

Stanovení kyseliny acetylsalicylové v AcifeinuTM pomocí kapilární zónové elektroforézy

Obecný popis: Skripta - Jampílek *et al.*, str. 46-47

Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis, CE)

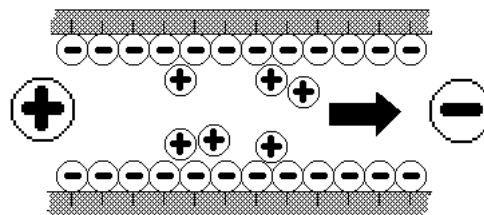
je moderní vysoce účinná analytická separační metoda. Principem je pohyb analytů v kapalině mezi dvěma elektrodami vysokého napětí, obvykle realizovaný v kapiláře průměru 25-75 μm s on-column detekcí.

I. TEORIE

Elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem náboje částice a orientací 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 $F = -3\pi\eta d v$, kde η je viskozita kapaliny). Tyto dvě síly se brzy po aplikaci elektrického pole vyrovnají a částice se dále pohybuje konstantní rychlostí v . Pokud se tedy částice vzorku liší alespoň v efektivním náboji či hydrodynamické velikosti, mohou se pohybovat **rozdílnými rychlostmi**, což je nutnou podmínkou separace.

Při použití kapiláry (typicky křemenné, *fused silica*) jako separační kolony je prostá elektromigrace **nezanedbatelně** snižována/zvyšována tokem **nezávislým na náboji analytu** (elektroosmotický tok, *electroosmotic flow = EOF*), který může zcela znemožnit separaci očekávanou podle nábojů a velikostí analytů.

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 celou kapalinu unášejí ke katodě.



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 různými konstantními 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 $P=h \cdot w/2$).

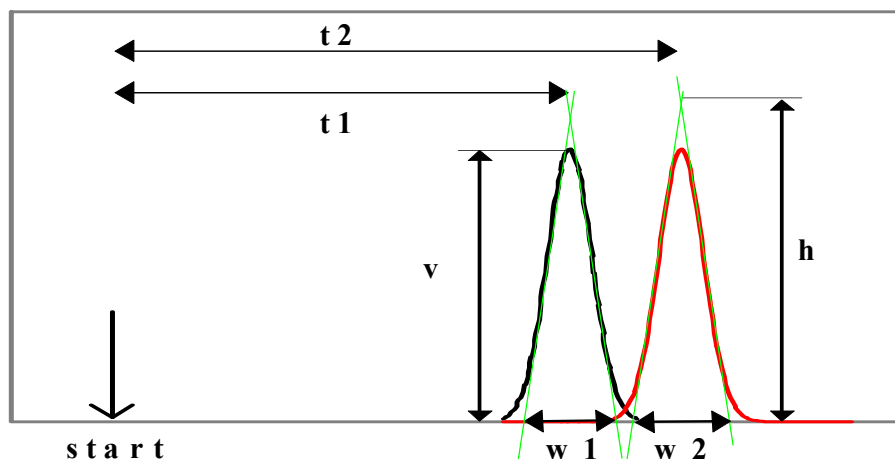
Počet teoretických pater N je mírou účinnosti kolony

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

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.

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

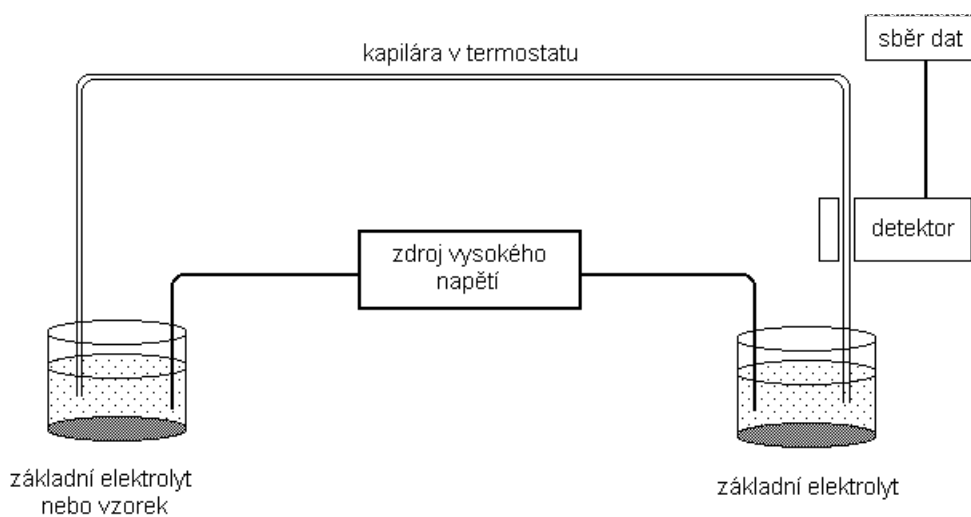


II. INSTRUMENTACE



Kazeta (cartridge) = držák kapiláry s detekčním okénkem, slouží i jako vzduchový chladič

Přístroj CE3D Agilent



Příslušenství přístroje

skleněné vialky 1,8 ml



zátky vialek



PP vialky 0,9 ml a 250 ul



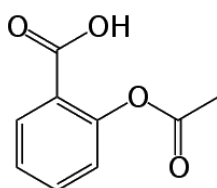
Experimentální uspořádání v CZE je prakticky stále stejné, liší se jen v jednotlivostech. Zařízení vždy obsahuje nejméně: **separační kapiláru, zdroj napětí, (dávkořač vzorku), detektor a zařízení pro záznam analytického signálu (viz obrázek ↑)**. Typické napětí je 5-30 kV, elektrolyt o koncentraci 5-200 mM.

