

KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA LÉČIV

Stanovení kyseliny acetylsalicylové v léčivu

Kapilární elektroforéza (*Capillary electrophoresis, CE*) je moderní vysoce účinná analytická separační metoda. Principem je pohyb analytů v kapalině mezi dvěma elektrodami vysokého napětí, obvykle realizovaný v kapiláře o průměru 25 - 75 μm s *on-column* detekcí.

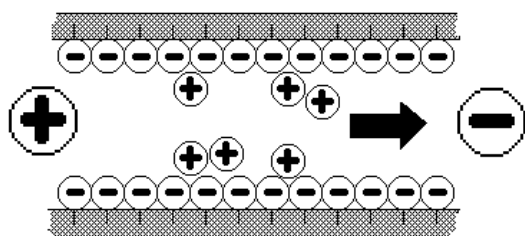
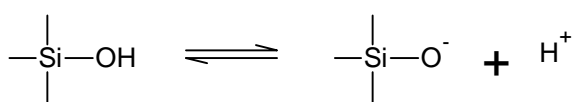
I. TEORIE

Elektricky nabitá částice (iont) se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem náboje a orientací el. pole (kladně nabitá částice k zápornému pólu a naopak). V kapalině je rychlost tohoto pohybu přímo úměrná **náboji částice** ($F = q \cdot E$) a nepřímo úměrná hydrodynamické (Stokesově) **velikosti částice d** (síla odporu prostředí $F = -3 \cdot \eta \cdot \pi \cdot d \cdot v$, kde η je viskozita kapaliny). Tyto dvě síly se prakticky okamžitě po aplikaci elektrického pole vyrovňají a částice se dále pohybuje konstantní rychlostí v . TO ZNAMENÁ = pokud se ionty vzorku liší alespoň v efektivním náboji q či hydrodynamické velikosti d , budou se pohybovat **rozdílnými rychlostmi**, což je nutnou podmínkou separace.

Při použití kapiláry (typicky křemenné, *fused silica*) coby separační kolony je prostá elektromigrace **nezanedbatelně** snižována/zvyšována tokem **nezávislým na náboji analytu** (elektroosmotický tok, *electroosmotic flow = EOF*).

Elektroosmotický tok:

Stěny křemenné kapiláry obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují. Disociací se pak vytvoří záporný náboj stěny.



Vysvětlení *elektroosmotického toku* v *nemodifikované křemenné kapiláře*: *povrch kapiláry nese nepohyblivý negativní náboj (silanolové skupiny)*. V důsledku zachování *elektroneutrality* se proto u stěn *nachází přebytek pozitivních iontů z roztoku, které pak i svoje okolí (celou kapalinu) unášejí ke katodě*.

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis, CZE)
a vyhodnocení elektroforeogramu:

Jedním z módů CE je **kapilární zónová elektroforéza**, pro níž je charakteristické použití jednoho pracovního elektrolytu (*background electrolyte*, BGE). V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé zóny putují konstantními, ale různými rychlostmi, jsou oddělené BGE a odezva detektoru na konci kapiláry (typicky UV-VIS detektor) má gaussovský profil (= pík). Obdobně jako u chromatografie, retenční čas píku t_r charakterizuje analyt kvalitativně, kvantitativní charakteristikou **elektroforeogramu** je výška píku v (nebo plocha - při nahrazení píku trojúhelníkem o výšce h a základně w platí $P = h \cdot w/2$).

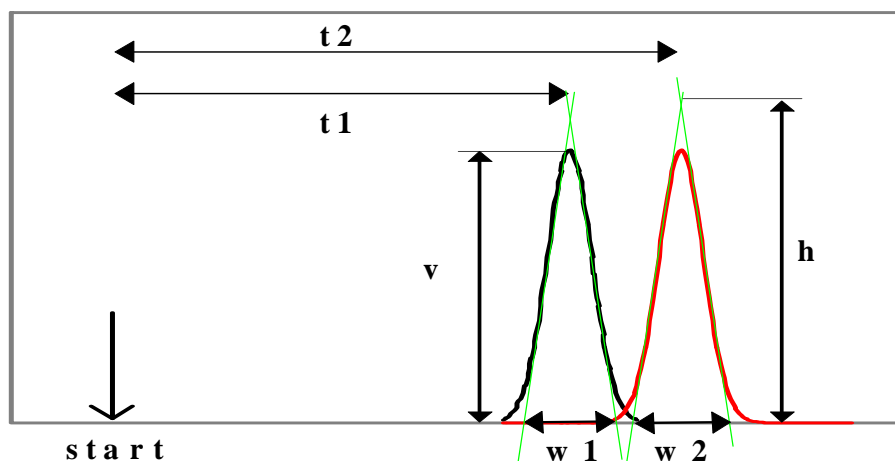
Počet teoretických pater N je mírou účinnosti kolony

