

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography, HPLC)

Stanovení kofeinu v léčivu Acifein

Obecný popis: Skripta - Jampílek *et al.*, str. 60-63

old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc

<http://biochemie.sweb.cz/index.htm>

<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

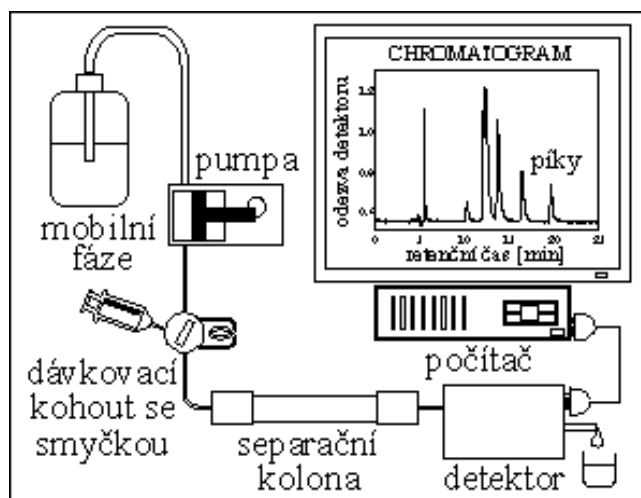
<http://www.hplc.cz>

I. TEORIE HPLC

Je **separační** metoda založená na dynamickém (v toku) rozdělování analytu mezi dvě (nesmíselné) fáze – **fázi mobilní** (kapalina) a **fázi stacionární** (zakotvená kapalina nebo tuhá fáze). Analyt, který v tomto systému vykazuje větší afinitu ke stacionární fázi je v koloně více zadržován a proto přichází na detektor později než analyt jiný, který naopak strávil více času ve fázi mobilní – takto dochází k jejich oddělení, separaci.

1 Kapalinová chromatografie - HPLC

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika **HPLC**. Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je buď film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče anebo pevný adsorbent. Příklad, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá **kapalinový chromatograf**.



Schematický náčrt kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor.

Stacionární fáze

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi **silikagelu** (3-10 um), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například **nepolárními uhlovodíky** (C8 – silyl+oktyl, **C18 = silyl+oktadecyl**), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN a pod).

Mobilní fáze

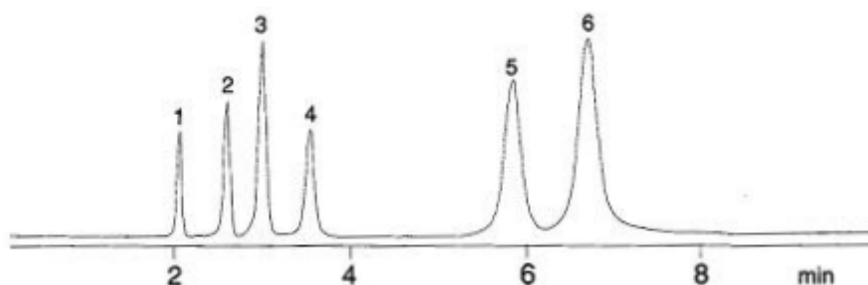
Mobilní fází v RP HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Na rozdíl od plynové chromatografie, zde mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (kvalitu separace) – viz dále.

Klíčovým pojmem pro výběr vhodných podmínek separace (směsi analytů), je **eluční síla** mobilní fáze. Tato síla je vždy vztažena na konkrétní systém (konkrétní stacionární fázi), a ukazuje schopnost eluovat analyt ze stacionární fáze („soupeřit“ se stacionární fází o analyt) v procesu kontinuálního transportu mobilní fáze kolonou.

Dobrým odhadem eluční síly je (v případě neionizovaných analytů, tzn. když můžeme zanedbat iontové interakce) polárnost - jak analytu, tak obou fází. Podle distribuce parciálních nábojů (z posouzení elektronegativity přítomných atomů) dané molekuly můžeme pak usuzovat na jejich vzájemnou afinitu: polární analyt bude mít vysokou afinitu k polární fázi a nepolární analyt k fázi nepolární. V našem případě nepolární stacionární fáze (C18), tedy můžeme předpokládat a) že tato fáze bude více zadržovat méně polární analyty, resp. b) že eluční síla mobilní fáze bude růst s rostoucím obsahem její méně polární složky (acetonitrilu).

Chromatogram

Chromatogram je časový záznam odezvy detektoru; typicky je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.



Ukázka chromatogramu. Každý pík (č. 1 - 6) odpovídá jedné složce analyzované směsi. Vodorovná osa znázorňuje čas. Čas, který odpovídá vrcholu píku, je tzv. **retenční čas**, který je na dané koloně a za daných experimentálních podmínek pro každou látku charakteristický.