Analýza se obvykle provádí v křemenných kapilárách, zřídka v kapilárách teflonových nebo skleněných. Křemenné jsou z vnější strany chráněny tenkou vrstvou polyimidu, čímž se omezí křehkost. Typický vnitřní průměr kapiláry je 50-75 μm , délka 40-70 cm, objem 1-3 μl .

Detekce se nejčastěji provádí UV-VIS detektorem, konduktometricky, fluorescenčně (laserem indukovaná fluorescence), amperometricky, hmotovým spektrometrem (absolutní).

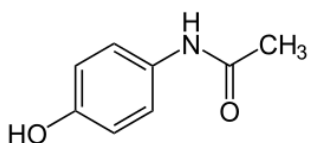
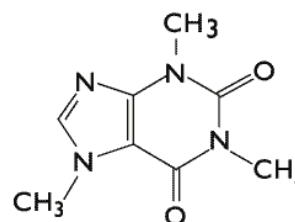
Dávkování (řádově nanolitry) se provádí buď hydrodynamicky (přetlakem na začátku či podtlakem na konci kapiláry) nebo elektromigračně (po stanovenou dobu se aplikuje dávkovací napětí).

III. ÚKOL

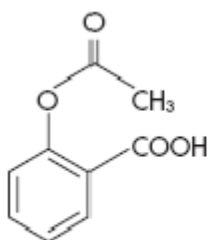


Kyselina acetylosalicylová (*acetylsalicylic acid*, *Aspirin*TM, *Acylpyrin*TM) je široce používané léčivo s např. antipyretickými účinky. V této práci bude stanovován její obsah v komerčně vyráběném léčivu ACIFEIN (HERBACOS-BOFARMA, s.r.o) metodou CZE.

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, methylových derivátů xanthinu, která zahrnuje theobromin (kakao) a theofylin (bronchodilatans, látka uvolňující průduškové svalstvo).

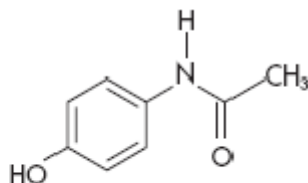


Paracetamol je léčivo, jež působí proti bolestem a zvýšené tělesné teplotě, není však protizánětlivé. Patří do indikačních skupin analgetikum a antipyretikum.



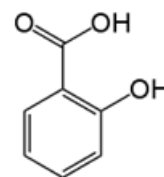
Aspirin

pKa=3.5



Paracetamol

pKa=9.9



Salicylic acid

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, mastek, hyprolóza.

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

ACYLCOFFIN® Tablety

ZENTIVA, a. s., Hlohovec, Slovenská republika
acidum acetylsalicylicum (kyselina acetylsalicylová) 450 mg, coffeinum
(kofeín) 50 mg v 1 tablete

Pomocné látky:

solani amylium (zemiakový škrob), talcum (mastenec)



Popis systému:

CE systém CE3D Agilent (Agilent Technologies, Walbronn, Německo)

nemodifikovaná křemenná kapilára, vnitřní průměr 75 µm, L=33 cm, efektivní délka = 24,5 cm

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

napětí = + 10 kV, dávkování = 20 mbar / 3 s

teplota = 25 °C, detekce UV při 206/265/280 nm

Chemikálie:

Tetraboritan disodný (dekahydrát), kyselina boritá, NaOH, kyselina acetylsalicylová, kofeín, paracetamol, methanol

Správná laboratorní praxe (*Good laboratory practise, GLP*):

- detekce v UV oblasti s optickou celou 75 µm vyžaduje zcela transparentní roztoky. Každý roztok pro CE **musí být před použitím filtrován** (výměnné filtry 0,02 µm)
- před odchodem zkontroluj přístroj a umyj veškeré nádoby, které jsi používal. Uvaž, že i další kolegové budou se stejným vybavením chtít stanovovat velmi nízké koncentrace látek.

