru 35 : 65 (v/v) vystřídaly směsi MeOH a fosforečnanového pufru v obdobném poměru objemových dílů. Pufrы měly pH 5,77; 6,48; 6,52; 6,58; 6,64; 6,70 a 7,49.

Čtvrtou analytickou kolonou, která byla testována, se stala monolitní kolona Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) s předkolonou (5 x 4,6 mm), u které byla vyzkoušena mobilní fáze MeOH : fosf. pufr o pH 6,48 v poměru 35 : 65 (v/v). Poté byla za tuto kolonu přidána Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm) pro lepší celkovou separaci obsahových látek a pomocné látky, resp. rozkladného produktu. Na tomto zapojení kolon byly vyzkoušeny mobilní fáze MeOH : fosf. pufr o pH 6,48 v poměru 10 : 90 a 20 : 80 (v/v) a v poměru 20 : 80 (v/v) postupně MeOH : fosf. pufr o pH 5,77; 6,10; 6,74; 7,49.

5.5.3 Další chromatografické podmínky

V původní práci využívající separaci na monolitní koloně [32] byla použita průtoková rychlost 1 ml/min, která byla testována i v této práci při separacích na monolitních kolonách. V případě částicových kolon bylo nutné využít i nižší průtokové rychlosti – 0,3; 0,4 a 0,5 ml/min

Objem vzorku dávkovaný na kolonu byl 10 μ l, teplota laboratorní a režim složení MF isokratický.

5.6 Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj

5.6.1 Vliv teploty vody na přípravu horkého nápoje

Úkolem této části měření bylo zjistit, jaký vliv na výsledné složení nápoje má teplota vody, kterou se zalívá přípravek Coldrex Horký nápoj. V návodu na přípravu je pouze zmíněna teplá voda bez uvedení přesnější hodnoty nebo vyloučení zalití přípravku vařící vodou.

Do každé z 6 kádinek bylo odváženo 0,5 g sypké směsi určené pro přípravu horkého nápoje a postupně zalito 19 ml různě horké vody (50, 60, 70, 80, 90 a 100 °C). Přípravek byl 1 minutu za občasného promíchání rozpouštěn, poté byl do každé kádinky přidán 1 ml roztoku kyseliny salicylové jako vnitřního standardu, 10 ml výsledného roztoku bylo převedeno do centrifugační zkumavky a 5 minut centrifugováno (6000 ot./min). 1 ml získaného supernatantu byl přefiltrován do vialky.

Vařící voda byla použita jako rozpouštědlo především proto, aby byl vidět případný rozklad obsahových látek teplem a mohl být porovnán se standardy obsahových látek a jejich rozkladných produktů.

5.6.2 Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje

Do 2 centrifugačních zkumavek o objemu 10 ml bylo naváženo 0,25 g přípravku, zalito 70 °C a 80 °C teplou vodou, do obou zkumavek bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny salicylové a 5 minut centrifugováno (6000 ot./min). V časových intervalech 7 min, 20 min, 40 min, 1 hod a 2,5 hod od přidání vnitřního standardu byl ze zkumavek odebrán 1 ml vzorku, který byl přefiltrován do vialky a dávkovaný objem byl nastříknut na kolonu. Vzorek zalitý 70 °C vodou byl ponechán v laboratoři do druhého dne. Po 18 hodinách stání byl autosamplerem dávkován do chromatografu.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optimalizace separačních podmínek

6.1.1 Vlnová délka pro detekci

Vlnová délka 210 nm je vhodná pro fenylefrin, kyselinu salicylovou, kyselinu citrónovou, kyselinu dehydroaskorbovou a p-aminofenol, které vykazují při této vlnové délce ve svém spektru dostatečnou absorpční, zatímco absorpce kyseliny askorbové se v této oblasti blíží minimu. Této vlastnosti bylo využito při odlišení od jejího rozkladného produktu. Vlnová délka 265 nm byla vybrána pro zbývající obsahové látky – již zmíněnou kys. askorbovou a paracetamol.

6.1.2 Stacionární a mobilní fáze

Tab. 2: Přehled testovaných kolon

Název kolony	Vnitřní sorbent	Délka kolony	Vnitřní průměr	Výrobce kolony
Onyx Monolithic C18	oktadecylsilikagel	100 mm	4,6 mm	Phenomenex
Discovery HS PEG	částice polyethylen-glykolu o velikosti 3 μm	150 mm	4,0 mm	Supelco
LiChroCART LiChrospher RP-18e	silikagelové částice o velikosti 5 μm	250 mm	4,0 mm	Merck
Chromolith Performance RP-18e	oktadecylsilikagel	100 mm	3,0 mm	Merck
Chromolith Fast Gradient RP-18e	oktadecylsilikagel	50 mm	2,0 mm	Merck

6.1.2.1 Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm)

Monolitická kolona, která byla testována jako první, vykazovala vhodnou separaci jednotlivých látek až na kyselinu citrónovou a askorbovou, které byly eluovány ve stejném retenčním čase. Také fenylefrin měl retenční čas odpovídající času rozkladného produktu paracetamolu. Jejich separace byla nezbytná pro zjištění, zda se p-aminofenol před nebo v průběhu přípravy horkého nápoje objevuje.

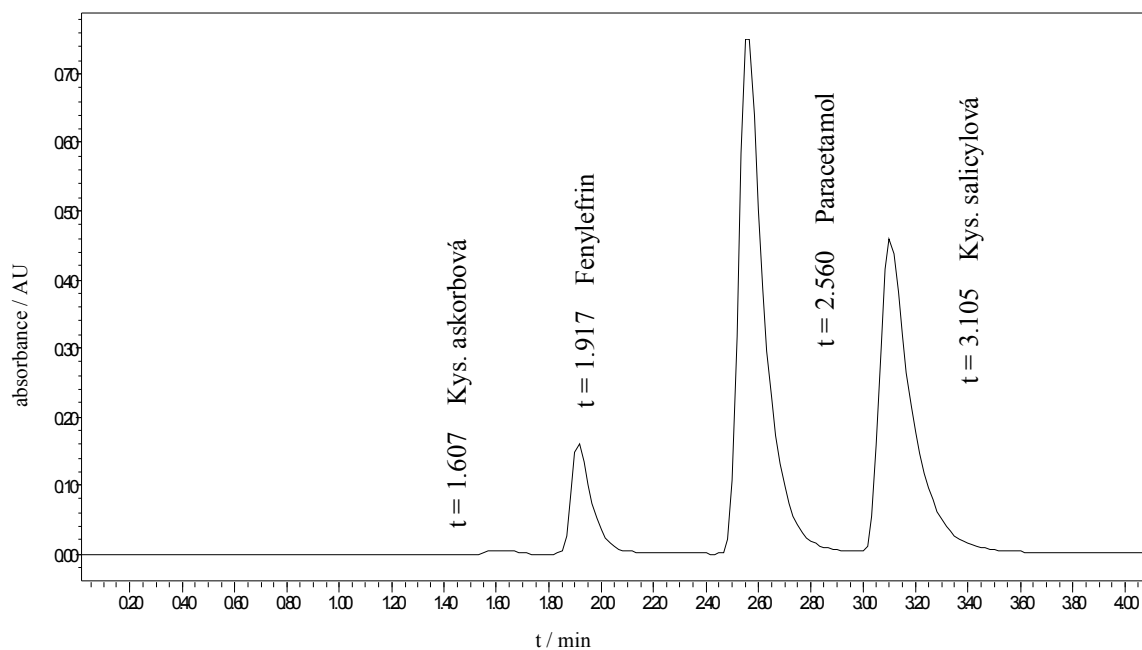
Při použití mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr s pH 6,50 v poměru 10 : 90 (v/v) se od sebe neodseparovala ani jedna dvojice výše zmíněných látek. Zvýšení poměru ve prospěch pufru vedlo pouze k přiblížení píku kys. salicylové a píku paracetamolu (poměr 5 : 95), k eluci ve stejný čas (2 : 98) a k výměně pozic píků těchto látek (0 : 100).

Testování TEA pufru o pH 6,49 vedlo k eluci kys. askorbové, kys. citrónové a fenylefrinu v podobném retenčním čase, v důsledku čehož nebyly látky plně separovány.

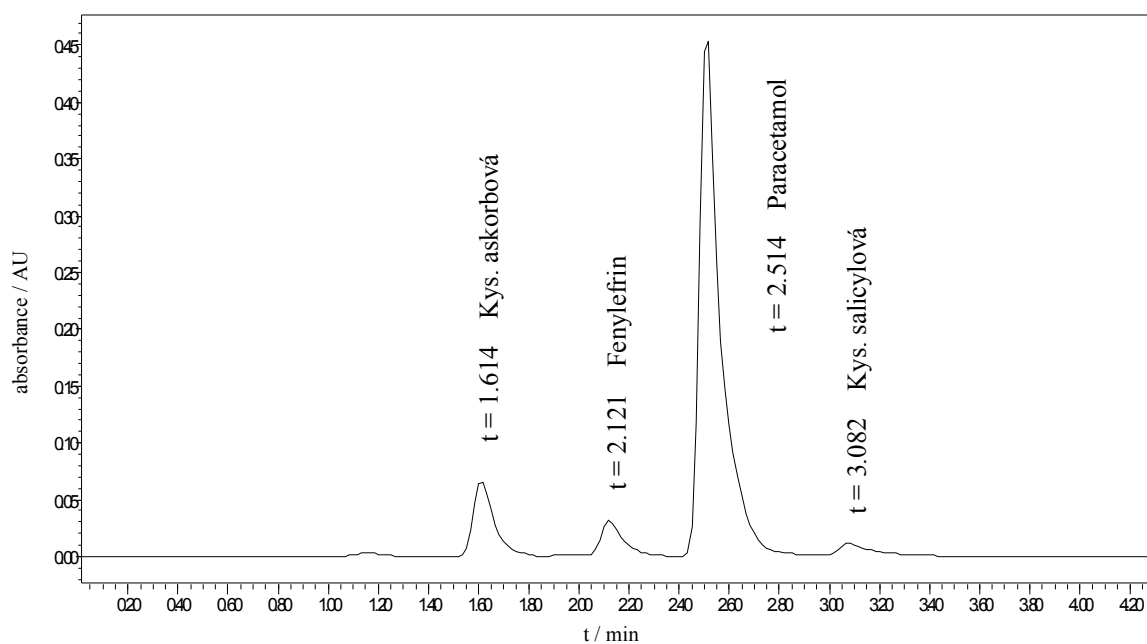
Výměna předchozí mobilní fáze za směs isopropanolu a fosf. pufru v poměru 10 : 90 (v/v) způsobila, že obsahové látky nebyly opět plně separovány.

Podobný výsledek jako u první MF se objevil u směsí MeOH : fosf. pufr v poměru 10 : 90 (v/v), ACN s fosf. pufrem tentokrát o pH 5,77 a ACN s pufrem o pH 7,49 v totožných poměrech.