$$N = 16 \frac{t_r^2}{w^2} \quad \left(\text{pro elektroforézu také} = \frac{\mu U}{2D} \right)$$

kde μ je mobilita, U napětí, D difúzní koeficient. (pozn. t_r a w musí být vyjadřovány ve stejných jednotkách např. sec nebo mm !!!). N je vysoké pro „úzké“ (základna píku $w \rightarrow 0$) a zadržované ($t_r \rightarrow \infty$) píky. Nejjednodušší odečtení w je nahrazení píku trojúhelníkem (viz obrázek ↓).

Rozlišení R_s je mírou separace dvou píků, např. hodnota $R_s = 1,00$ udává, že dva stejné píky vykazují jen 2 %-ní překryv, při $R_s = 1,50$ považujeme píky za kvantitativně oddělené.

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

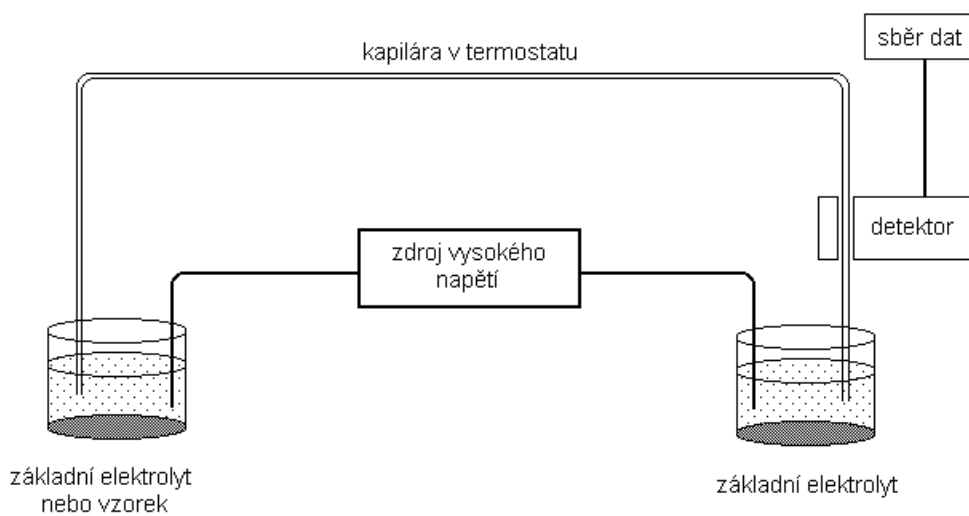


II. INSTRUMENTACE

PrinCE 500 (Prince Technologies, Emmen, Netherlands) vybavený HPLC spektrofotometrickým detektorem **Lambda 1010** (Bischoff, Leonberg, Germany):



Schéma přístroje CE

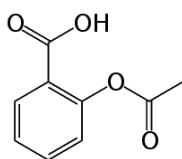


Experimentální uspořádání v CZE je prakticky stále stejné, liší se jen v jednotlivostech. Zařízení vždy obsahuje nejméně:

- **separační kapiláru**
- **zdroj napětí,**
- **(dávkovač vzorku)**
- **detektor**
- **zařízení pro záznam analytického signálu (viz obrázek ↑).**

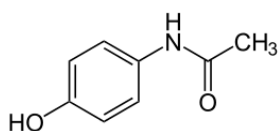
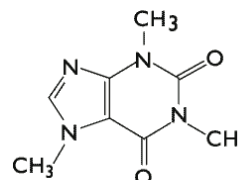
Typické napětí je 5 - 30 kV, elektrolyt o koncentraci 5 - 200 mM. Analýza se obvykle provádí v křemenných kapilárách, zřídka v kapilárách teflonových nebo skleněných. Běžné křemenné jsou z vnější strany chráněny tenkou vrstvou polyimidu, čímž se omezí jejich křehkost. Typický vnitřní průměr kapiláry je 25 - 75 μm , délka 30 - 80 cm, **v případě PrinCE je minimální délka kapiláry 82 cm** (objem kapiláry je tedy 1,6 μl), přičemž vzdálenost k okénku z kratší strany je **32 cm**. Detekce se nejčastěji provádí UV-VIS detektorem, konduktometricky, fluorescenčně (laserem indukovaná fluorescence), amperometricky, hmotnostním spektrometrem (absolutní). Dávkování (řádově nanolitry) se provádí buď hydrodynamicky (přetlakem na začátku či podtlakem na konci kapiláry) nebo elektromigračně (po stanovenou dobu se aplikuje dávkovací napětí).