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! (15 minut)

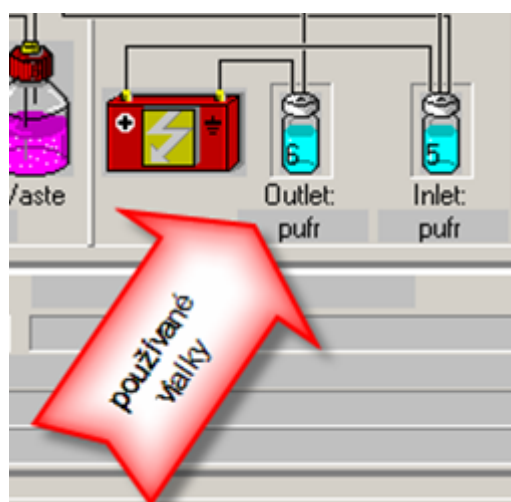
Zásobní roztok standardu (kyselina acetylsalicylová=ASA) připravíme do 25 ml odměrky, koncentrace $c \approx 2.4 \text{ mg/ml}$, v 10% methanolu. Z tohoto roztoku nařed' kalibrační roztoky (**10,00 ml**) o následujících koncentracích:

ASA: 24, 120, 180, 240 $\mu\text{g/ml}$ (30 minut)

- ◇ napiš si do pracovního sešitu tabulku, jak umístíš jednotlivé roztoky do karuselu (dodrž alespoň následující pozice 8=odpad, 5 a 6=základní elektrolyt). Vyhrad' také ampulky pro čistící roztoky (2=0.1 M NaOH, 3=voda)
- ◇ **naplň** ampulky po hrdlo (plastové 0,90 ml, skleněné max. 1,80 ml) a označ je fixou
- ◇ oznam vedoucímu cvičení připravenost k analýze

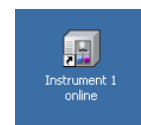
Práce s přístrojem Agilent CE3D:

Vedoucí cvičení vysvětlí obsluhu přístroje určenému zodpovědnému studentovi. Před posláním jakéhokoli příkazu (software Chemstation) zkontrolujte, **zda nejsou ke kapiláře zvednuté vialky a jejich pozice zároveň obsazeny v karuselu!!!** Tato situace vyústí ve zničení výtahů přístroje a vyžádá si opravu v ceně cca 100 000,- Kč! (obsazenost pozic a čísla vialek vidíme na schématu přístroje)



→ikona na ploše

→ jako první je nutno spustit „SYSTEM INIT“ (**viz příloha**)



→ vlož do přístroje kazetu s kapilárou (a proved' kalibraci vlnových délek)

→ ověř funkčnost systému střídavým promýváním do vialky 8 (odpad) z 3=voda/2=hydroxid. Zkontroluj, zda po cca 6 sekundách dochází ke skokové změně absorbance. Pokud ne, oznam to neprodleně vedoucími cvičení; bez nápravy tohoto stavu by bylo další měření zbytečné

(15 minut)

• Podle přílohy zkontroluj parametry softwaru (metoda ACIFEIN.M)

25 °C, preconditioning =1 min BGE, polarity positive **10 kV**, postconditioning = 1 min hydroxid + 1 min voda, **dávkování 5s / 25 mbar + oplach**, stoptime **6 min**, DAD: $\lambda =$ **200/231/246nm** (10 minut)

• 3x zanalyzuj vzorek (25 minut)

• za stejných podmínek proved' analýzu kalibračních roztoků (3x) (90 minut)

celkem 180 minut

• kterým látkám patří další pozorované signály? – můžete ověřite nástřikem SA a APAP, kofeinu, p-aminofenolu

Vyhodnocení:

- Spočítejte průměrné retenční časy, průměrný počet teoretických pater a průměrné rozlišení pro signály ASA a SA ve vzorku (hodnoty t_r a w odečtete ze softwaru Chemstation). Vypočítejte celkovou přesnost přístroje (=RSD z odečtených ploch hlavních píků).
- Zkonstruuje 2 **lineární** kalibrační grafy: plocha vs. koncentrace a výška vs. koncentrace (uvažte i bod [0,0]), vypočítejte **korelační koeficient r**. Z průměrné plochy píků odečtete koncentraci **ASA** (buď interpolací nebo použitím regresní kalibrační rovnice)
- Vypočítejte **průměrnou hmotnost** [mg] ASA v **tabletě**, kterou jste analyzovali. Spočítejte také hmotnost ASA [mg] v **průměrné tabletě**.

PŘÍLOHA

diagram systému

The screenshot shows the 'Method and Run Control' interface. At the top, it displays 'Ready' status and 'Last Run 5.0'. The 'CE-State' is 'Ready'. The 'Detector DAD' section shows a table of parameters:

	Signal	Reference
A:	200 4	550 20
B:	265 4	450 80
C:	254 16	550 80
D:	280 4	550 80
E:	320 16	450 80

The 'Energy' section shows: 0.0 kV, 0.2 μA, 0.0 W. The 'Online Plot' shows a pressure signal at 150 mAU. Red arrows point to various elements: 'vzorek' (sample) pointing to the vial icon, 'název souboru' (file name) pointing to the file path, 'online spektra' (online spectra) pointing to the plot, 'pozitivně Malý' (positively small) pointing to the '0.0 mbar' pressure gauge, and 'parametry zobrazováního signálu' (display signal parameters) pointing to the 'DAD A, Sig=200,4 Ref=550,20 Pressure' label.