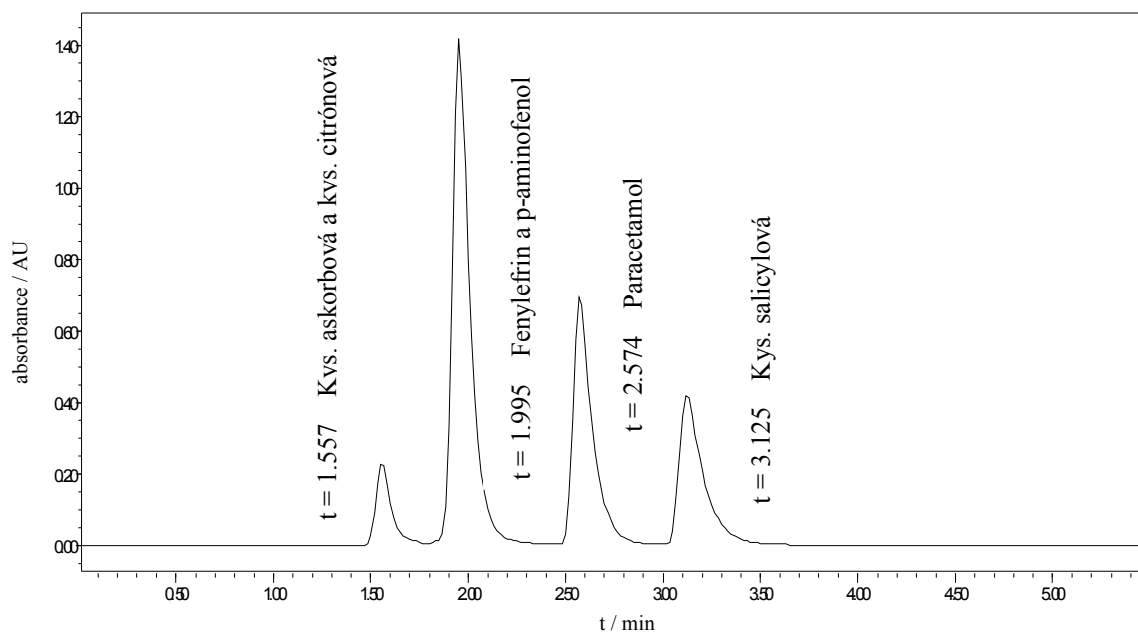
Dané problémy nevyřešilo ani vyzkoušení samotného pufru o pH 7,49. Pouze celkový čas analýzy se ztrojnásobil.



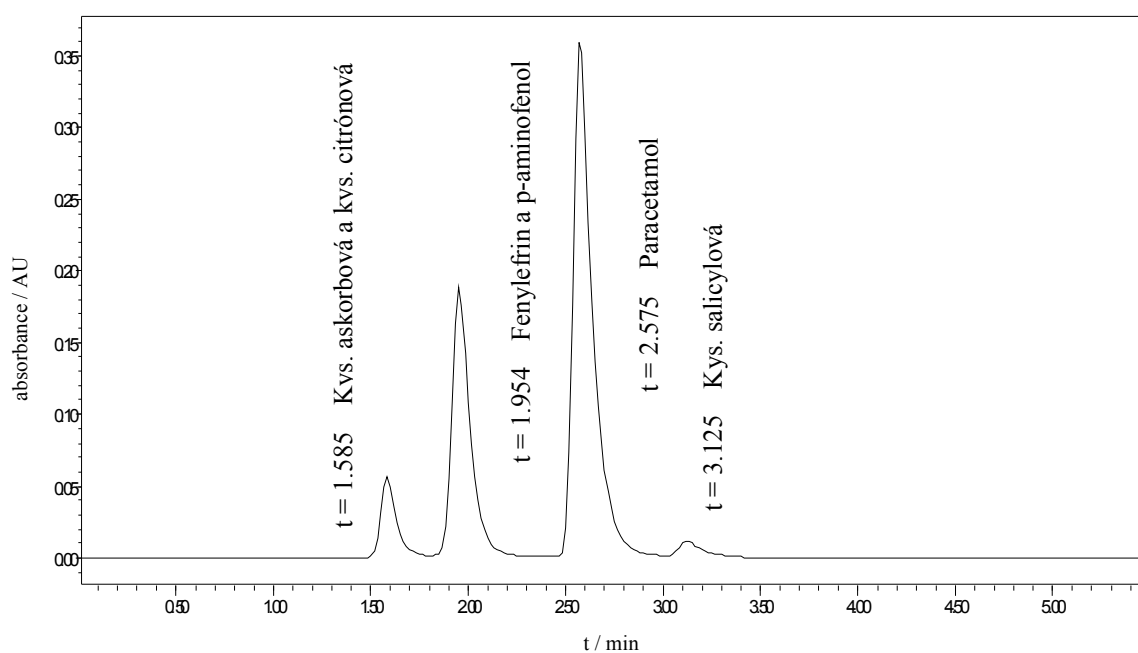
Obr. 4: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů na analytické koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 5: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů na analytické koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 265 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 6: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 7: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 265 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.

6.1.2.2 Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 μ m)

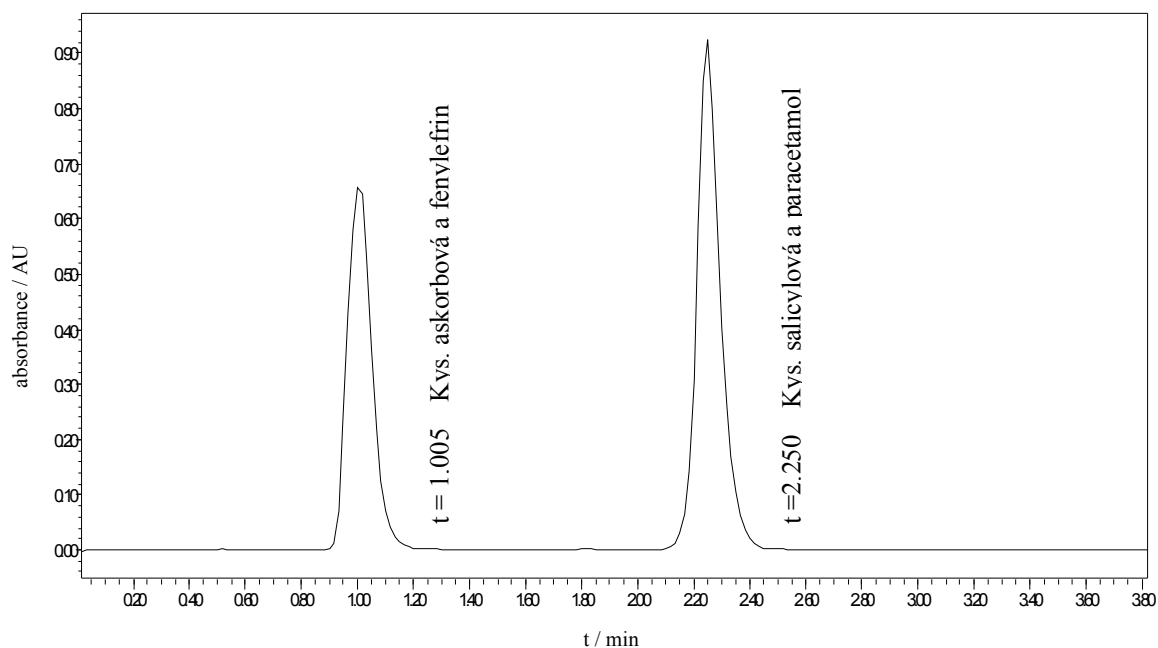
Druhou testovanou byla částicová kolona Supelco. Nejčastějším problémem při separaci látek na této koloně byl podobný retenční čas fenylefrinu a kyseliny askorbové. Také paracetamol s kyselinou salicylovou nebyl dostatečně separován.

Bylo vyzkoušeno více MF obsahujících směs acetonitrilu a TEA pufru o různém pH, pokaždé ve stejném poměru 10 : 90 (v/v). Použití mobilní fáze s vodným roztokem o nejnižším pH 3,51 vedlo k eluci kys. askorbové a fenylefrinu ve stejném čase, při snížení průtokové rychlosti z 1 ml/min na 0,5 ml/min se na chromatogramu objevil dvojitý pík. Zvyšování pH vodného roztoku mělo za následek eluování více látek v podobném retenčním čase (pH 4,51), eluci kys. askorbové s fenylefrinem a paracetamolu s kys. salicylovou ve stejném retenčním čase (pH 5,14 a pH 5,54) a konečně eluování fenylefrinu, paracetamolu a kyseliny salicylové v podobném čase (pH 6,49). Ani zmenšení průtokové rychlosti nezlepšilo celkovou separaci.

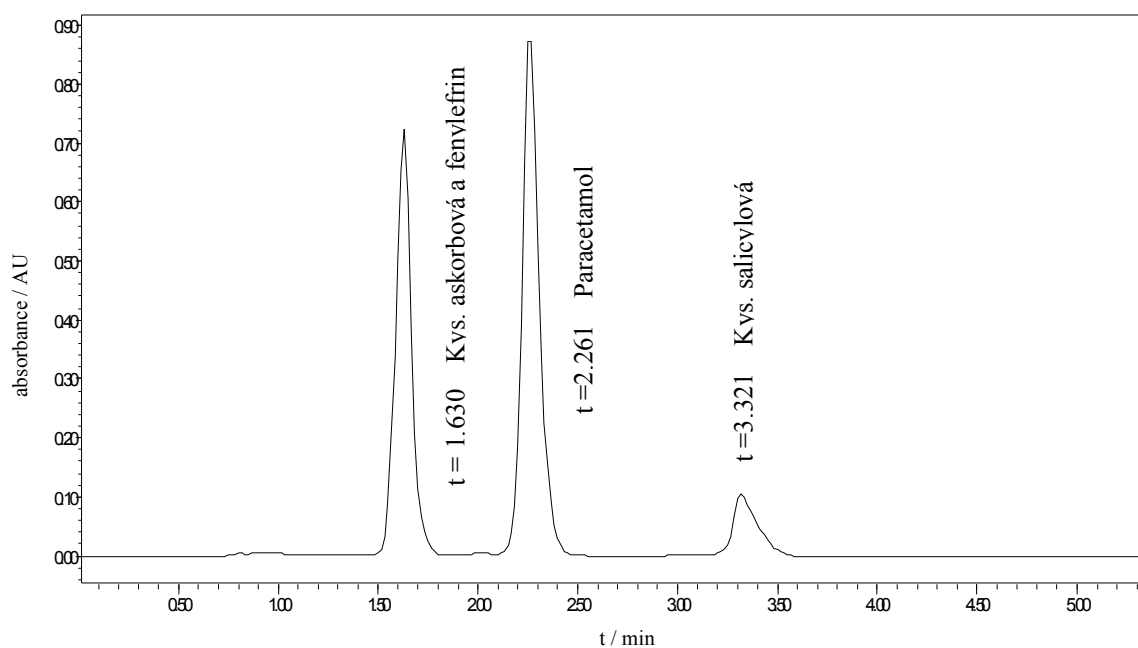
Důsledkem výměny mobilní fáze za směs ACN : fosforečnanový pufr o pH 7,49 v poměru 10 : 90 (v/v) byla eluce hlavních obsahových látek kromě kys. askorbové v podobném retenčním čase, přičemž byl chromatografický pík fenylefrinu zcela zakryt píkem paracetamolu. Snížení zásaditosti pufru na pH 6,10 zlepšilo separaci pouze do určité míry, zatímco píky silně chvostovaly. Další změna pH na hodnotu 5,77 nevedla k vylepšení stávajících výsledků.

Stejným výsledkem jako poslední zmíněná obměna mobilní fáze dopadly i směs ACN : pufr o pH 6,10 v poměru 20 : 80 (v/v) a samotný pufr (pH 6,10).

Ani jedna z testovaných mobilních fází nevyřešila problém separace pomocné látky a rozkladného produktu od obsahových látek.



Obr. 8: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů na analytické koloně Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 μ m); mobilní fáze ACN : vodný roztok o pH 4,51 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_r = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 9: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů na analytické koloně Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 μ m); mobilní fáze ACN : vodný roztok o pH 3,51 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 1,0 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_r = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.

6.1.2.3 LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm)

Částicová kolona společnosti Merck byla třetí zkoušenou analytickou kolonou. Jelikož dříve používaný acetonitril doposud nepřispíval potřebnou měrou k vhodné separaci obsahových látek a pomocné látky, resp. rozkladného produktu u přípravku Coldrex Horký nápoj, byl vyměněn za další základní chromatografické rozpouštědlo methanol.