III. ÚKOL

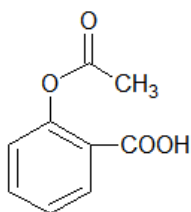


Kyselina acetylsalicylová (*acetylsalicylic acid*, *Aspirin™*, *Acylpyrin™*) je široce používané léčivo s např. antipyretickými účinky. V této práci bude stanovován její obsah v komerčně vyráběném léčivu ACIFEIN (HERBACOS-BOFARMA, s.r.o) metodou CZE.

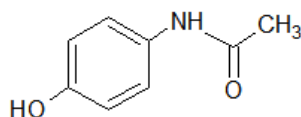
Kofein (*caffeine*) (podle rostliny *Coffea arabica*, česky kávovník) je alkaloid, který příznivě stimuluje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost. Kofein je pravděpodobně nejrozšířenější stimulant na světě nacházející se v mnoha nápojích, např. kávě, který se užíváním ve větším množství stává drogou. Kofein patří do skupiny purinových derivátů xanthinu, která zahrnuje theobromin (kakao) a theofylin (bronchodilatans, látka uvolňující průduškové svalstvo).



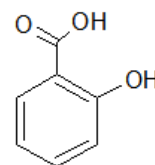
Paracetamol je léčivo, jež působí proti bolestem a zvýšené tělesné teplotě, není však protizánětlivé. Patří do indikačních skupin analgetikum a antipyretikum.



Aspirin
pKa = 3,5



Paracetamol
pKa = 9,9



Salicylová kyselina
pKa₁ = 3,0 pKa₂ = 8,3

Popis výrobku ACIFEIN 10 Tablety

Co obsahuje váš lék?

Acidum acetylsalicylicum 250 mg, Paracetamolum 200 mg, Coffeinum 50 mg v 1 tabletě

Další látky obsažené v léku

Glycin, kukuřičný škrob, hyprolóza.

<http://www.farmaceutika.info/acifein#spc>



Popis systému

PrinCE 500 (Prince Technologies, Emmen, Nizozemí)

křemenná kapilára (vnitřní průměr 75 μm , $L = 82 \text{ cm}$, efektivní délka = 32 cm)

borátový pufr (25 mM tetraboritan sodný), pH = 9,25

napětí: + 30 kV

$$\text{gradient napětí} = \frac{30000 \text{ V}}{82 \text{ cm}} = 366 \text{ V/cm}$$

dávkování: 50 mbar/0.1 min

teplota: 25 °C

detekce UV při 190 nm

Chemikálie

tetraboritan disodný dekahydrát ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$), kyselina acetylsalicylová, kofein, paracetamol, methanol, destilovaná voda

Pracovní postup

Příprava roztoků

roztok pufrujícího elektrolytu (BGE):

100 ml, 25 mM tetraboritan sodný, pH= 9,25

příprava vzorku:

Zvaž **10 tablet** a spočítej průměrnou hmotnost jedné tablety. Vyber **jednu tabletu**, zvaž ji, dokonale rozetři na prášek a 25 mg rozpust v 5 ml methanolu a doplň na **50,00 ml** vodou. Přítomnost aditiv **znemožňuje úplné** rozpuštění tablety. Všechny stanovované komponenty (analyty) se však kvantitativně rozpustí **do 10 minut**. Do ampulky filtruj!