systém INIT

The screenshot shows the 'Method and Run Control' interface with the system status 'Not Ready'. The 'CE-State' is 'Not initial.'. The 'Detector DAD' section shows the same parameter table as above:

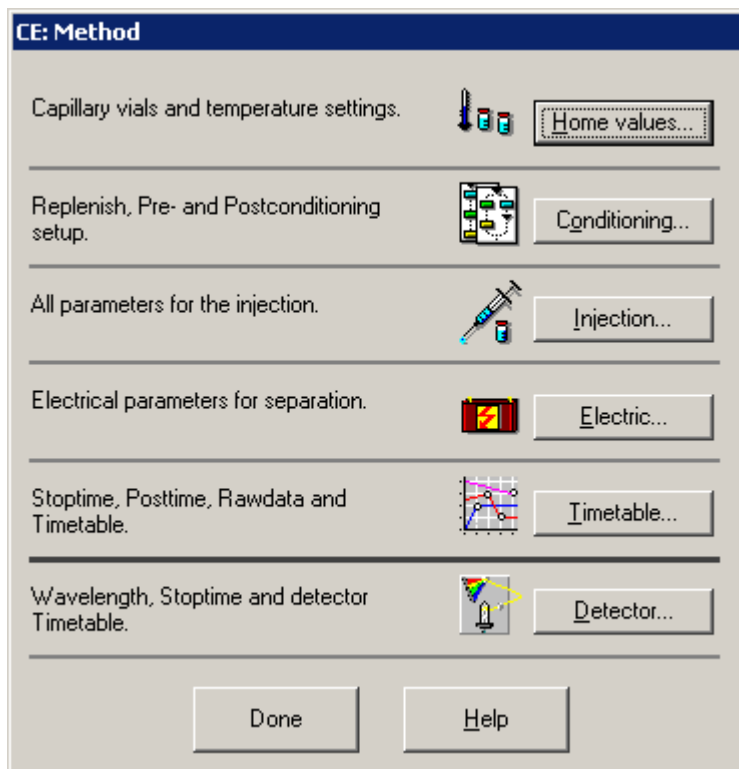
	Signal	Reference
A:	200 4	550 20
B:	265 4	450 80
C:	254 16	550 80

A red arrow points to the 'Not initial.' text in the 'CE-State' section.

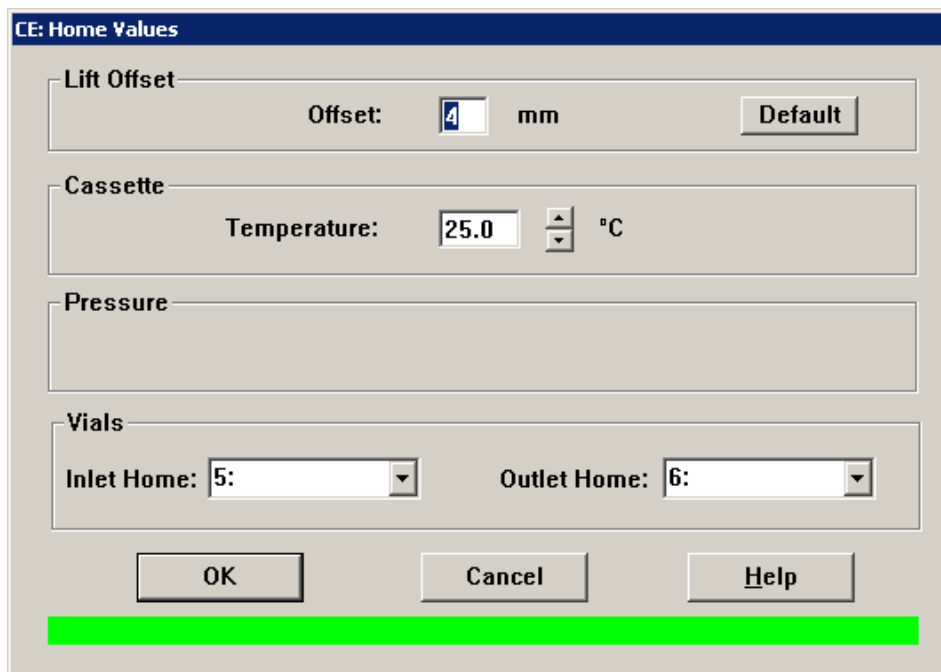
The screenshot shows the 'Instrument 1 (online): Method & Run Control' interface. A context menu is open, listing various system control options. The 'System INIT' option is highlighted with a red arrow. The menu items include:

- System Vialtable...
- Select CE Mode...
- Set up CE Method...
- Set up CE Homevalues...
- Set up CE Conditioning...
- Set up CE Injection...
- Set up CE Electric...
- Set up CE TimeTable...
- Set up CE Fraction Collection...
- Set up DAD Signals...
- Simulation...
- More CE Control
- More CE Electric
- More CE Pressure
- More CE Vials
- More DAD
- Snapshot
- NotReady Info...
- System Reset
- System INIT**
- Maintenance
- Revisions & Serial#'s...
- Capillaries...

nastavení metody:



1/ Home values



2/ Conditioning

CE: Conditioning

Replenishment and Preconditioning should be processed:

parallel
 serial

Replenish

none
 Use Table

Preconditioning

none
 Use Table


Postconditioning

none
 Use Table

CE Preconditioning

Line Function


Line	Function
1	FLUSH 1.00 min, I:5: pufr, 0:8: waste
-----LastLine-----	



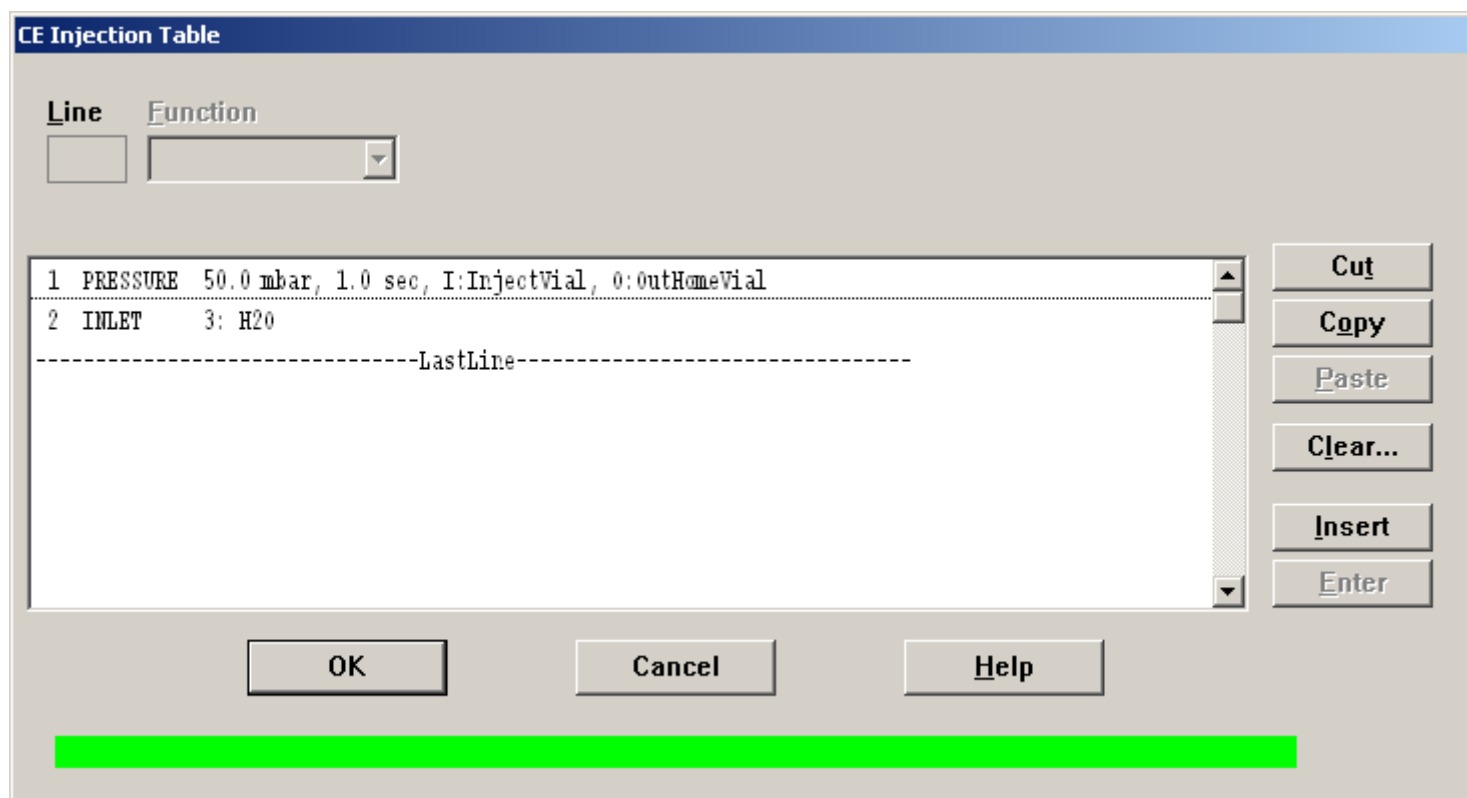
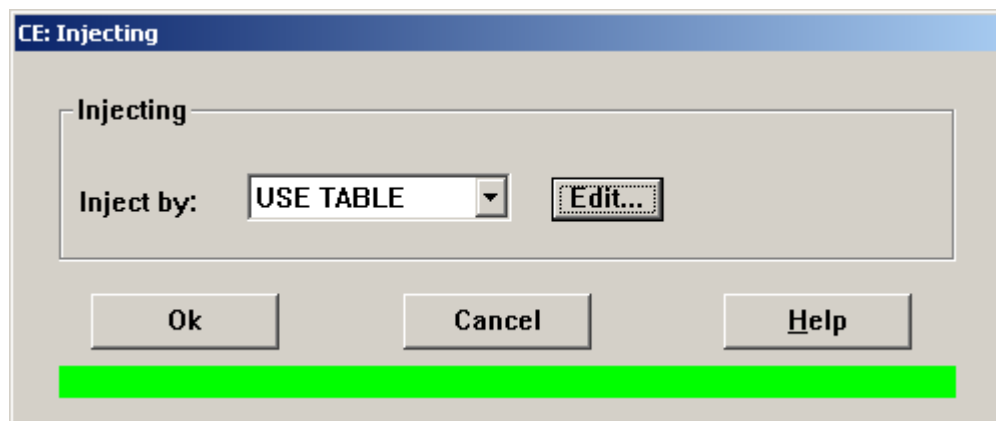
CE Postconditioning