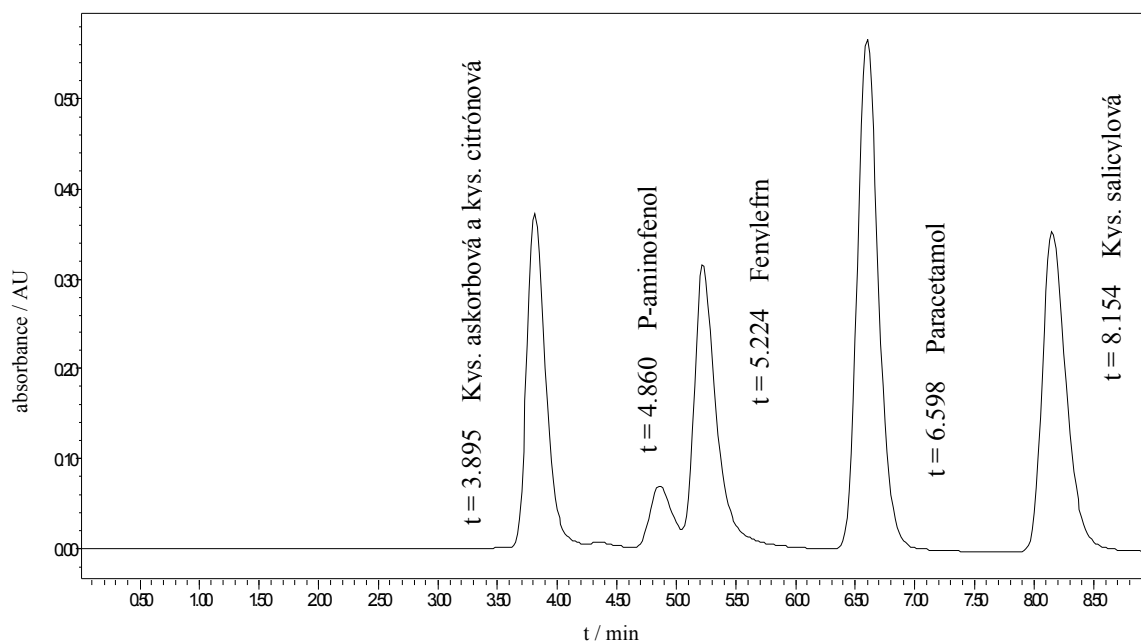
Ukázalo se, že je ve zvolených podmínkách fenylefrin a rozkladný produkt paracetamolu p-aminofenol eluován v podobném retenčním čase. Sérií testů, během kterých se měnilo pouze pH fosforečnanového pufru - vodné součásti mobilní fáze, bylo zjištěno, že tyto dvě látky od sebe lze alespoň částečně odseparovat.

První testovanou mobilní fází byla směs methanolu a TEA pufru o pH 3,0 v poměru 35 : 65 (v/v). Toto prostředí se ukázalo jako nevhodné pro separaci kyseliny askorbové a citrónové.

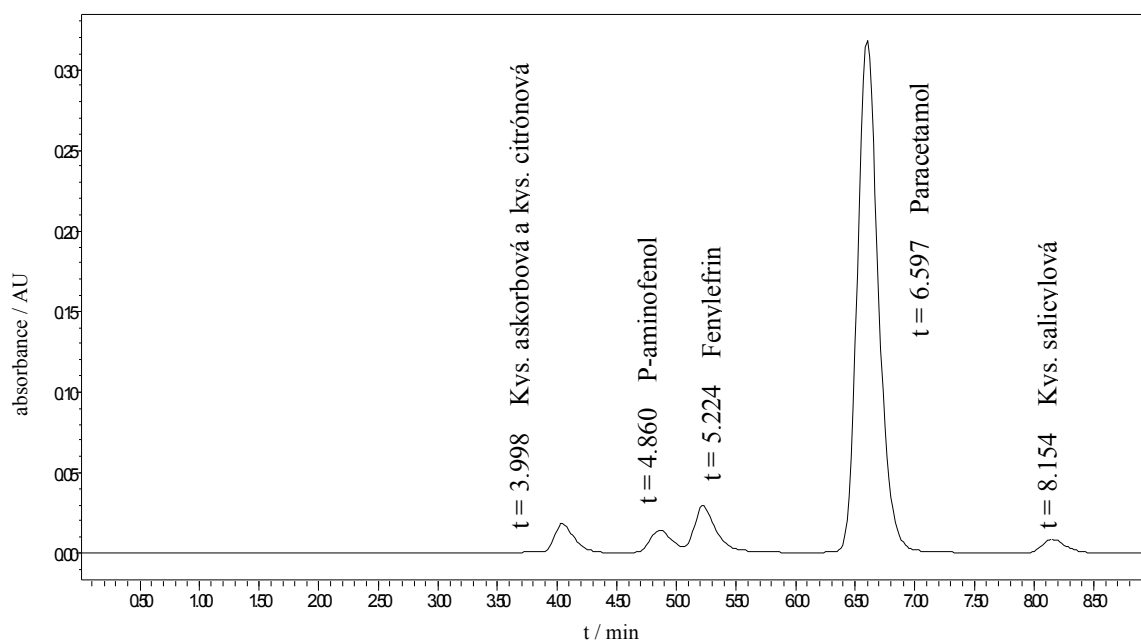
Po tomto výsledku byl TEA pufr vyměněn za fosforečnanový pufr o pH 5,77, poměr komponentů mobilní fáze zůstal stejný. Důsledkem této změny byla eluce všech hlavních obsahových látek v různých retenčních časech, avšak v chromatogramu se neobjevil samostatný pík ani kyseliny citrónové, ani p-aminofenolu. K částečnému oddělení píku p-aminofenolu a fenylefrinu vedla až výměna mobilní fáze za směs s pufrům o pH 6,52. Zvýšení pH pufru na hodnotu 7,49 vyústilo opět v eluci těchto dvou látek ve stejném čase.

Po těchto testech byla snaha objevit přesnou hodnotu pH fosforečnanového pufru, při které by došlo k úplné separaci výše zmíněných látek. Byly vyzkoušeny pufrы o pH 6,48; 6,58; 6,64 a 6,70, ale žádná z těchto mobilních fází nevedla k zlepšení výsledné separace.

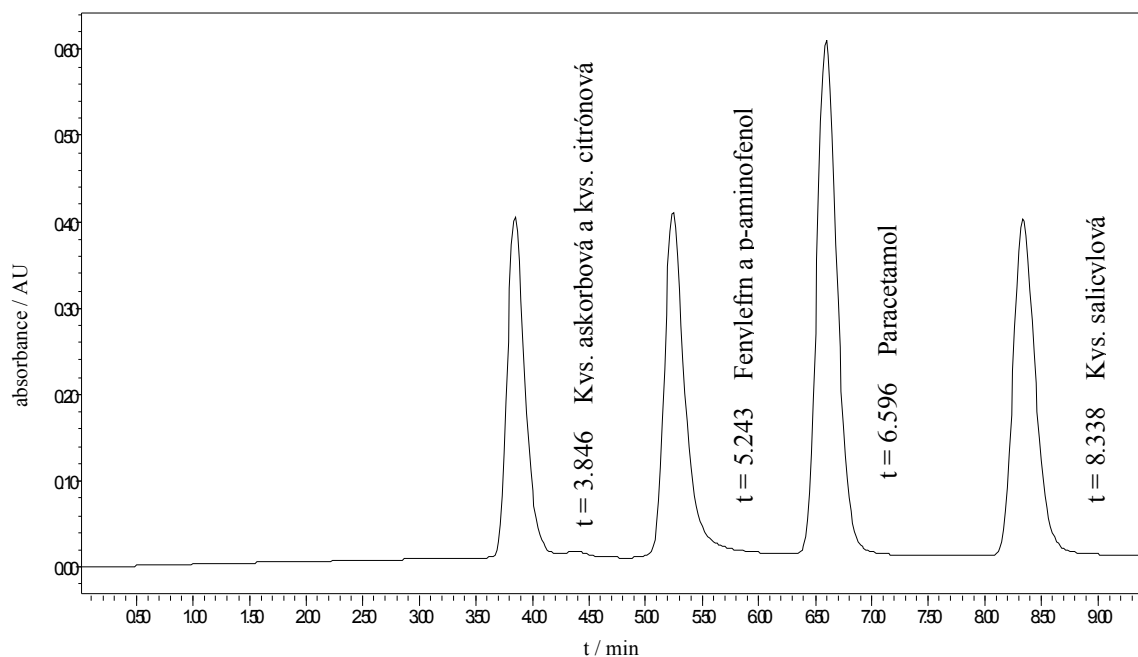
Tato kolona byla nakonec vybrána pro další měření, protože prokázala nejlepší separační vlastnosti pro léčivý přípravek. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla zvolena směs methanolu a fosforečnanového pufru o pH 6,52, ačkoliv k plné separaci jednotlivých látek nedošlo.



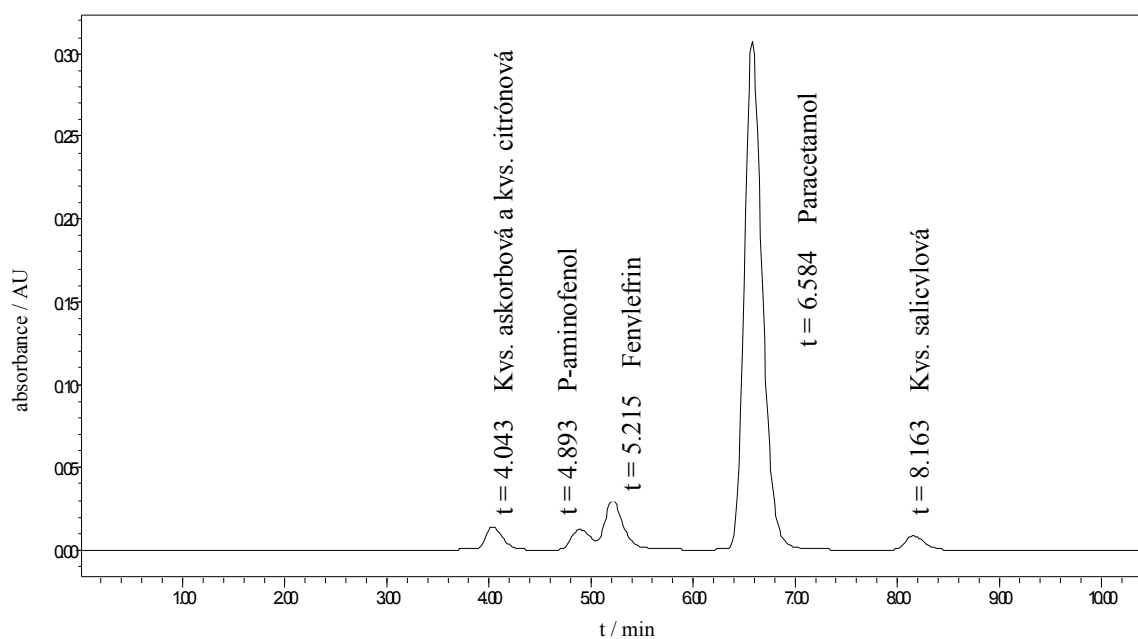
Obr. 10: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 10,0 µl; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_r = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 11: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 10,0 µl; UV detekce při 265 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_r = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 12: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μ m); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 7,49 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřík o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



