

MUNI PHARM



Zkouška disoluce a metody stanovení obsahu: Kapalinová chromatografie

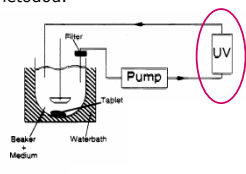

Doc. Mgr. Jan Muselík, Ph.D.

Instrumentální analytické metody ve farmaceutické technologii Ústav farmaceutické technologie

45

Průběh uvolňování účinné látky z lékové formy při disoluci sledujeme vhodnou analytickou metodou.

Velmi často používanou metodou je UV/VIS spektrometrie (on-line). Okamžité stanovení obsahu účinné látky pomocí UV/VIS spektrometrie se používá u disoluce v případě, že sledovaná látka absorbuje záření při vlnových délkách, kde **neabsorbují** jiné látky obsažené v měřeném roztoku. Pokud tomu tak není, je nutné účinnou látku nejprve oddělit od ostatních pomocí některé separační techniky (např. kapalinová chromatografie).

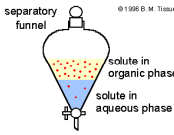



46

Kapalinová chromatografie

Princípem je rozdělování, čili afinita dělených látek ke dvěma fázím (např. rozdělování na základě různé rozpustnosti, adsorpce, chemisorpce, iontové výměny, ...).

Chceme-li od sebe oddělit dvě látky přítomné ve vodném roztoku, z nichž jedna je rozpustná v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou a druhá látka v něm rozpustná není (nebo méně než první), můžeme provést extrakci (mnohonásobnou extrakci).



Prakticky proveditelnější řešení je imobilizovat jednu z fází, řekněme organické rozpouštědlo, např. adsorpci na vhodném inertním nosiči, a nechat druhou, vodnou fázi, obsahující dvě oddělované látky, zvolna protékat podél této imobilizované fáze. Opět budou probíhat extrakční děje a látky budou přecházet z jedné fáze do druhé.

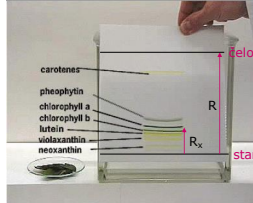
47

Složky, které se poutají více, se pohybují pomaleji a v systému jsou déle zadržovány, než složky vzorku, které se ke stacionární fázi poutají méně. Tímto jednoduchým principem dojde k rozdělení složek směsi.

Rozdělení chromatografie podle uspořádání:
 a) Planární (tenkovrstvá, papírová)
 b) Kolonová (kapalinová, plynová)

Planární chromatografie – vyhodnocení dat

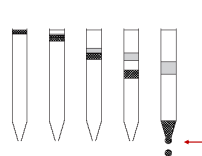
Retenční faktor:
 vzdálenost od startu ke středu skvrny
 $R_f(X) = R_x / R$



48

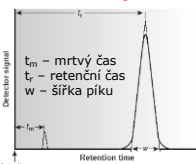
Kolonová chromatografie

Jak se vzorek pohybuje kolonou dolů (unášen mobilní fází) začíná docházet k dělení (na základě různé silných interakcí dělených látek se stacionární fází).



← detektor

Chromatogram



Detector signal

Retention time

Injection

t_m – mrtvý čas
 t_r – retenční čas
 w – šířka píku

49

Cílem chromatografie je rozdělit vzorek na sérii chromatografických píků, každý reprezentující jednu složku vzorku. **Rozlišení** je kvantitativní vyjádření stupně rozdělení mezi dvěma chromatografickými píky.

$$R = \frac{t_{r,B} - t_{r,A}}{0.5(w_B + w_A)} = \frac{2\Delta t_r}{w_B + w_A}$$

$R = 1,5$

$R < 1$


$R > 1,5$

Účinnost

Počet teoretických pater

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

růst separační účinnosti



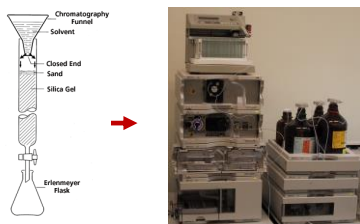
The column

Theoretical plate

50

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- ▶ použití stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti
- ▶ průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem



51

Instrumentace

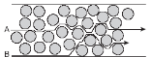
- sběrač frakcí
- detektory – fluorimetrický a spektrofotometrický (DAD)
- termostatovaný blok s kolonou
- dávkovací zařízení – reprodukovatelný nástřik vzorku do toku mobilní fáze, lze automatizovat (autosampler)
- zásobníky mobilních fází
- vakuový degasser – odstranění rozpuštěných plynů z mobilní fáze
- pumpa