Pokud je zkoumaná směs dobře rozdělena, pak každý pík na chromatogramu odpovídá **jedné ze složek** směsi. Poloha píku na ose x uváděná pomocí **retenčního času** (určeno podle polohy vrcholu)

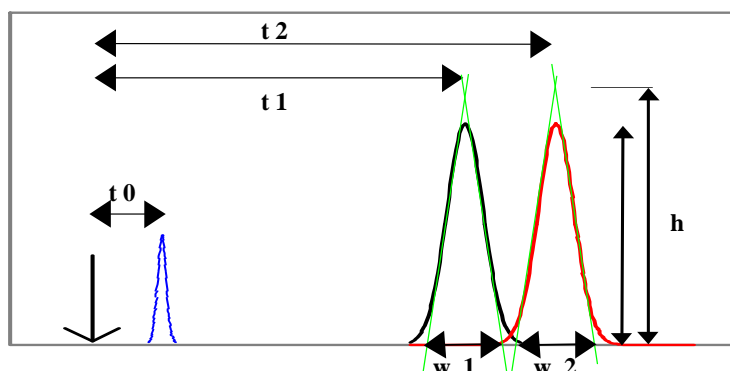
určuje, o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), **plocha píku** (nebo jeho výška v případě symetrických píků) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza).

Identifikace píků (látek) se provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede nástřik ověřovaného standardu (nebo připravené směsi o známém kvalitativním složení). Pokud se retenční čas píku na chromatogramu neznámé směsi shoduje s retenčním časem píku známého standardu, pak se jedná velmi pravděpodobně o stejnou látku.

Koncentrace látek ve směsi se určuje z ploch nebo výšek píků metodou **kalibrace**.

Vyhodnocení chromatogramu

Jak bylo řečeno, kvalitativní charakteristikou látky je retenční čas t_r píku. Pokud jsou navíc píky symetrické, jako kvantitativní ukazatel obvykle používáme výšku v maximu píku (h_{max}). Pokud chceme pracovat přesněji, měříme plochu píku A . Pro zjištění plochy nejjednodušeji postupujeme tak, že pík aproximujeme trojúhelníkem (viz obrázek), protože pak pro výpočet plochy lze použít vztah $A=1/2 \cdot h \cdot w$, kde h je výška trojúhelníka a w příslušná délka základny trojúhelníka. Moderní software (Chemstation, Clarity, Chromeleon...) dokáže provést numerickou integraci v graficky přívětivém prostředí; v zásadě však musíme nějak definovat začátek a konec píku.



Při vyhodnocování chromatogramu dále obvykle počítáme hodnoty N nebo N_{ef} a R_s . Počet efektivních teoretických pater N_{ef} je **mírou účinnosti** kolony, je vysoký pro „úzké“ (základna píku $w \rightarrow 0$) a zadržované ($t_r \rightarrow \infty$) píky.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{w_t^2} \qquad N_{ef} = 16 \frac{(t_r - t_0)^2}{w_t^2}$$

Kde t_0 je čas analytu nezadržovaného kolonou (mrtvý čas). Pro srovnání účinnosti různě dlouhých kolon se zavádí výškový ekvivalent teoretického patra H (L je délka kolony)

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

ROZLIŠENÍ

$t_r - t_0$ (retenční minus mrtvý čas) se nazývá redukovaný retenční čas (pozn. t_r a w musí být vyjadřovány ve stejných jednotkách např. mm !!!). 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 (odseparované).

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

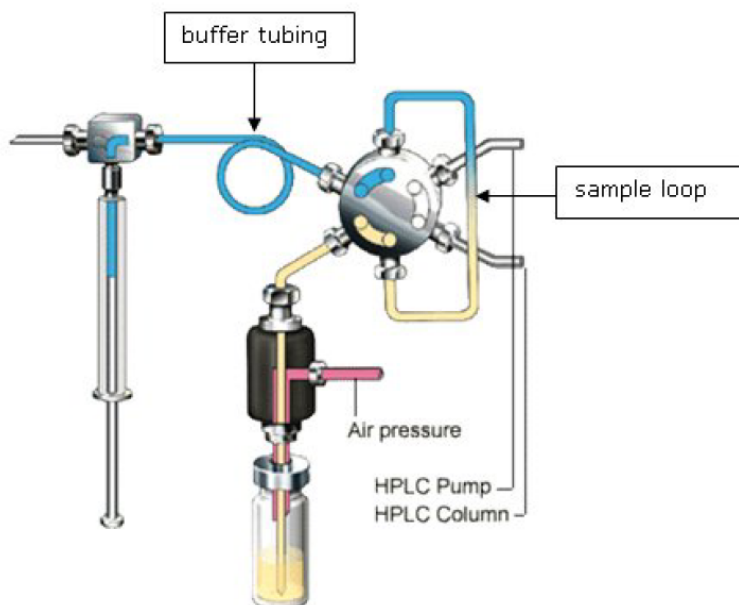
Retenční chování daného solutu A se v chromatografii charakterizuje

kapacitním poměrem (faktorem) $k = \frac{tr(A) - t_0}{t_0}$ (=míra afinity ke SF) nebo

retenčním (retardačním) faktorem $Rf = \frac{u(A)}{\bar{u}} = \frac{1}{1 + k}$ (=zlomek ret. času, který A stráví v MF), kde

$u(A)$ = průměrná rychlost složky A, u = průměrná rychlost MF.