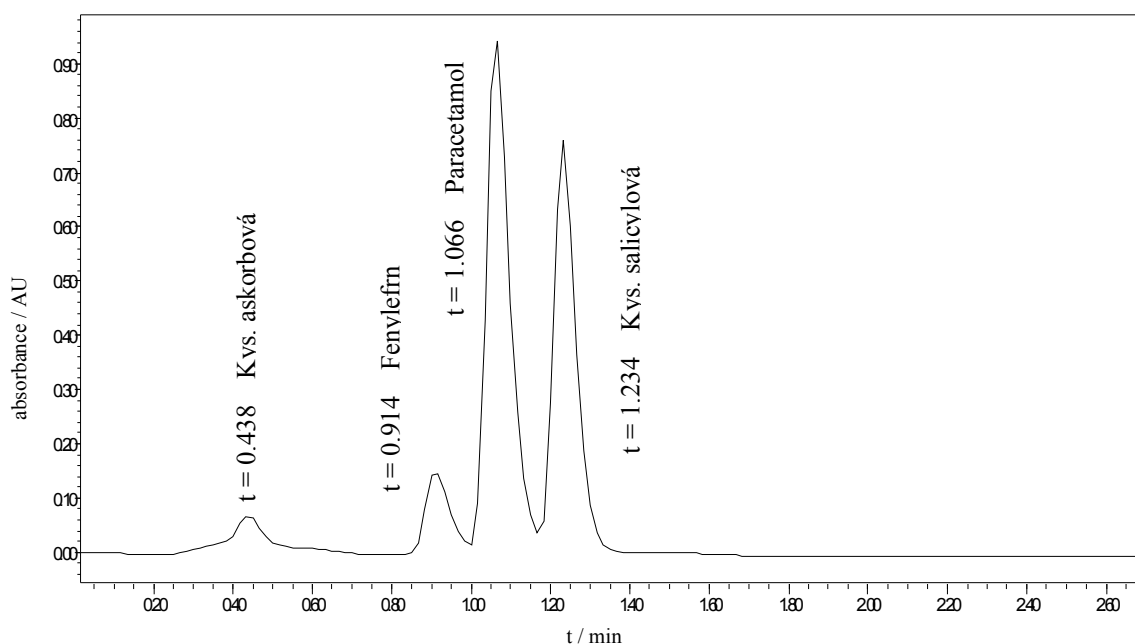
Obr. 13: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μ m); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,70 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřík o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 265 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.

6.1.2.4 Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm)

Předposlední testovanou byla monolitická kolona ze skupiny Chromolith s předkolumnou (5 x 4,6 mm). Na této analytické koloně byla vyzkoušena mobilní fáze úspěšná z předchozího měření – methanol : fosforečnanový pufr s pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v).

Výsledkem bylo objevení mírně chvostujících píků na chromatogramu. Přídavek kyseliny citrónové a p-aminofenolu ke směsnému roztoku standardů z tohoto měření způsobil eluci látek ve velmi podobném retenčním čase.

Ukázalo se tudíž, že toto prostředí není pro kolonu vhodné. Zvýšený tlak na koloně a špatná separační schopnost za daných podmínek způsobila, že bylo upuštěno od hledání ideálních podmínek pro tuto kolonu.



Obr. 14: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů na analytické koloně Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 1 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.

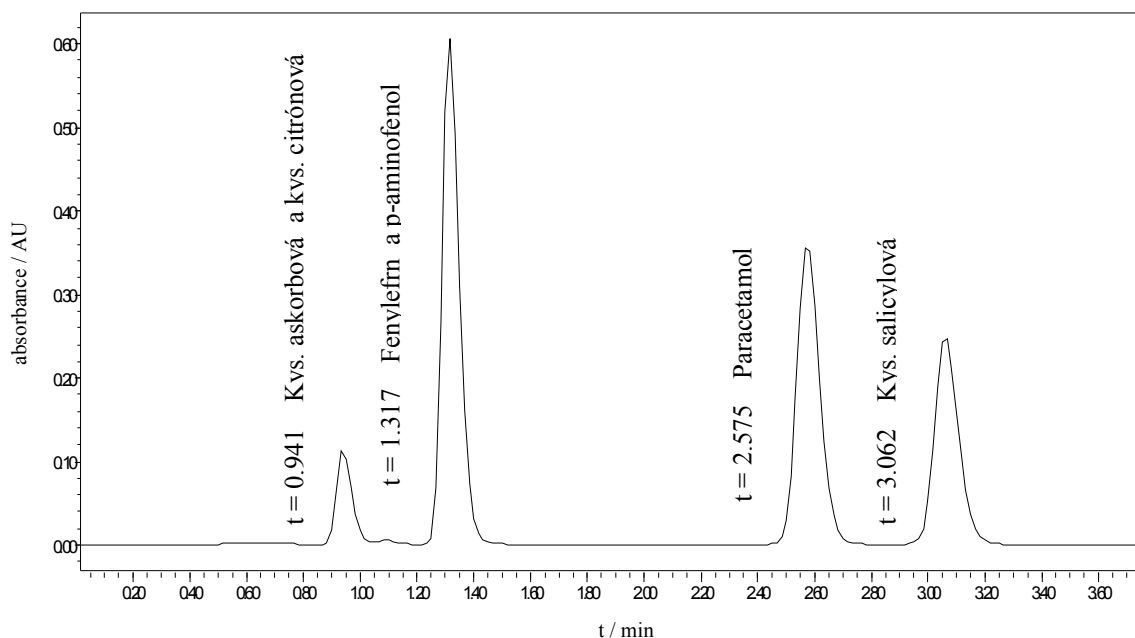
6.1.2.5 Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm)

Pro zvýšení separační schopnosti předchozí kolony byla po jejím neúspěšném testování za ní přidána monolitní kolona Fast Gradient. Separace v daném prostředí tímto krokem však nebyla příliš ovlivněna, na chromatogramu se stále objevoval trojitý až čtverý pík eluovaných látek. Bylo tedy nutné pozměnit poměr složek mobilní fáze.

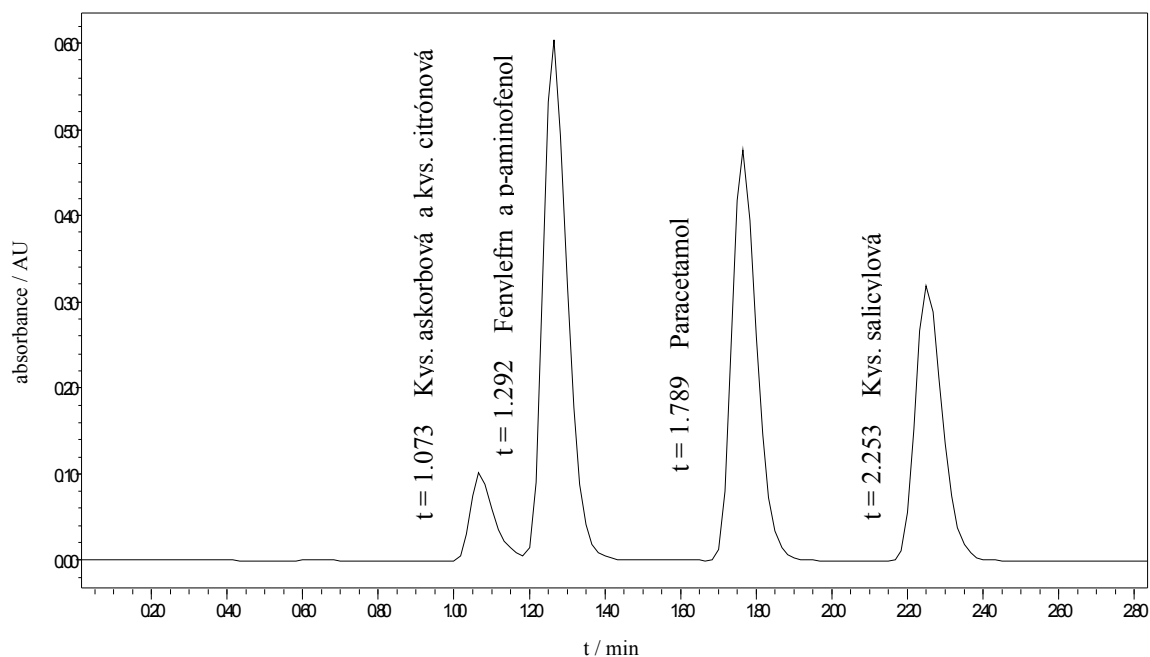
Byl vyzkoušen methanol : fosforečnanový pufr v poměru 10 : 90 (v/v). Celkový retenční čas se zdvojnásobil, ale separace jednotlivých látek se výrazně zlepšila. Problémem ovšem zůstala eluce pomocné látky a rozkladného produktu. Po jejich přidání ke směsnému roztoku standardů se kyselina citrónová eluovala ve stejném retenčním čase jako kyselina askorbová a eluční čas p-aminofenolu odpovídal retenčnímu času fenylefrinu.

Poměr složek mobilní fáze byl poté upraven z 10 : 90 na 20 : 80 (v/v). Tato změna snížila celkový čas eluce látek. Problém s oddělením látek však přetrvával.

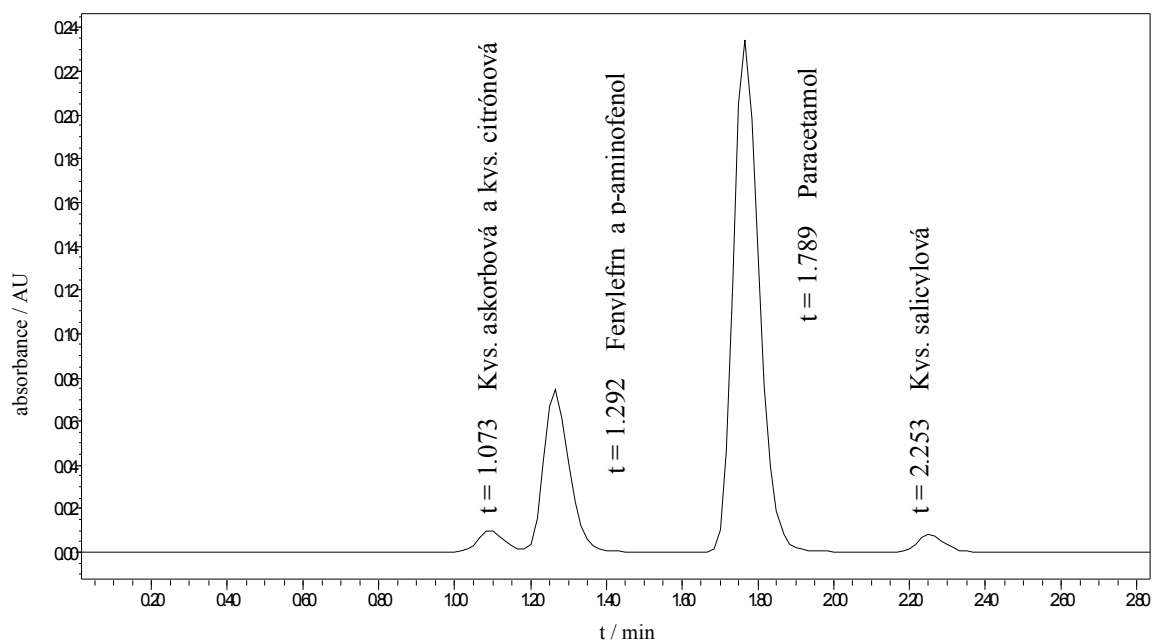
Z tohoto důvodu byl fosforečnanový pufr o pH 6,52 v mobilní fázi postupně vyměňován za pufr o pH 5,77; 6,10; 6,74 a 7,49. Ani tyto změny však nevedly k vylepšení stávajícího problému.