Zásobní roztok standardu (kyselina acetylsalicylová = ASA) připravíme do 25 ml odměrky, koncentrace $\approx 2.4 \text{ mg/ml}$, v 10% methanolu. Z tohoto roztoku nařed' do vody kalibrační roztoky (**10,00 ml**) o následujících koncentracích ASA: 24, 120, 180, 240 $\mu\text{g/ml}$

- napiš do pracovního sešitu tabulku, jak umístíš jednotlivé roztoky do karuselu, dodrž alespoň následující pozice:

101 - odpad

102 - NaOH

111 - borax inlet

112 - borax outlet

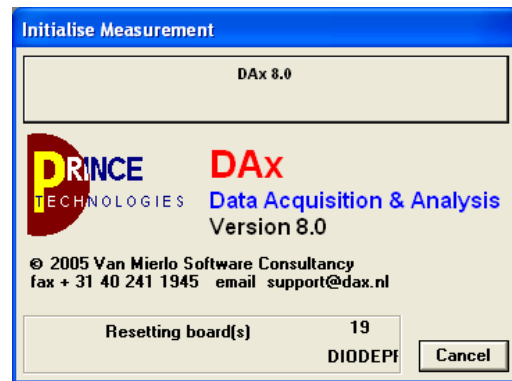
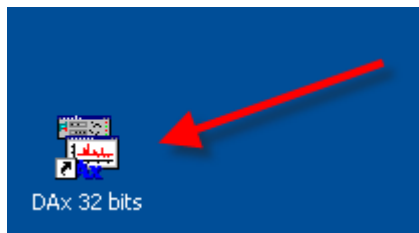
133 - voda

- naplň vialky až po hrdlo (např. 014 - ASA, 016 - sample, „s“)
- oznam vedoucímu cvičení připravenost k analýze

Práce s přístrojem PrinCE 500

Vedoucí cvičení vysvětlí obsluhu přístroje určenému zodpovědnému studentovi.

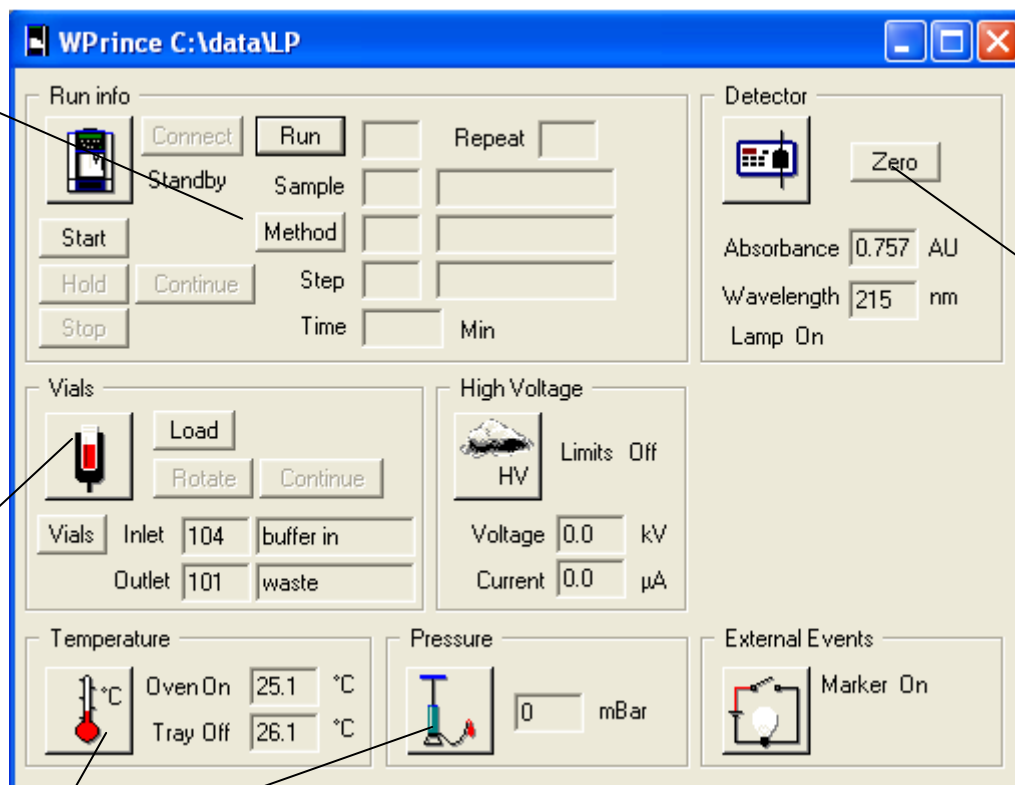
- jako první je třeba zapnout lampu na detektoru Lambda 1010, po výboji se musí počkat alespoň 15 min, než se hodnota absorpance ustálí na nule
- spustí program **DAX** umístěný na ploše (bez hesla)



- parametry softwaru, tvorba metody:



objeví se kontrolní panel:

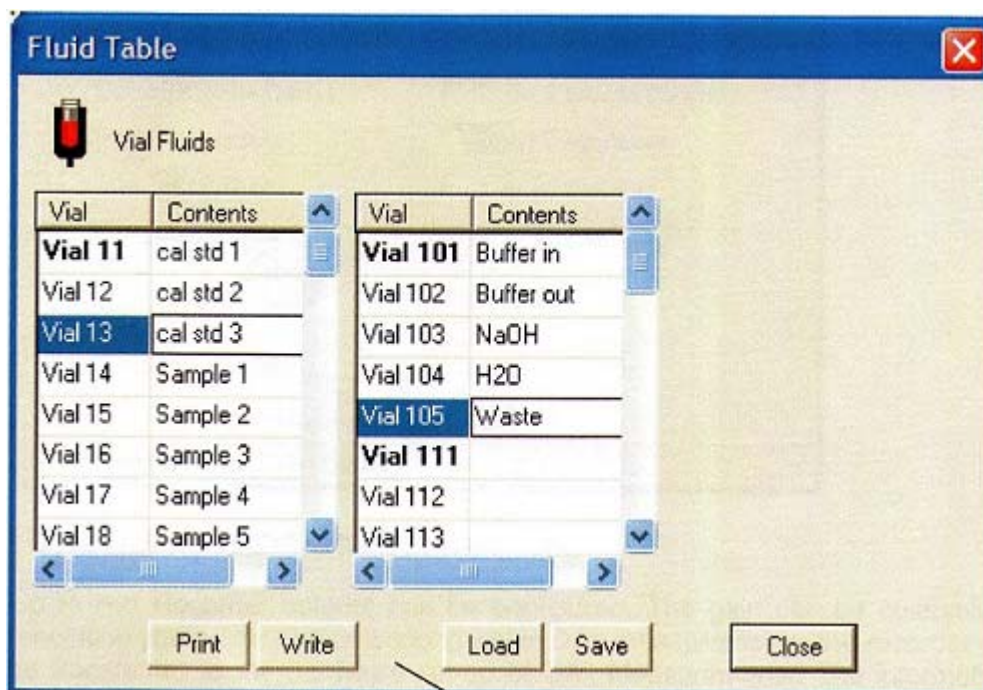


nastavení metody (3)

pojmenování vialek („Fluid table“)

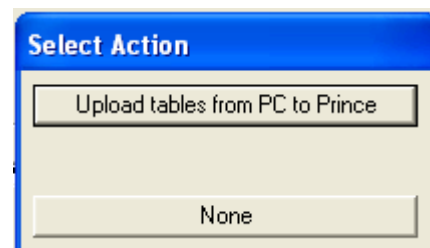
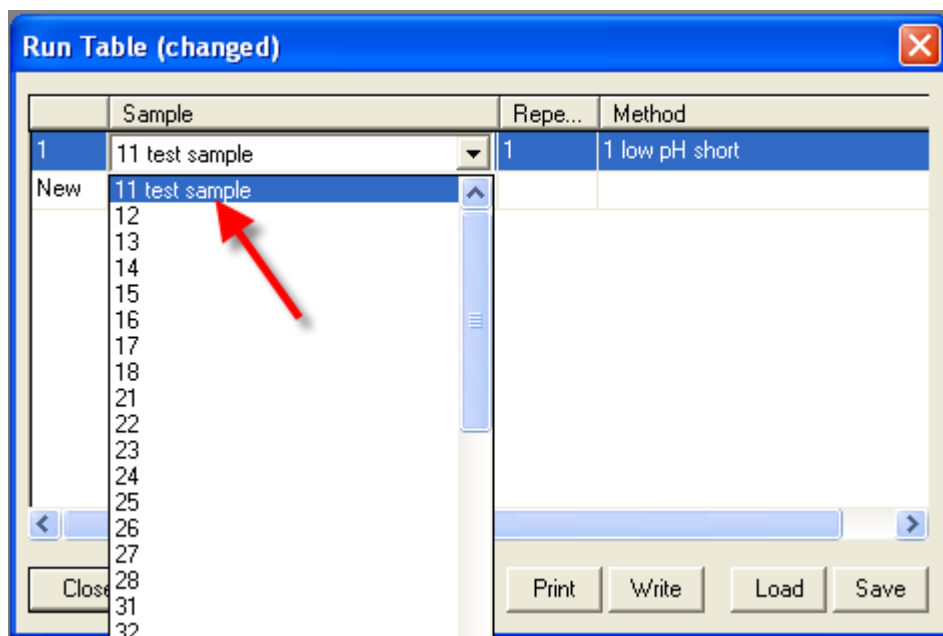
nastavení tlaku a teploty

vynulování detektoru



(1) „load“ vialek („rotate“ protočení karuselu) > „continue“ (vrátí se do původního stavu, ze kterého jsem ho zavolal), bez „continue“ nerozjede metodu!