Schéma dávkovacího zařízení YL 9100



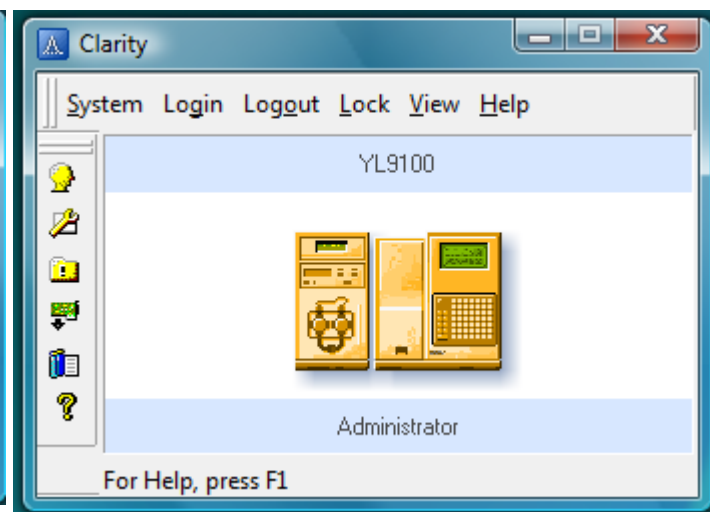
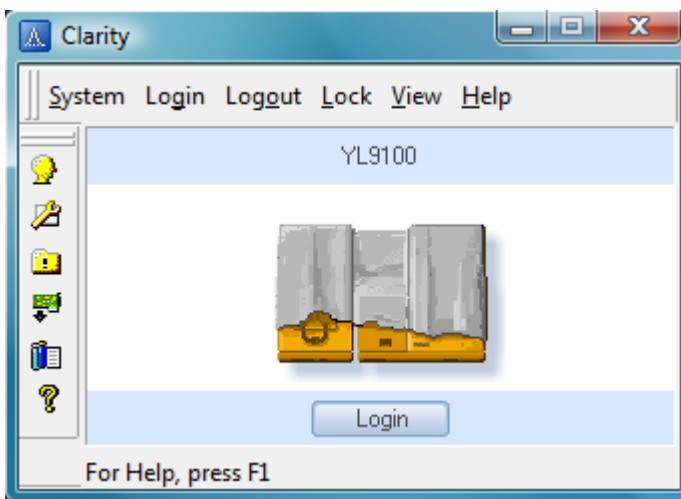
II. INSTRUMENTACE

Budeme používat systém YL9100 Young Lin Instrument Co., Ltd., Soul, Jižní Korea, který je plně ovládán softwarem Clarity.



SOFTWARE CLARITY

Pořadí zapínání: autosampler, degasser, pumpa, termostat, poslední PDA, pak spouštím software Clarity:



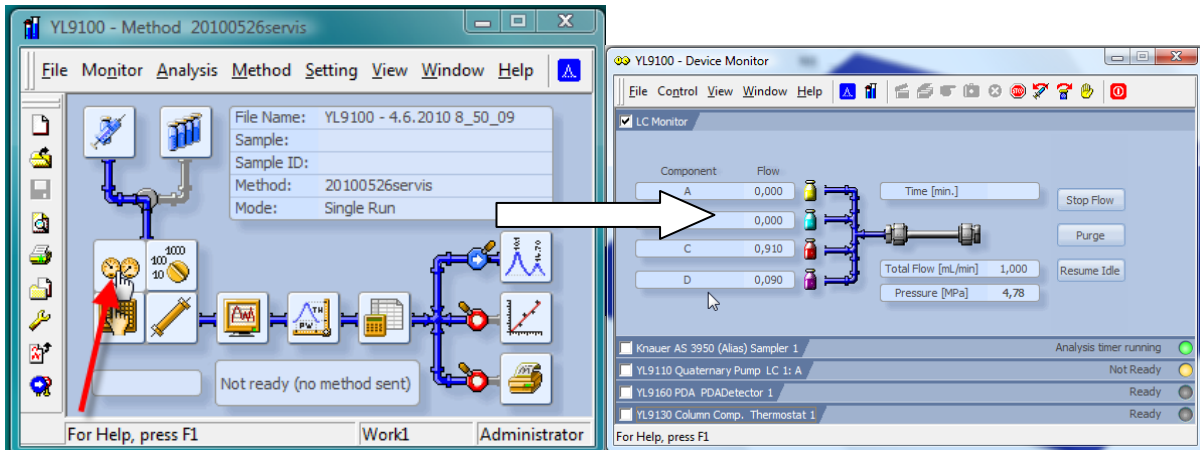
All possible instruments? OK

LOGIN: project ACIFEIN

V PŘÍPADĚ POTŘEBY provádíme jednorázové operace pro zprovoznění systému:

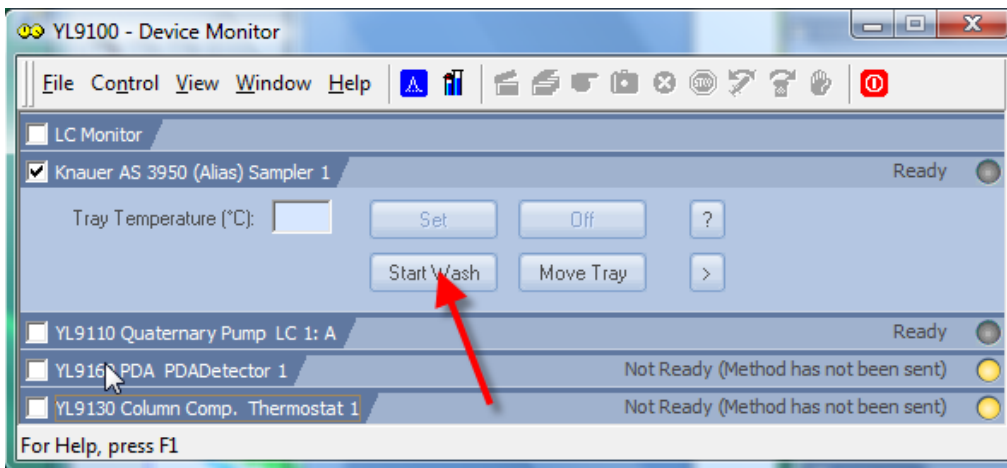
1/ Příprava pumpy

Přímé ovládání:

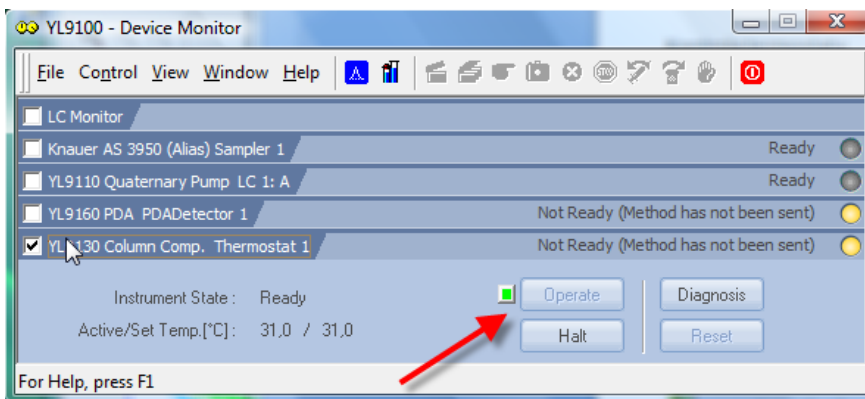


Promývání kanálů (PURGE) se provádí pouze v případě výměny zásobních lahví. V našem případě se používá isokratická eluc epředmíchanou směsí z kanálu C. Před započítím analýz je nutné kolonu kondicionovat alespoň 15 min promýváním (Purge 100%C nebo Method send).

2/ Příprava autosampleru



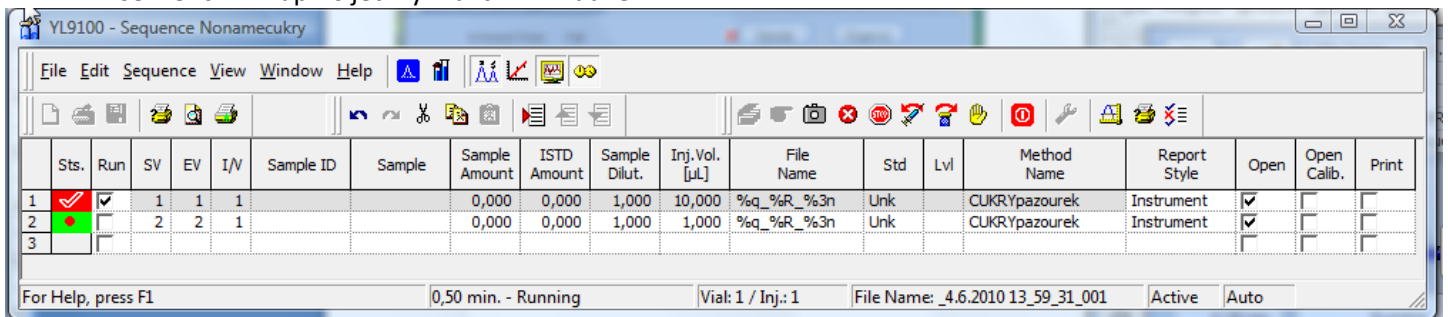
3/ Kontrola termostatu



zkontroluj, zda na modulech nesvítí chybová LED (červená) – nejčastěji na PDA modulu. V tom případě na Device Monitor, PDA Detector striskni „Fault Reset“

3/ PROVEDENÍ EXPERIMENTU

Na rozdíl od softwaru Chemstation, použití autosampleru vylučuje mód Single run (ten je jen pro manuální nástřik). I v případě spuštění jediného experimentu s autosamplerem se tedy používá mód sekvenční – např. s jediným aktivním řádkem.