Obr. 15: Chromatogram eluce směsného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na spojených kolonách Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) a Chromolith Fast Gradient RP-18e (100 x 3 mm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 10 : 90 (v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 16: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na spojených kolonách Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) a Chromolith Fast Gradient RP-18e (100 x 3 mm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 20 : 80 (v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 210 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 17: Chromatogram eluce směšného roztoku standardů s přidavkem kyseliny citrónové a p-aminofenolu na spojených kolonách Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) a Chromolith Fast Gradient RP-18e (100 x 3 mm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 5,77 v poměru 20 : 80 (v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μ l; UV detekce při 265 nm; koncentrace obsahových látek : $c_p = 150 \mu\text{g/ml}$, $c_f = 50 \mu\text{g/ml}$, $c_a = 12 \mu\text{g/ml}$ a $c_s = 50 \mu\text{g/ml}$.

6.1.3 Průtoková rychlost

V průběhu měření byla průtoková rychlost mobilních fází postupně upravována a měněna s ohledem na typ analytických kolon.

K vybrané koloně byla zvolena vhodná rychlost 0,5 ml/min, při které má kolona nejlepší separační schopnosti a je splněn i požadavek na délku trvání analýzy.

6.1.4 Souhrn zvolených chromatografických podmínek

Vlnová délka detekce:

210 a 265 nm

Analytická kolona:

LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm); Merck (Německo)

Mobilní fáze:

Methanol : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v)

Průtoková rychlost mobilní fáze:

0,5 ml/min

Dávkovaný objem:

10 µl

Režim:

izokratický

Teplota:

laboratorní

6.2 Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj

6.2.1 Vliv teploty na složení horkého nápoje

Při měření roztoků připravených rozpuštěním v různě teplé vodě byly vyhodnoceny obsahy jednotlivých látek přípravku Coldrex Horký nápoj. Z ploch získaných chromatografických píků byly vypočítány obsahy jednotlivých hlavních látek vztažené na plochu píku vnitřního standardu.

Výpočet obsahu: Plochy píků ve standardu upravené poměrem plochy vnitřního standardu odpovídají hodnotě 100 % a naměřené hodnoty ze vzorku se dopočítávají podle vzorce: $\text{Obsah (\%)} = 100 \cdot A_i/A_o$, kde A_i je plocha píku získaná analýzou vzorku, A_o je plocha píku získaná analýzou standardu. Takto vypočítané obsahy látek jsou uváděny v jednotkách *mg*, v závorce jsou uvedeny procentuální obsahy vztažené na množství účinných látek deklarované výrobcem (tyto hodnoty v % jsou pouze orientační, protože nebylo provedeno stanovení jednotlivých látek v použitém přípravku).

6.2.1.1 Postup přípravy měření

Jak bylo dříve uvedeno, do 6 kádinek byl postupně navážen přípravek, zalit vodou o různé teplotě (50 °C - 100 °C) a rozpouštěn. Po rozpouštění vzorku byl do každé kádinky přidán 1 ml roztoku vnitřního standardu připraveného před tímto testováním. Zmíněný roztok měl koncentraci 1 mg/ml, z důvodu zachování koncentrace kyseliny salicylové ve vzniklé směsi na hodnotě 0,05 mg/ml. Vzniklé roztoky byly centrifugovány, 1ml z každé zkumavky byl přefiltrován do vialky. Vzhledem k velké koncentraci paracetamolu a kyseliny askorbové bylo z vialek převedeno 40 μ l do nových a přidáno 960 μ l roztoku vnitřního standardu. Tímto krokem byla koncentrace obsahových látek snížena 25krát, koncentrace vnitřního standardu však zůstala zachována. Na chromatogramu se objevil podstatně menší pík paracetamolu, jehož obsah mohl být vyhodnocen.

6.2.1.2 Výsledky měření

Obsah jednotlivých látek je uváděn ve dvou jednotkách. Hodnoty v *mg* byly získány porovnáním se směsným standardem, jehož složení odpovídalo složení účinných látek ve vzorku. Hodnoty uváděné v procentech jsou vztaženy na obsah jednotlivých látek deklarovaný výrobcem. Nebylo provedeno stanovení obsažených látek v přípravku, proto není možné tyto procentuální hodnoty porovnávat s lékopisnými požadavky pro obsah jednotlivých látek, slouží pouze pro vyjádření změny obsahu látek při různých teplotách vody, kterou se přípravek rozpouštěl.

- teplota vody 50 °C: Získaná data z těchto testů ukázala, že roztok vzniklý zalitím léčivého přípravku vodou o teplotě 50 °C obsahoval 8,96 mg fenylefrinu (89,57 %), 55,87 mg kyseliny askorbové (93,12 %) a 649,93 mg paracetamolu (86,66 %).

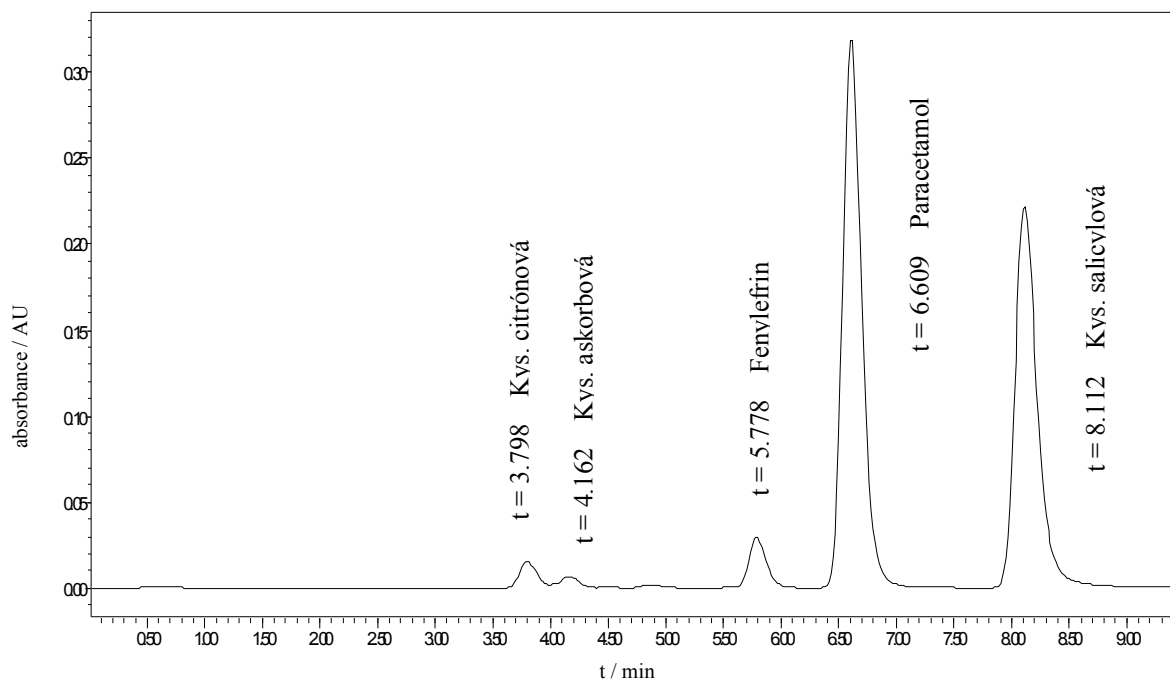
- teplota vody 60 °C: Při použití vody o teplotě 60 °C se obsah látek ve výsledném roztoku zvýšil na 9,48 mg fenylefrinu (94,78 %), 58,35 mg kyseliny askorbové (97,25 %) a 670,24 mg paracetamolu (89,33 %).

- teplota vody 70 °C: Příprava LP při použití vody o teplotě 70 °C se ukázala jako nejvýhodnější, obsah látek činil 10,03 mg u fenylefrinu (100,30 %), 63,43 mg u kys. askorbové (105,71 %) a 715,89 mg u paracetamolu (95,45 %).

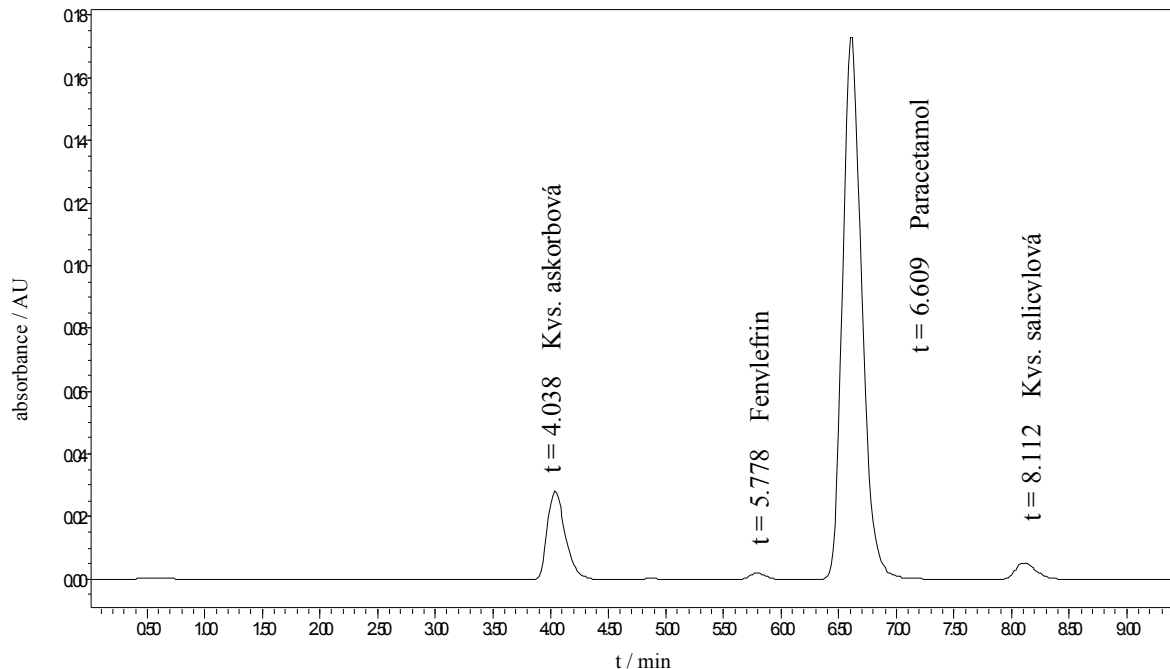
- teplota vody 80 °C: Zalitím přípravku vodou s teplotou 80 °C vznikl roztok obsahující 9,76 mg fenylefrinu (97,62 %), 61,74 mg kyseliny askorbové (102,90 %) a 691,70 mg paracetamolu (92,13 %).

- teplota vody 90 °C: Při použití vody o teplotě 90 °C k rozpuštění LP byl obsah jednotlivých látek: 8,98 mg fenylefrinu (89,75 %), 56,95 mg kyseliny askorbové (94,92 %) a 621,53 mg paracetamolu (82,87 %).

- teplota vody 100 °C: Léčivý přípravek byl také zalit vroucí vodou, aby mohl být zjištěn případný rozklad obsahových látek. Obsah kyseliny askorbové byl menší než v předcházejících zkouškách, což mohlo být způsobeno především rozkladem látky. Rozkladným produktem této obsahové látky je kyselina dehydroaskorbová, která neabsorbuje při 265 nm, ale objevuje se při 210 nm. Za daných chromatografických podmínek látka eluuje v retenčním čase odpovídajícímu retenčnímu času kyseliny citrónové, která ji svým píkem plně zakrývá. Rozklad dalších obsahových látek léčivého přípravku - fenylefrinu a paracetamolu při tomto testování nebyl patrný.



Obr. 18: Chromatogram eluce vzorku Coldrex Horký nápoj zalitého vodou o teplotě 80 °C na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μl; UV detekce při 210 nm.