(2) „Run“ > „Run Table“ nastavím, co bude „sample“ a po každé změně nesmím zapomenout odeslat změnu z PC do Prince („close“)



aktivní metoda

(3) „Method“ > objeví se okno s metodami a vyberu tu, která má parametry pro měření v této úloze (metoda „gons5“) a tyto parametry zkontroluji:

zde můžu jednotlivé kroky v metodě upravit

	Inlet	Fluid	Outlet	Fluid	p (mbar)	kV/μA	kV/μA	Dur (min)	Comment	Marker
1	111	borax 25mM in	101	waste	2000	kV	0.0	1.00		No
2	Sample		101	waste	50	kV	0.0	0.10		No
3	111	borax 25mM in	112	borax 25mM out	0	kV	25.0	7.00		No
4	133	water	101	waste	2000	kV	0.0	1.00		Yes

Time (min)	Type	state
0.00	Marker	Yes
0.50	Zero Detector	

vynulování detektoru v průběhu metody (jelikož v prvním kroku bychom měřili nepotřebnou absorpenci boraxu)

Method:

Print Write Load Save Clear

	Inlet	Fluid	Outlet	Fluid	p (mbar)	kV/ μ A	kV/ μ A	Dur (min)	Comment	Marker
5	gons5									
6	proplach NaCl									
7	dlouhý ASAg									
8										
1	111	borax 25mM in	101	waste	2000	kV	0.0	1.00		No
2	Sample		101	waste	50	kV	0.0	0.10		No
3	111	borax 25mM in	112	borax 25mM out	0	kV	25.0	7.00		No
4	133	water	101	waste	2000	kV	0.0	1.00		Yes

High Voltage: Ramps Begin 6.00 kV/s End 6.00 kV/s Limits Low -200.0 μ A Action Message High 200.0 μ A Action Regulate

Detector: Wavelength 204 nm Range 0.20 AU Time Constant 0.02 s

Oven: Thermostating 25.0 $^{\circ}$ C

Timed events:

Time (min)	Type	state
0.99	Marker	No

Close Load Save

Valid range is 11 - 165; type 's' for 'sample'

zastavení
sběru dat

Parametry pro tuto úlohu tedy jsou:

- V prvním kroku metody je na inletové vialce (č. 111) roztok 25mM boraxu a na outletové (č. 101) je odpad, nástřik boraxu při tlaku 2000 mbar;
- V druhém kroku dochází k nástřiku vzorku („sample“) z inletové vialky do odpadu při tlaku 50 mbar;
- Měření při $U = +25$ kV;
- Proplach vodou z vialky č. 133 do odpadu (č. 101).

(4) po zadání správných parametrů > „close“ a znovu odeslat z PC do Prince;

(5) měření spustím v „File“ > „New“ v DAX hlavním menu > objeví se sekvenční tabulka:

DAX Measurements

Channel 1 Channel 2

Channel Sequence List for Channel 1

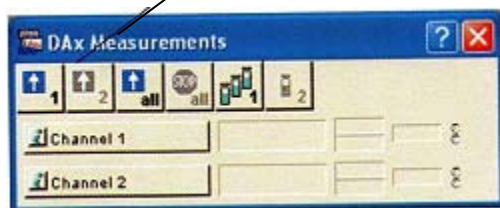
Single Run Preset scale: t max (min): 1 Y range: 0 0 Components >>

Type	Repeats	File	Sample	Sample name	Method	Description	Description	Total Conc.	Dilution	A	B
1	Procedure	0	c:\Mmp.par					0	1		
2	New Calibration	1	c:\dax 8\default	cal std 1	1 method 1			30	1	10	20
3	Calibration	1	c:\dax 8\default	cal std 2	1 method 1			150	1	50	100
4	Measurement	1	c:\dax 8\default	Sample 2	1 method 1			75	1		

Close Help Add... Insert... File Cut Paste Print Load Save

po zvolení místa
uložení opět
přeposlat z PC
do Prince

(6) při modrém zbarvení se tímto tlačítkem spustí sekvence všech kroků ve zvolené metodě



Typický elektroforeogram