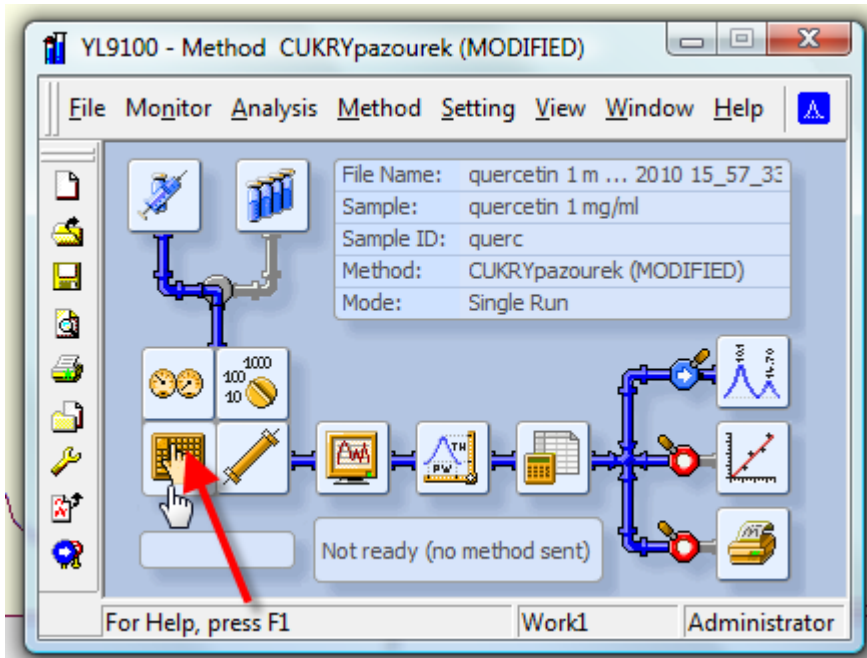


	Sts.	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD Amount	Sample Dilut.	Inj. Vol. [µL]	File Name	Std	Lvl	Method Name	Report Style	Open	Open Calib.	Print
1	✓	✓	1	1	1			0,000	0,000	1,000	10,000	%q_%R_%3n	Unk		CUKRYpazourek	Instrument	✓		
2	✓		2	2	1			0,000	0,000	1,000	1,000	%q_%R_%3n	Unk		CUKRYpazourek	Instrument	✓		
3																			

For Help, press F1 0,50 min. - Running Vial: 1 / Inj.: 1 File Name: 4.6.2010 13_59_31_001 Active Auto

Nejdůležitějším v zadání experimentu je přiřazení metody, tj. souboru parametrů, podle kterých pracuje každý z modulů: zde je připravena metoda ACIFEIN_6.MET

4/ Příprava metody:



Method Setup CUKRYpazourek

	Time [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Flow [mL/min]
1	Initial	0,0	0,0	91,0	9,0	1,000
2						

Standby Flow: 1 mL/min
 Time to Standby: 0 [min]
 Standby Time: 0 [min]

Idle State:
 Pump Off
 Initial
 Standby
 Initial - Standby

Options...

Event Table AS LC Gradient LC Measurement Acquisition Thermostat Integration PDA Method Calculation Advanced

OK Cancel Send method Report Audit Trail Help

Method Setup D:\clarity\ACIFEIN\ACIFEIN_6

Select Sampler: Sampler 1 Enabled

YL9150 Sampler Method

Mode, Time and Temp. | Inputs and Outputs | Mix Methods | System Settings | Tray

Analysis Time [min]: 4,0
 Injection Mode: **µl Pick up**
 Flush Volume [µl]: 60

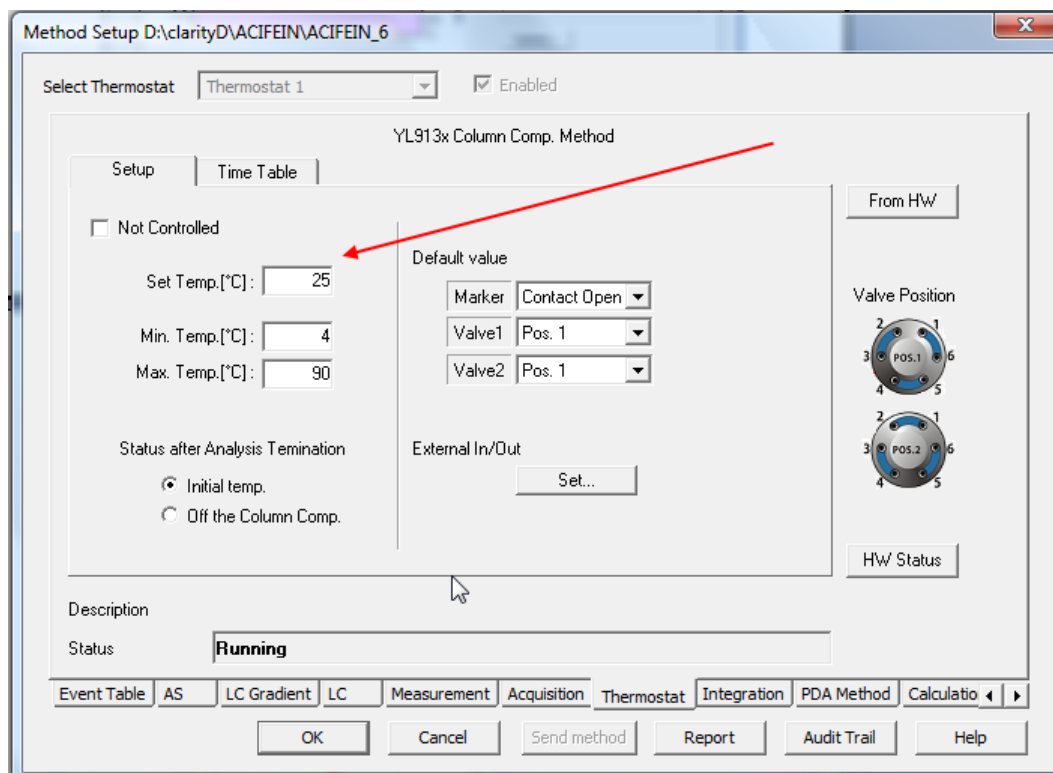
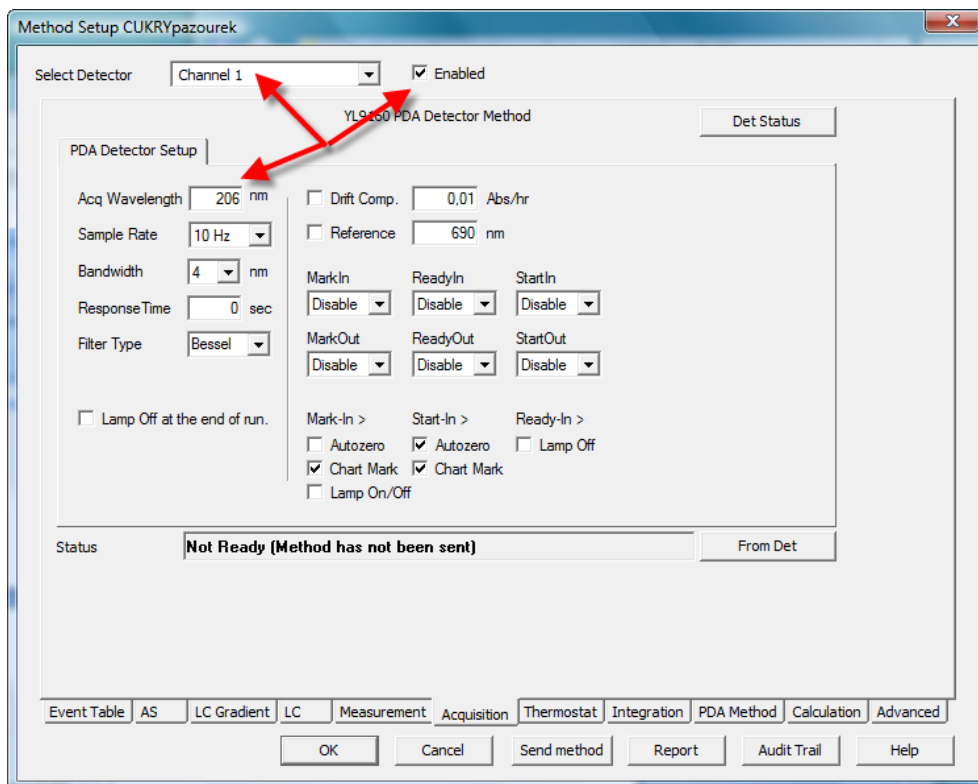
Wash: between Vials
 Wash Times: 1