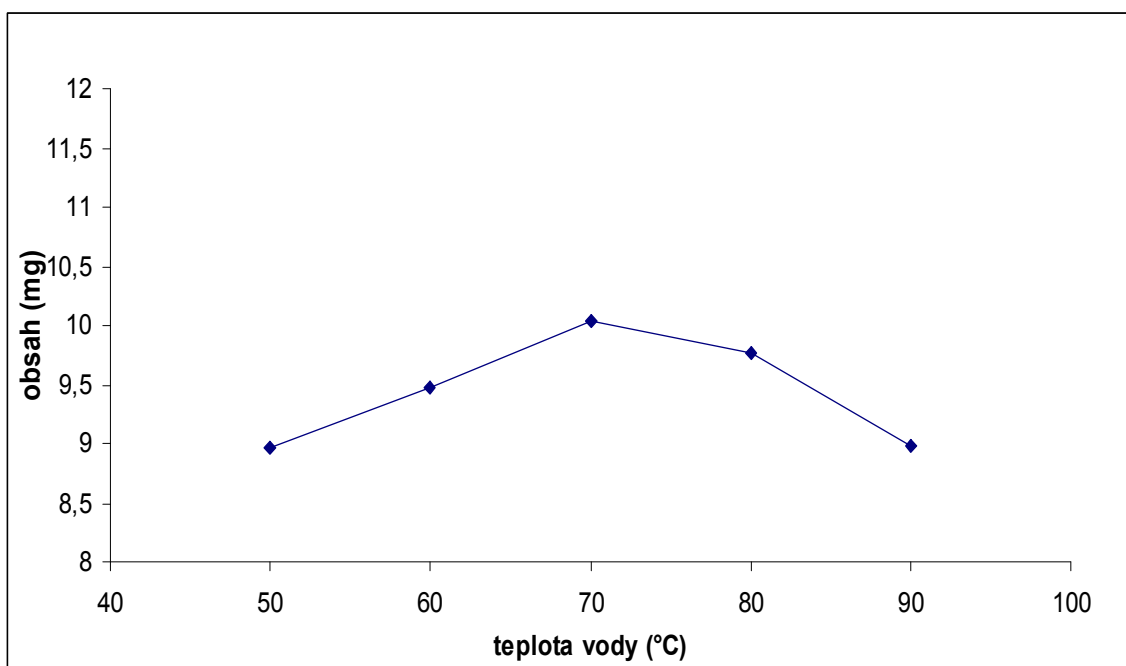


Obr. 19: Chromatogram eluce vzorku Coldrex Horký nápoj zalitého vodou o teplotě 80 °C na analytické koloně LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μm); mobilní fáze MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 10,0 μl; UV detekce při 265 nm.

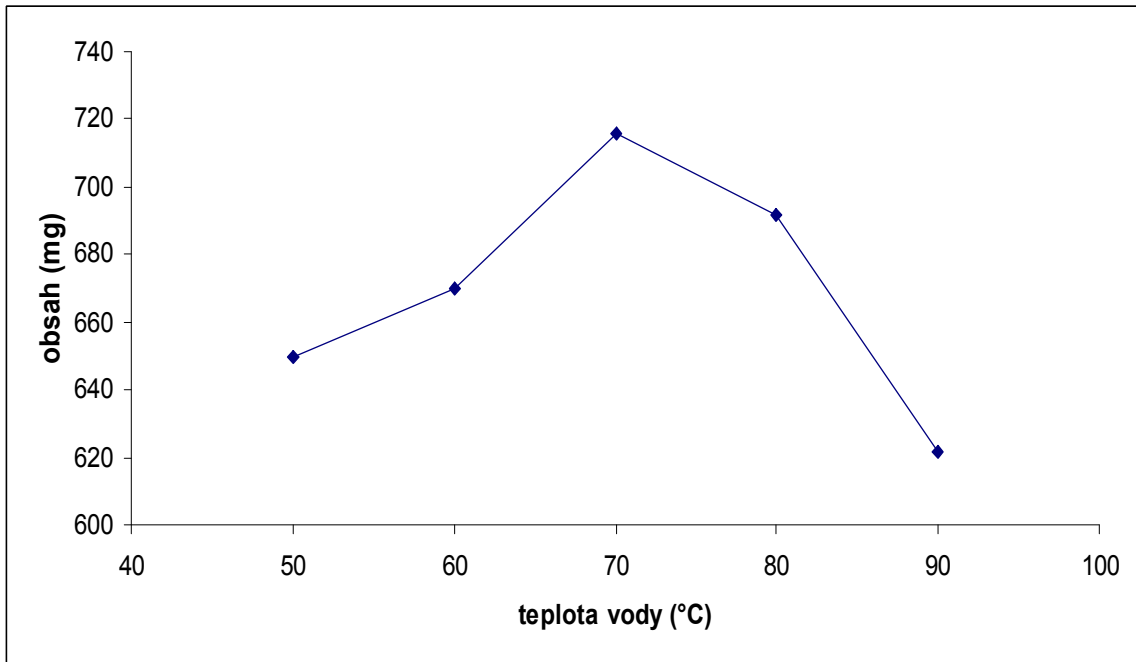
Tab. 3: Souhrn výsledků vlivu teploty na obsah látek v přípravku Coldrex Horký nápoj

	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
fenylefrin	8,96 mg	9,48 mg	10,03 mg	9,76 mg	8,98 mg
kys. askorbová	55,87 mg	58,35 mg	63,43 mg	61,74 mg	56,95 mg
paracetamol	649,93 mg	670,24 mg	715,89 mg	691,70 mg	621,53 mg

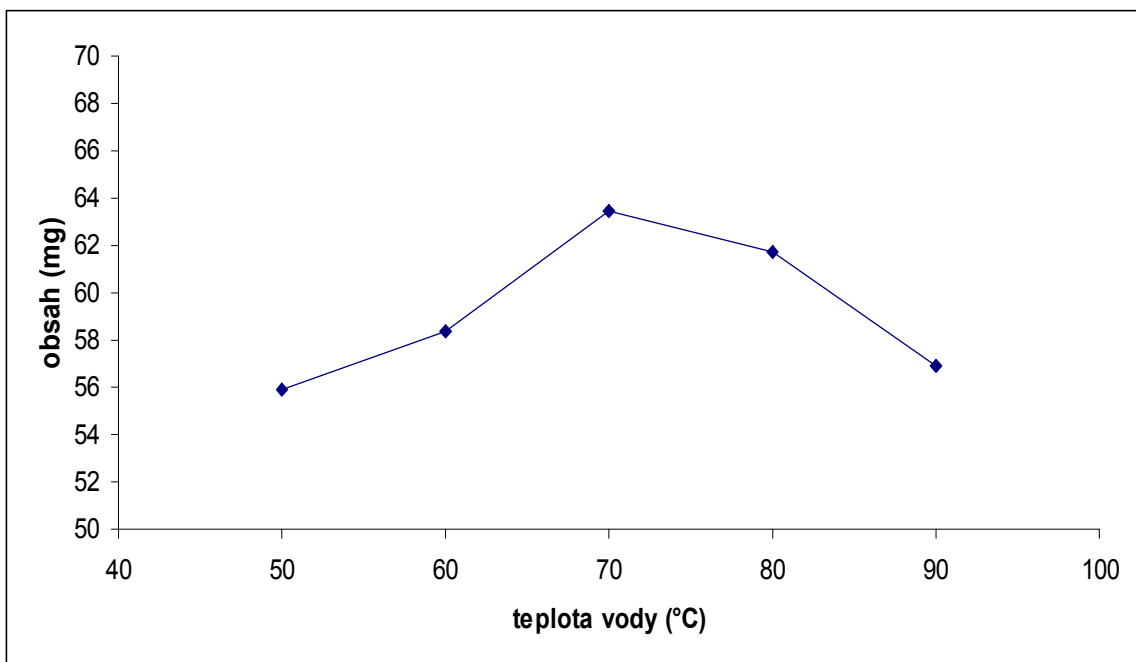
Graf 1: Vliv teploty vody na obsah účinné látky fenylefrinu



Graf 2: Vliv teploty vody na obsah účinné látky paracetamolu



Graf 3: Vliv teploty vody na obsah účinné látky kyseliny askorbové



6.2.2 Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje

Úkolem této části měření bylo zjistit stabilitu roztoku léčivého přípravku v časovém horizontu, čímž by se měl projevit vliv delšího časového intervalu mezi přípravou a konzumací léčivého přípravku na obsah účinných látek.

Z předchozího měření byly vybrány dvě teploty vody, kterými se Coldrex Horký nápoj zaléval, pro jejich schopnost vytvořit roztok LP s největší koncentrací obsahových látek.

6.2.2.1 Postup přípravy měření

Podle postupu uvedeného v kapitole Experimentální část byly připraveny vzorky přípravku. Kvůli koncentraci obsahových látek byl opakován proces ředění roztoku. Oba typy vzorku – neupravený i upravený – byly autosamplerem dávkovány do chromatografu.

6.2.2.2 Výsledky měření

- teplota vody 70 °C:

a) vzorek odebraný po 7 minutách od přidání roztoku vnitřního standardu obsahoval 9,89 mg fenylefrinu (98,93 %), 63,36 mg kys. askorbové (105,59 %) a 710,54 mg paracetamolu (94,74 %).

b) po 20 minutách bylo v léčivém přípravku 8,95 mg fenylefrinu (89,46 %), 57,69 mg kyseliny askorbové (96,14 %) a 645,39 mg paracetamolu (86,05 %).

c) po 40 minutách a dalším úbytku látek obsahoval LP 7,83 mg fenylefrinu (78,32 %), 50,45 mg kys. askorbové (84,07 %) a 573,49 mg paracetamolu (76,46 %).

d) po 1 hodině stání se obsah látek snížil na 6,85 mg fenylefrinu (68,50 %), 45,28 mg kys. askorbové (75,46 %) a 482,82 mg paracetamolu (64,37 %).

e) ve vzorku odebraném po 2,5 hodiny bylo 4,04 mg fenylefrinu (40,44 %), 39,87 mg kys. askorbové (66,44 %) a 369,38 mg paracetamolu (49,25 %).

f) po 18 hodinách stání činil obsah látek pouze 3,78 mg fenylefrinu (37,84 %), 36,54 mg kyseliny askorbové (60,89 %) a 254,68 mg paracetamolu (33,96 %).

- teplota vody 80 °C:

a) vzorek odebraný po 7 minutách obsahoval 9,74 mg fenylefrinu (97,39 %), 60,44 mg kys. askorbové (100,73 %) a 675,26 mg paracetamolu (89,94 %).

b) po 20 minutách se obsah látek snížil na 9,13 mg fenylefrinu (91,31 %), 54,39 mg kyseliny askorbové (90,65 %) a 602,16 mg paracetamolu (80,24 %).

c) po 40 minutách obsahoval odebraný vzorek 8,14 mg fenylefrinu (81,42 %), 47,61 mg kys. askorbové (79,34 %) a 539,35 mg paracetamolu (71,84 %).

d) obsah látek v LP po 1 hodině stání klesl na 6,46 mg fenylefrinu (64,57 %), 42,04 mg kys. askorbové (70,07 %) a 461,66 mg paracetamolu (61,49 %).

e) vzorek odebraný po 2,5 hodině obsahoval 4,16 mg fenylefrinu (41,63 %), 36,55 mg kys. askorbové (60,90 %) a 394,11 mg paracetamolu (52,49 %).