Line Function

Line	Function
1	FLUSH 1.00 min, I:2: , 0:8: waste
2	FLUSH 1.00 min, I:3: H2O, 0:8: waste
-----LastLine-----	

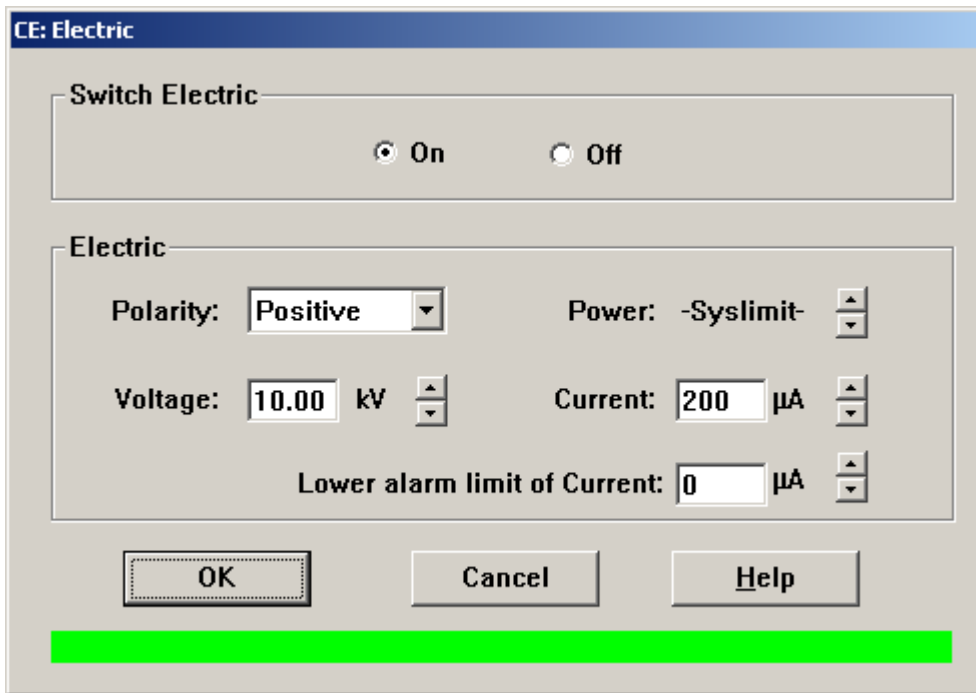


3/ Injection (s oplachem inletu)