Preparative Mode

Status: Analysis timer running AS Status

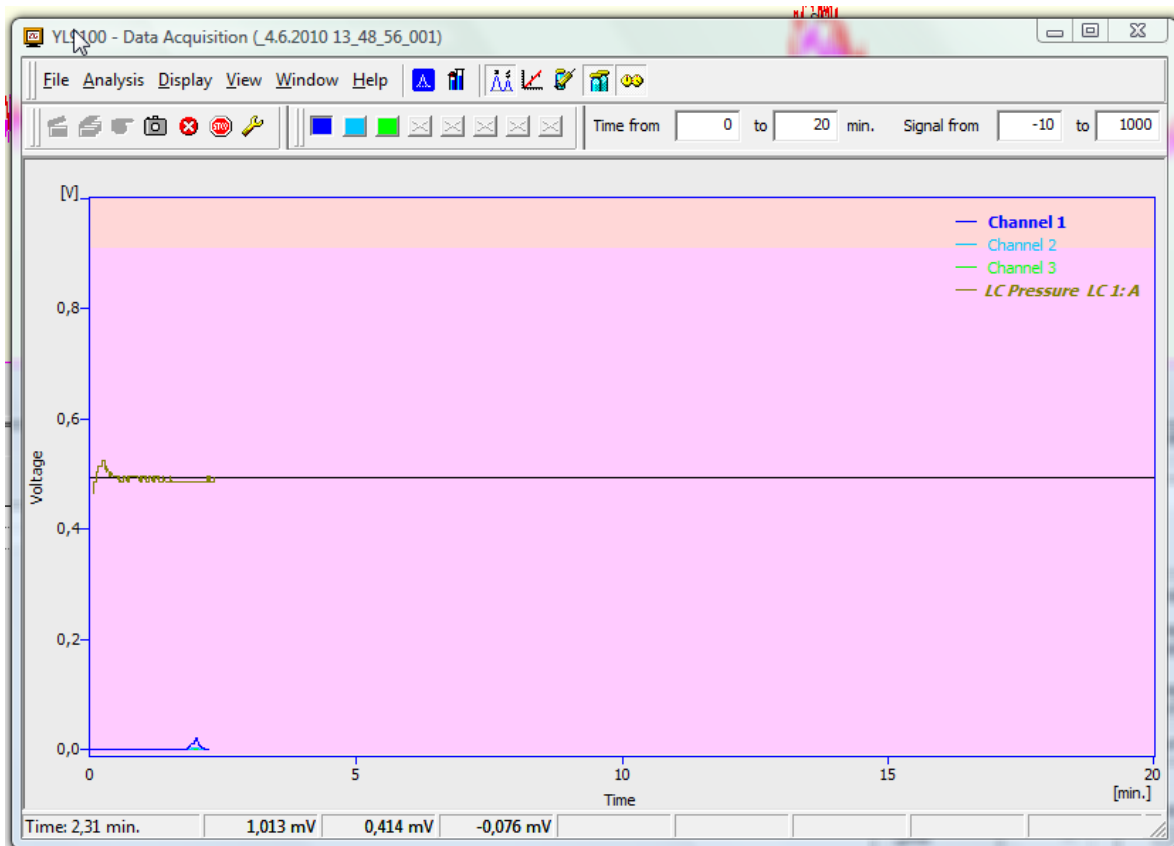
Event Table AS LC Gradient LC Measurement Acquisition Thermostat Integration PDA Method Calculation