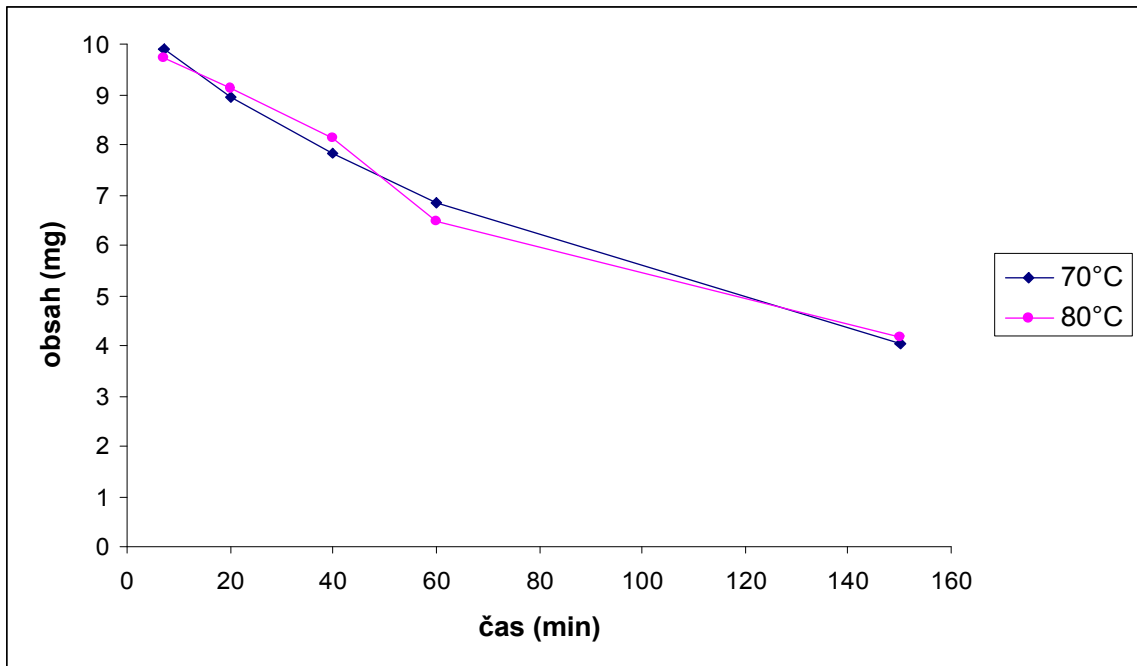
Tab. 4: Souhrn výsledků vlivu časového intervalu při použití vody o teplotě 70 °C

70 °C	7 minut	20 minut	40 minut	1 hodina	2,5 hod.	18 hod.
fenylefrin	9,89 mg	8,95 mg	7,83 mg	6,85 mg	4,04 mg	3,78 mg
kys. askorbová	63,36 mg	57,69 mg	50,45 mg	45,28 mg	39,87 mg	36,54 mg
paracetamol	710,54 mg	645,39 mg	573,49 mg	482,82 mg	369,38 mg	254,68 mg

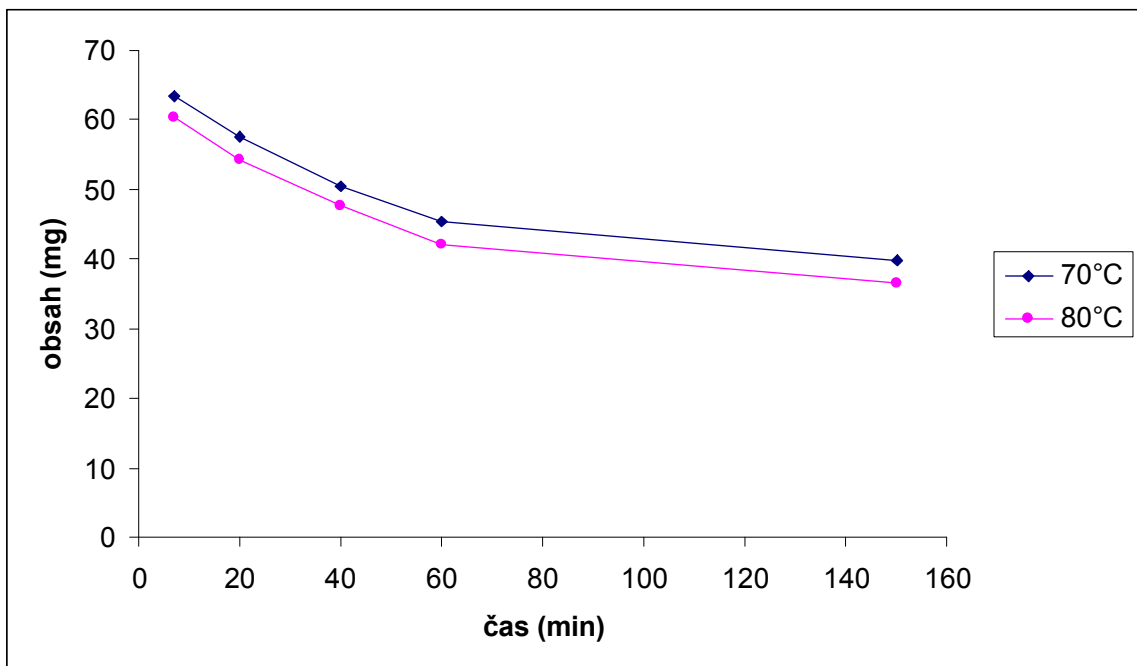
Tab. 5: Souhrn výsledků vlivu časového intervalu při použití vody o teplotě 80 °C

80 °C	7 minut	20 minut	40 minut	1 hodina	2,5 hod.
fenylefrin	9,74 mg	9,13 mg	8,14 mg	6,46 mg	4,16 mg
kys. askorbová	60,44 mg	54,39 mg	47,61 mg	42,04 mg	36,55 mg
paracetamol	675,26 mg	602,16 mg	539,35 mg	461,66 mg	394,11 mg

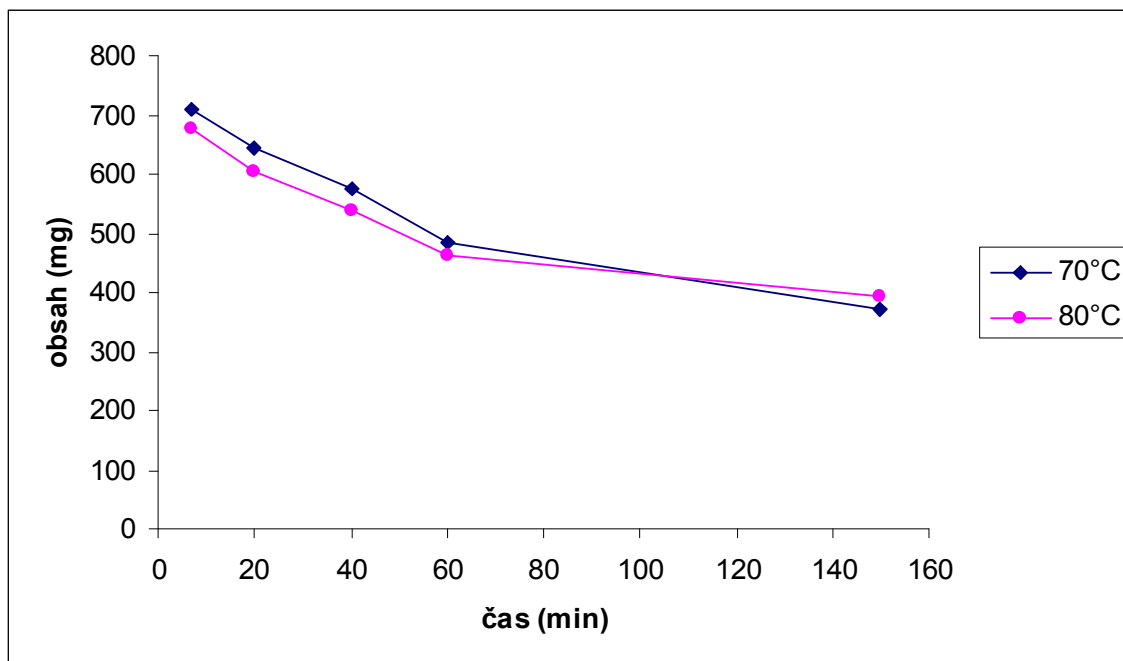
Graf 4: Vliv časového intervalu na obsah účinné látky fenylefrinu



Graf 5: Vliv časového intervalu na obsah účinné látky kyseliny askorbové



Graf 6: Vliv časového intervalu na obsah účinné látky paracetamolu



6.2.3 Souhrn poznatků získaných z měření

Během testování vlivu teploty vody použité k přípravě Coldrexu Horkého nápoje bylo zjištěno, že získání nejvyšší koncentrace obsahových látek v roztoku umožňuje a tudíž nejvhodnější k přípravě je voda o teplotě 70 °C.

Při zkoumání stability roztoku léčivého přípravku bylo zjištěno, že hodnoty koncentrace obsahových látek po sedmi minutách od přidání vnitřního standardu mírně poklesly ve srovnání s hodnotami obsahu látek deklarovanými výrobcem. Po 20 minutách stání se stabilita roztoku zhoršuje a úbytek obsahu látek činí okolo 5 % každých následujících deset minut. Po hodinovém stání při pokojové teplotě se úbytek látek zpomaluje.

7. SOUHRN

7.1 **Optimalizace separačních podmínek**

Byly vybrány dvě vlnové délky, které se ukázaly být nejvhodnějšími pro stanovení vybraných látek. Vlnová délka 210 nm, vyhovující fenylefrinu, kyselině salicylové, kyselině citrónové a p-aminofenolu, byla vhodná také kvůli odlišení kyseliny askorbové, jejíž spektrum se v uvedené oblasti blíží absorpčnímu minimu, a jejího rozkladného produktu kyseliny dehydroaskorbové, která při této délce dostatečně absorbuje. Délka 265 nm byla vhodná pro kys. askorbovou a paracetamol.

Bylo testováno pět kolon, u každé bylo testováno různé složení mobilní fáze a různé průtokové rychlosti dle vlastností kolon.

První testovanou kolonou byla kolona Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm). Nejlepšími podmínkami se ukázaly mobilní fáze ACN : fosforečnanový pufr s pH 6,50 v poměru 10 : 90 (v/v), rychlost průtoku MF činila 1 ml/min. Během testování nedošlo k separaci kyseliny citrónové a askorbové, rovněž retenční čas fenylefrinu odpovídal času rozkladného produktu paracetamolu.

Druhou testovanou se stala částicová kolona Discovery HS PEG (150 x 4,0 mm; 3 µm). Nejlepšího výsledku dosáhla MF ACN : TEA pufru o pH 3,51 v poměru 10 : 90 (v/v), průtoková rychlost byla 1 ml/min. Tyto podmínky vedly k eluci kys. askorbové a fenylefrinu ve stejném čase, proto byla kolona shledána jako nevyhovující.

Další zkoušenou kolonou byla částicová kolona LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 µm), s mobilní fází MeOH : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v), průtokovou rychlostí mobilní fáze 0,5 ml/min a objemem dávkovaným na kolonu 10 µl, která byla vybrána jako nejvhodnější pro další měření, ačkoliv nedošlo ke kompletní separaci.

Čtvrtou testovanou kolonou (vybranou pro testování možnosti zrychlení analýzy díky záměně částicové kolony za monolitní) se stala kolona Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) s předkolonou (5 x 4,6 mm), u které byly vyzkoušeny chromatografické podmínky úspěšné u předchozí kolony. Tyto chromatografické podmínky ale nevedly k úplné separaci všech stanovovaných látek.

Za tuto kolonu byla ještě pro lepší celkovou separaci obsahových látek a pomocné látky, resp. rozkladného produktu přidána Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm). Ani tato změna nevedla k výraznému zlepšení separačních podmínek, látky se dále eluovaly v podobném retenčním čase.

7.2 Příprava vzorku Coldrex Horký nápoj

7.2.1 Vliv teploty na složení horkého nápoje

Podle výše uvedené metody byla testována příprava nápoje zalitím vodou o různých teplotách pro zjištění té nevhodnější, která má při přípravě zajistit rozpuštění co největšího obsahu účinných látek bez jejich rozkladu.