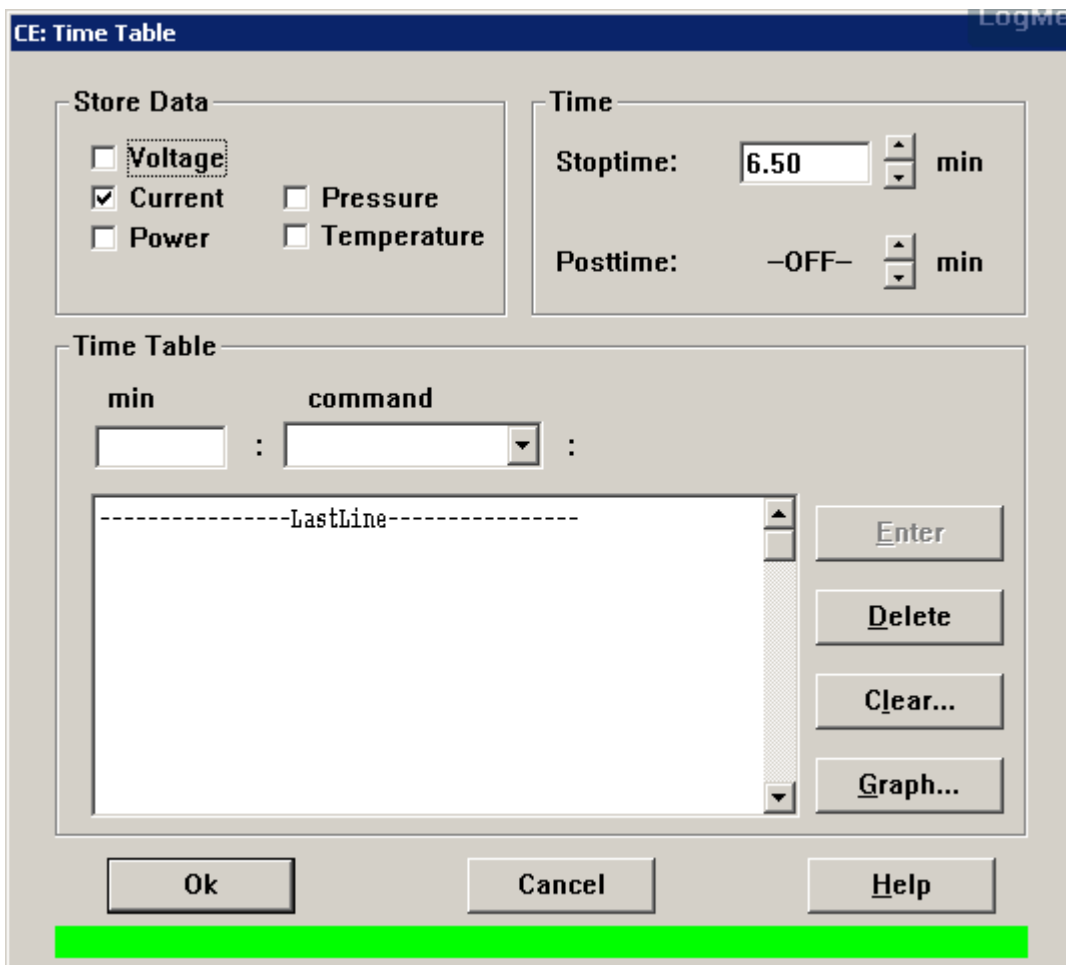


10 mbar / 5s

4/ Electric



5/ Timetable



6/ Detector

DAD Signals: Instrument 1

Store	Sample, Bw	Reference, Bw
A: <input checked="" type="checkbox"/>	200 4	550 20 nm
B: <input checked="" type="checkbox"/>	265 4	450 80 nm
C: <input type="checkbox"/>	254 16	550 80 nm
D: <input checked="" type="checkbox"/>	280 4	550 80 nm
E: <input type="checkbox"/>	320 16	450 80 nm

Spectrum

Store: Apex+Baselines
 Range: 190 to 600 nm
 Threshold: 5.00 mAU

Peakwidth
 >0.03 min
 Responsetime 0.3 s

Autobalance
 Prerun
 Postrun

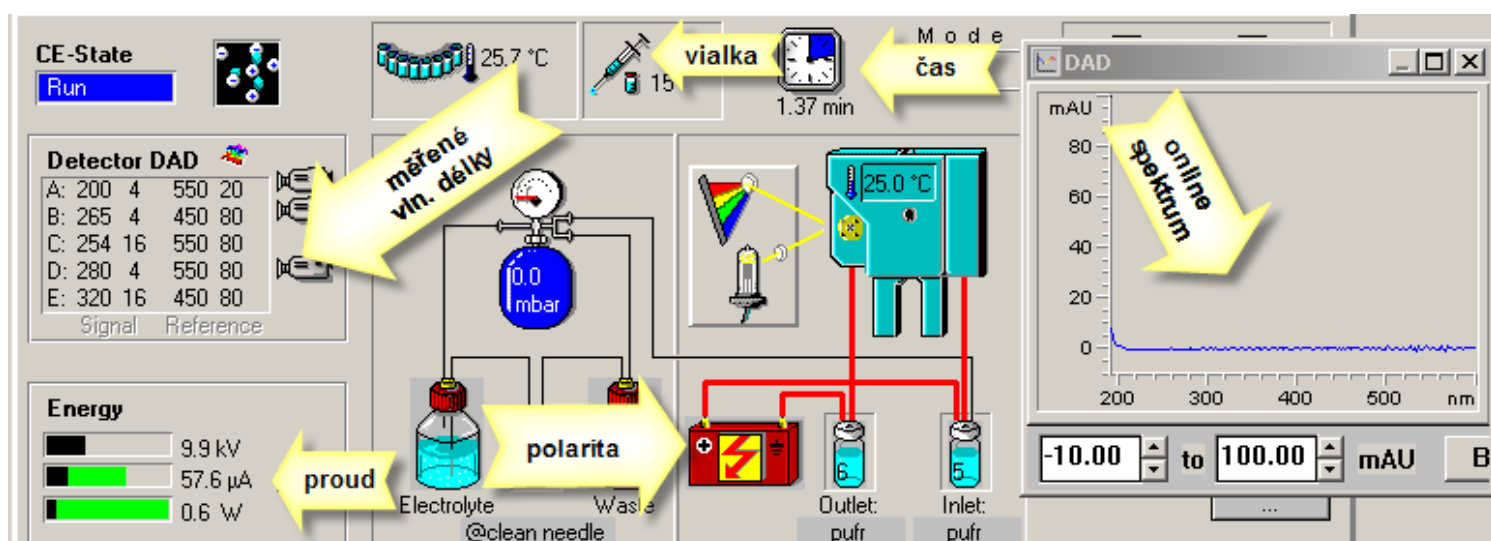
Time
 Stoptime: asCE 6.50 min
 Posttime: Off min