OK Cancel Send method Report Audit Trail Help

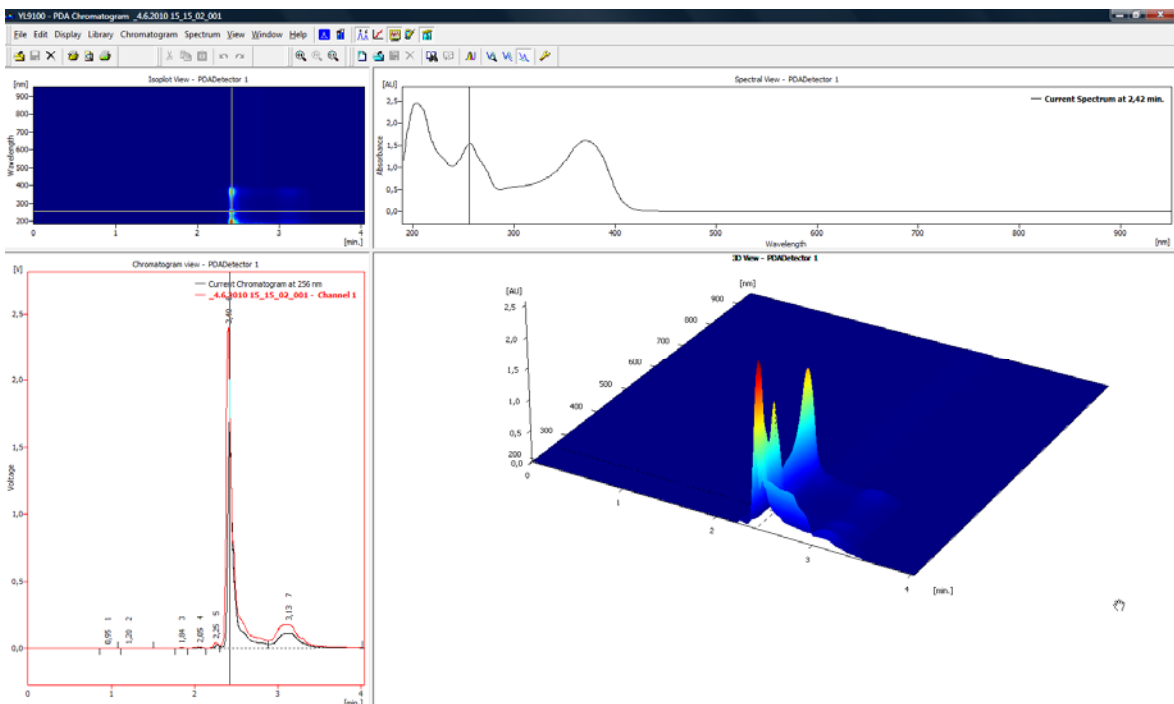


Nejdůležitější karty metody jsou: AS |LCgradient |Acquisition|Thermostat| | |

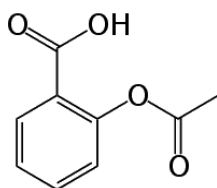
Okno detektoru



Spektrální okno PDA detektoru

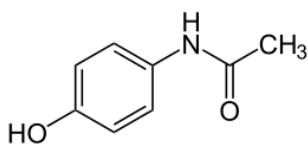
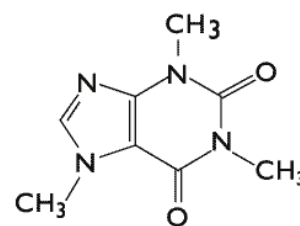


III. ÚKOL



Kyselina acetylosalicylová (*acetylsalicylic acid, Aspirin™, Acylpyrin™*) je široce používané léčivo s antipyretickými a analgetickými účinky.

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 bolesti a zvýšené tělesné teplotě, není však protizánětlivé. Patří do indikačních skupin analgetikum a antipyretikum.



V této práci bude stanovován obsah kofeinu v komerčně vyráběném léčivu ACIFEIN (HERBACOS-BOFARMA, s.r.o.).

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

Držitel rozhodnutí o registraci a výrobce
HERBACOS-BOFARMA s.r.o., Pardubice, Česká republika

Složení

Léčivé látky:

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

Pomocné látky:

Glycin, kukuřičný škrob, mastek, hyprolosa

Pracovní postup:

Stacionární fáze: C18 (Supelcosil ABZ+plus, 150x4,6 mm), 3 μ m částice

Mobilní fáze (MF): 11% acetonitril: 89%voda, isokratická eluce,

Bude používána metoda ACIFEIN_6.MET, kanál C (předmíchaná fáze),

dávkování = pickup 2-10 μ L, konkrétní objem určí vedoucí cvičení

Příprava vzorku:

Zvaž **10 tablet** a spočítej průměrnou hmotnost jedné tablety. Vyber **jednu tabletu**, zvaž ji, dokonale rozetři na prášek a 25 mg rozpušť v methanolu a doplň na **50,00 ml**. Přítomnost aditiv **znemožňuje úplné** rozpuštění tablety. Všechny stanovované komponenty (analyty) se ale kvantitativně rozpustí **do 10 minut**. Do vialky filtruj! (15 minut)