Léčivý přípravek byl zalit vodou o teplotě od 50 °C do 90 °C. Obsah jednotlivých látek v roztoku postupně rostl až u vody o teplotě 70 °C dosáhl maxima, a to u všech obsahových látek. Použitím vody o teplotě 80 °C se dosáhlo taktéž dobrých výsledků, proto bylo s těmito teplotami dále pracováno. Přípravou léčivého přípravku s pomocí vody o teplotě 90 °C obsah látek významně klesl.

Při zalití LP vařící vodou byl obsah kyseliny askorbové výrazně nižší. Látka se pravděpodobně působením vysoké teploty rozložila za vzniku rozkladného produktu (kyseliny dehydroaskorbové), která absorbuje při vlnové délce 210 nm a eluuje se ve stejném retenčním čase jako kyselina citrónová, která ji plně zakrývá. Rozklad fenylefrinu a paracetamolu při tomto testování nebyl patrný.

7.2.2 Vliv časového intervalu mezi přípravou a konzumací připraveného horkého nápoje

Z předchozího měření byly vybrány teploty vody 70 °C a 80 °C, které se osvědčily jako nejlepší podmínky přípravy nápoje a u kterých byla testována stabilita vzniklých roztoků.

Při použití vody o teplotě 70 °C obsah paracetamolu postupně klesal z hodnoty 94,74% (stanovené vůči obsahu deklarovaném výrobcem) měřené po sedmi minutách od přidání vnitřního standardu na 49,25 % po 2,5 hodinách. Druhý den, po 18 hodinách, obsahoval roztok ještě 33,96 % paracetamolu.

Obsah fenylefrinu ve stejném roztoku klesal v obdobných intervalech z 98,93% po 7 minutách na 40,44 % po 2,5 hodinách od počátku měření. Další den obsahoval roztok 37,84% fenylefrinu.

Poslední obsahovou látkou ve zmíněném roztoku byla kys. askorbová, jejíž obsah klesal obdobně jako u předchozích látek z hodnoty 105,59 % na 66,44 %. Následující den obsah kyseliny askorbové činil 60,89 %.

Při rozpouštění léčivého přípravku vodou o teplotě 80 °C vznikl roztok, který po sedmi minutách od přidání vnitřního standardu obsahoval 89,94 % paracetamolu, 97,39 % fenylefrinu a 100,73 % kys. askorbové.

Obsah paracetamolu klesl po 2,5 hodinách z této počáteční hodnoty na 52,49 %, obsah fenylefrinu se snížil na 41,63 % a hodnota obsahu kys. askorbové klesla na 60,90 %.

7.3 Stabilita obsahových látek

Paracetamol je poměrně stabilní látka, jejíž obsah je ovlivňován hodnotou pH roztoku, ve kterém se nachází podobně jako přítomností dalších látek či svou citlivostí na světelné záření. Kyselé pH, které přípravek Coldrex Horký nápoj má (zjištěná hodnota je 3,80), napomáhá postupnému rozkladu látky, jak tomu bylo i během testování. K tomuto rozkladu jistě přispívá i teplota tohoto roztoku.

Kyselina askorbová není příliš stabilní látka. Jedná se o redukční činidlo, které snadno podléhá oxidaci. Působením vyšší teploty a světla se rozkládá na kyselinu dehydroaskorbovou, která se však ve zvolených chromatografických podmínkách eluuje ve stejném retenčním čase jako kyselina citrónová a je jejím píkem na chromatogramu plně překryta. Úbytek kyseliny askorbové je však dobře patrný.

Fenylefrin je považován za velmi stabilní látku. Je citlivý na teplo, světlo a vzdušnou vlhkost. Stabilita v kyselé oblasti pH při přítomnosti dalších látek nebyla v literatuře doposud dostatečně popsána. Během testování postupně došlo k velkému úbytku této látky, nejspíše proto, že se patrně nenacházela ve vhodných stabilizujících podmínkách.

7.4 Srovnání chromatografických metod

Při srovnávání jednotlivých chromatografických metod literatury je zřejmé, že monolitní kolony jsou voleny při separaci obsahových látek, kdy stačí kratší analýza s rozlišením menšího počtu látek, zatímco během stanovení látek v přípravných směsích s jejich rozkladnými produkty a pomocnými látkami je dána přednost částicovým kolonám. Ačkoliv se u těchto kolon jedná o časově náročnější analýzu s omezeným rozpětím chromatografických parametrů, je možné rozlišit i velmi podobné látky.

V popsaných metodách jsou upřednostňovány částicové kolony s větší délkou, a tím i větší separační silou při celkovém prodloužení analýzy. Námí zvolená analýza také využívá tento typ analytické kolony, ale má celkově kratší dobu trvání i při nízké průtokové rychlosti.

8. ZÁVĚR

Byly nalezeny vhodné chromatografické podmínky pro separaci obsahových a pomocných látek v přípravku Coldrex Horký nápoj a některých jejich rozkladných produktů pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Jako ideální vlnové délky pro UV detekci stanovovaných látek byly zvoleny hodnoty $\lambda_1 = 210$ nm a $\lambda_2 = 265$ nm. Optimální analytickou kolonou se ukázala částicová kolona LiChroCART LiChrospher RP-18e (250 x 4 mm; 5 μ m), která poskytovala nejlepší separaci sledovaných analytů. Nejvhodnější mobilní fází byla směs methanol : fosforečnanový pufr o pH 6,52 v poměru 35 : 65 (v/v) s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Analýza trvala 9 minut.

Bylo zjištěno, že použitím vody o teplotě 70 °C jako rozpouštědla pro léčivý přípravek byl získán roztok s nejvyšší koncentrací obsahových látek.

Při zalití přípravku Coldrex vroucí vodou patrně dochází k částečnému rozkladu kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou. Rozklad ostatních obsahových látek se nepotvrdil.

Při testování stability roztoku LP bylo zjištěno, že se hodnoty koncentrace obsahových látek po 7 minutách od přípravy roztoku blíží hodnotám měřeným bezprostředně po rozpuštění LP. Poté se stabilita roztoku zhoršuje a úbytek obsahu látek činí okolo 5 % každých deset minut. Po hodinovém stání při pokojové teplotě se úbytek látek zpomaluje.

Z dosažených výsledků vyplývá doporučení pro přípravu horkého nápoje použít vodu o teplotě 70 - 80 °C a po přípravě horký nápoj vypít co nejdříve (cca do 10 min), aby nedocházelo působením vyšší teploty a kyselého pH vzniklého roztoku k rozkladu účinných látek.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a Toxikologie*, Grada Publishing: Praha, CZ, 2004.
- [2] Škop, B. et al. *Informační systém humánních, homeopatických a veterinárních léčivých přípravků registrovaných v České republice a na Slovensku (AISLP)* [CD-ROM]; Mikro-verze AISLP ČR verze 2012.1 pro MS Windows.
- [3] Český lékopis 2009, doplněk 2011, Grada Publishing, Praha 2011.
- [4] Lincová, D.; Farghali, H. a kol. *Základní a Aplikovaná Farmakologie*, 2nd ed.; Galén: Praha, CZ, 2002.
- [5] Hartl, J.; Palát, K. a kol. *Farmaceutická Chemie II.*, 2nd ed.; Karolinum: Praha, CZ, 1994.
- [6] Beňo, P. a kol. *Stabilita Liečiv a Liekov*, SAV: Bratislava, SK, 2003.
- [7] Hanyšová, L.; Kastner, P.; Klimeš, J. Studium Stability P-aminofenolu jako Dominantního Rozkladného Produktu Paracetamolu, *Chemické listy*, **2004**, *98*, 152-156.
- [8] <http://www.medicabaze.cz> (accessed Jun 2012).
- [9] <http://www.sukl.cz> (accessed Jun 2012).
- [10] <http://www.edukafarm.cz> (accessed Jun 2012).
- [11] Hanyšová, L.; Kastner, P.; Klimeš, J. Degradční Produkty a Nečistoty Paracetamolu z Hlediska Jejich Detekce, *Chemické listy*, **2005**, *99*, 647-652.

- [12] Herberg, S.; Preziosi, P.; Briançon, S.; Galan, P.; Triol, I.; Malvy, D.; Roussel, A.; Favier, A. A Primary Prevention Trial Using Nutritional Doses of Antioxidant Vitamins and Minerals in Cardiovascular Diseases and Cancers in a General Population: The SU.VI.MAX Study-design, Methods and Participant Characteristics, *Controlled Clinical Trials*, **1998**, *19*(4), 336-351.
- [13] Zeng, W.; Martinuzzi, F.; MacGregor, A. Development and Application of a Novel UV Method for the Analysis of Ascorbic Acid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, *36*(5), 1107-1111.
- [14] Iwase, H. Use of an Amino Acid in the Mobile Phase for the Determination of Ascorbic Acid in Food by High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Journal of Chromatography A*, **2000**, *881* (1-2), 317-326.
- [15] <http://www.pharma-ingredients.basf.com> (accessed Jun 2012).
- [16] Karlíček, R. a kol. *Analytická Chemie pro Farmaceuty*, 2nd ed.; Karolinum: Praha, CZ, 1998.
- [17] Klimeš, J. a kol. *Kontrola Léčiv I.*, 2nd ed.; Karolinum: Praha, CZ, 2002.
- [18] <http://www.chromservis.cz> (accessed Jun 2012).
- [19] Štulík, K. a kol. *Analytické Separční Metody*, 2nd ed.; Karolinum: Praha, CZ, 2005.
- [20] Švec, F. Monolithic Stationary Phases. Place of Birth: Prague, *Chemické Listy*, **2004**, *98*(5), 232-238.
- [21] Jandera, P. *Pokroky ve Vývoji Kolon pro HPLC – Současný Stav a Perspektivy*, www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc (accessed Jun 2012).
- [22] Jandera, P.; Halama, M.; Novotná, K. Stationary-phase Effects in Gradient High-performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1030*(1-2), 33-41.
- [23] <http://www.waters.com> (accessed Jun 2012).

- [24] Dinç, E.; Kökdil, G.; Onur, F. Derivative Ratio Spectra–zero Crossing Spectrophotometry and LC Method Applied to the Quantitative Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Ternary Mixtures, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2001**, 26 (5-6), 769-778.
- [25] Interní materiály firmy Léčiva: Assay of Propyphenazone, Caffeine and Paracetamol by HPLC, version 1.0 – approved by Leciva, 358-359.
- [26] Daňková, J. *Optimalizace Chromatografické Separace pro Stanovení 4-aminofenolu a Účinných Látek v Léčivém Přípravku Valetol*, rigorózní práce, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze, 2008.
- [27] Ullrichová, J. *Vývoj a Validace HPLC Metody pro Separaci a Stanovení Účinných Látek v Léčivém Přípravku Valetol*, diplomová práce, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze, 2007.
- [28] Pavlovičová, S. *Využití metody HILIC pro hodnocení stability kyseliny askorbové*, rigorózní práce, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze, 2008.
- [29] Maia, A.M.; Baby, A.R.; Yasaka, W. J.; Suenaga, E.; Kaneko, T.M.; Velasco, M.V.R. Validation of HPLC Stability-indicating Method for Vitamin C in Semisolid Pharmaceutical/Cosmetic Preparations with Glutathione and Sodium Metabisulfite, as Antioxidants, *Talanta*, **2007**, 71(2), 639-643.
- [30] Kubíková, D. *Stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu ve farmaceutických přípravcích pomocí micelární elektrokinetické chromatografie*, rigorózní práce, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [31] Kubíková, D. *Analýza protichřipkových léčiv s využitím elektroforetických metod*, diplomová práce, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze, 2009.

- [32] Kobllová, P.; Sklenářová, H.; Brabcová, I.; Solich, P. Development and Validation of a Rapid HPLC Method for the Determination of Ascorbic Acid, Phenylephrine, Paracetamol and Caffeine Using a Monolithic Column, *Analytical Methods*, **2012**, *4*, 1588-1591.