Timetable

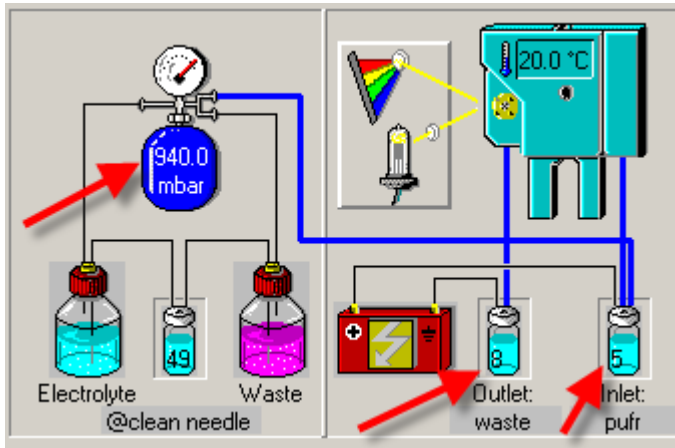
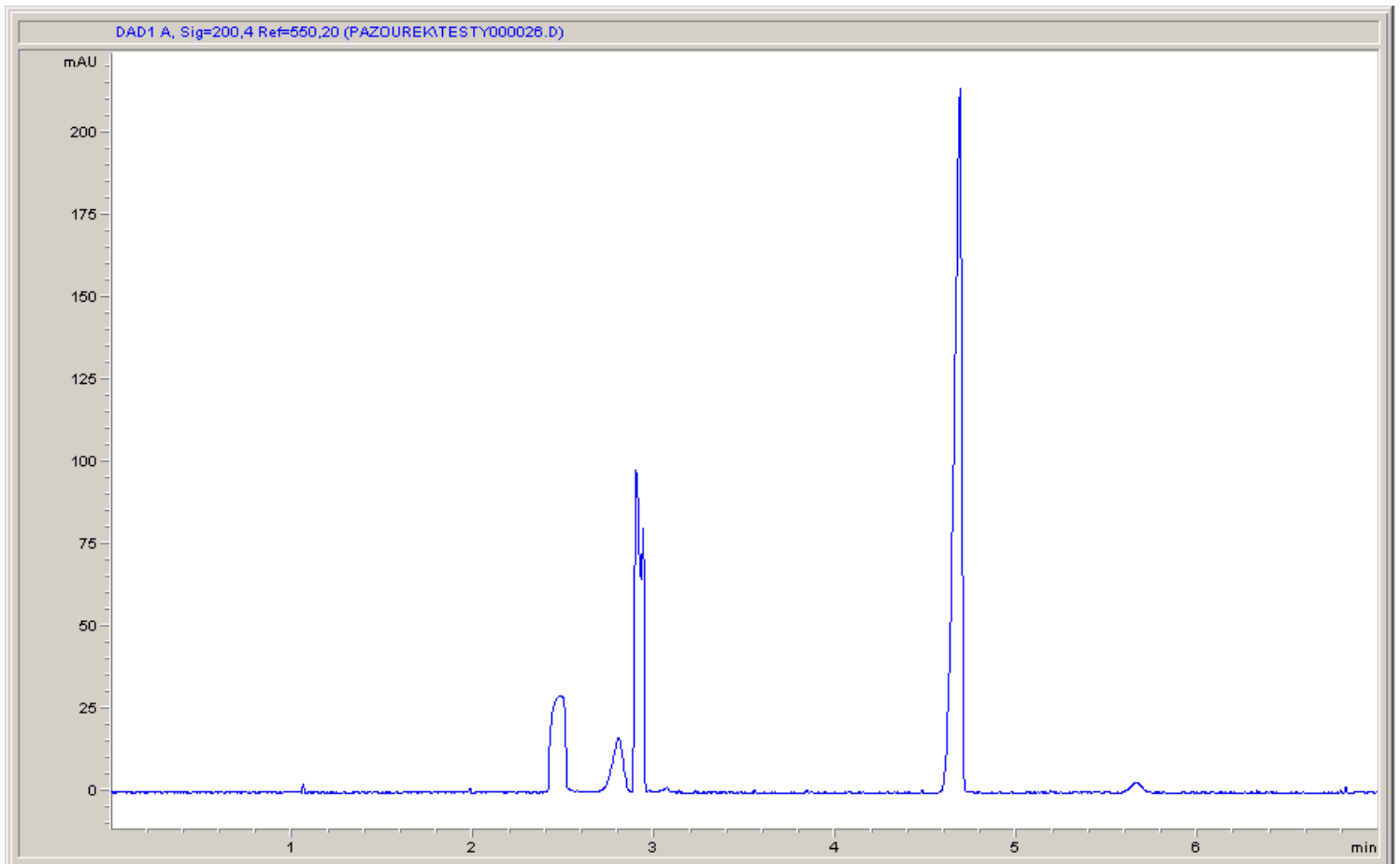
min	Function
-----LastLine-----	

Buttons: OK, Cancel, Help

diagram systému při měření:



typický elektroferogram



flush= promývání pufrém při 20°C