Zásobní roztok standardu (kofein) připravíme do 100 ml odměrky, přibližná koncentrace **$c \approx 0.5$ mg/ml**, v 100% methanolu. Z tohoto roztoku nařed' kalibrační roztoky (**10,00 ml/25,00 ml**) o následujících koncentracích:

5, 25, **40**, 50 μ g/ml (30 minut)

Proved' opakovaný nástřik každého standardu i vzorku (3x) (90 minut)

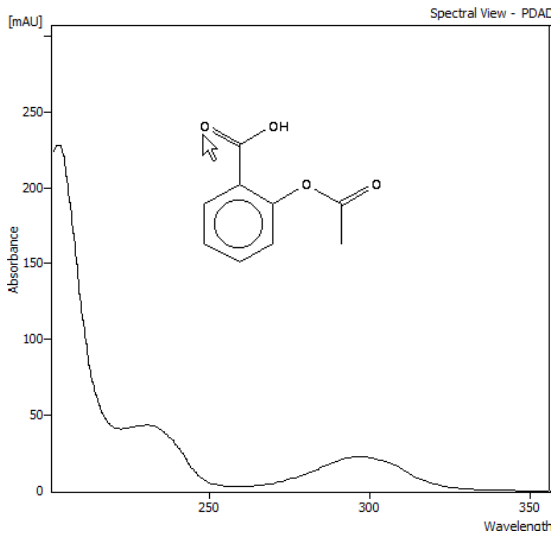
Vyhodnocení

1/ Ze získaných dat zkounstruu lineární kalibrační křivku (lineární regresi) a vypočti množství kofeinu v průměrné tabletě. Srovnej tuto hodnotu s deklarovanou (50 mg/tabletu).

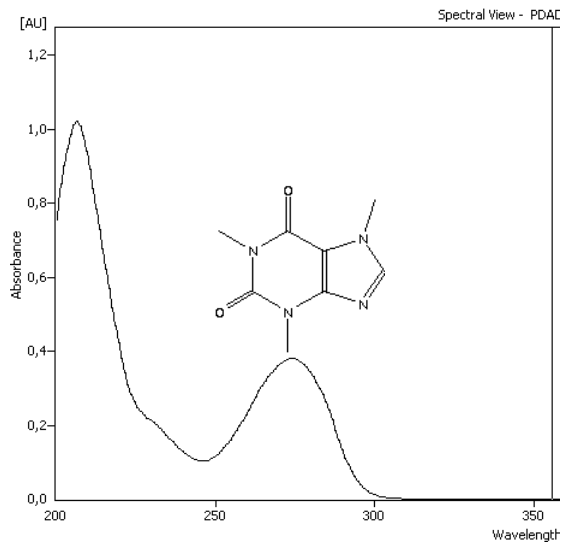
2/ Identifikuj podle spekter jednotlivé píky v chromatogramu vzorku (použijte knihovnu spekter nebo obrázků spekter standardů)!

3/ Spočítej rozlišení píků paracetamolu a kofeinu (R_s) a účinnost kolony N pro a) paracetamol, b) kofein!

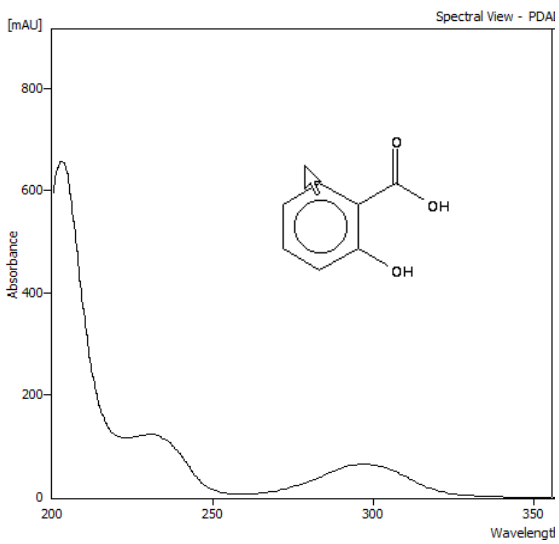
Standardy, cca 200 ppm - spektra



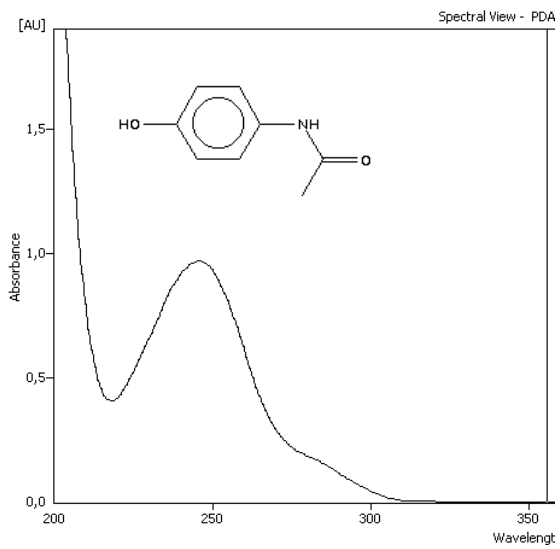
ASA 231 / 296 nm



kofein (206) 274 nm



SA 231 / 297 nm



APAP 246 nm