52

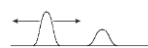
Separční účinnost závisí na **typu a velikosti částic stacionární fáze, teplotě, rychlosti průtoku mobilní fáze a jejím složení.**

Vliv rychlosti průtoku MF na rozšíření píků

A. Turbulentní (vířivá) difuze

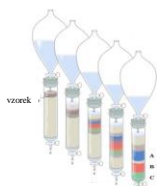


B. Podélná difuze

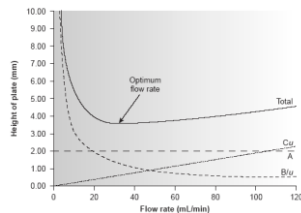


C. Odpor proti převodu hmoty

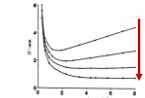
Aby látka přešla z jedné fáze do druhé, musí nejprve difundovat do rozhraní těchto dvou fází.



53

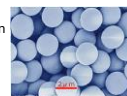


při zmenšující se velikosti částic



Kolony běžně používané (HPLC)

Délka kolony 5 – 25 cm
Průměr kolon 2 – 5 mm
Objem vzorku 1 – 20 μ l
Průtok mobilní fáze 0,2 – 1,5 ml/min
Průměr částic 2 – 5 μ m

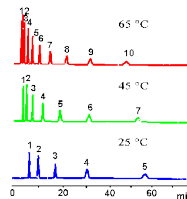


54

Vliv teploty na eluční charakteristiky separovaných látek

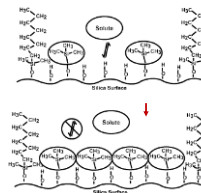
Zvýšení teploty :

- ▶ zkracuje dobu analýzy t_R (termodynamický aspekt)
- ▶ zvyšuje účinnost kolony N (kinetický aspekt)
- ▶ má vliv na rozlišení R podle toho zda převládá termodynamický nebo kinetický aspekt - nelze jednoznačně odhadnout
- ▶ snižuje tlakový spád na koloně Δp



56

Stacionární fáze



normální fáze

- silikagel (Si-OH), kyanopropyl, diol
- polární stacionární fáze
- nepolární mobilní fáze

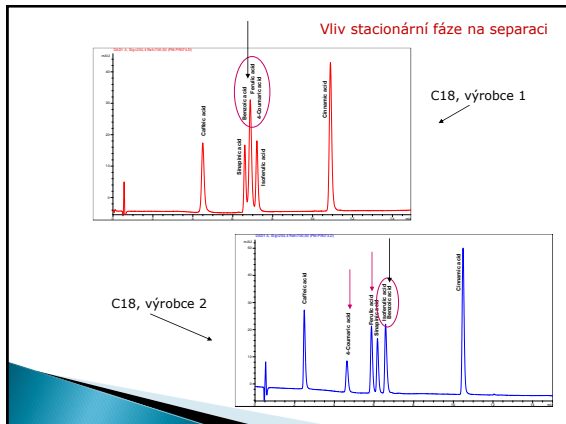
reverzní fáze

- C8, C18, fenyl
- nepolární stacionární fáze
- polární mobilní fáze

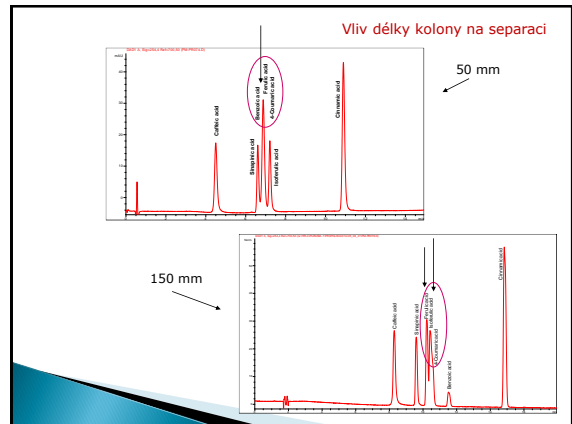
Nepolární reverzní fáze patří mezi nejpoužívanější stacionární fáze v HPLC:

- široká oblast použitelnosti
- různé modifikace
- dobrá reprodukovatelnost výsledků
- přímá aplikace na biologické systémy (krevní plazma).

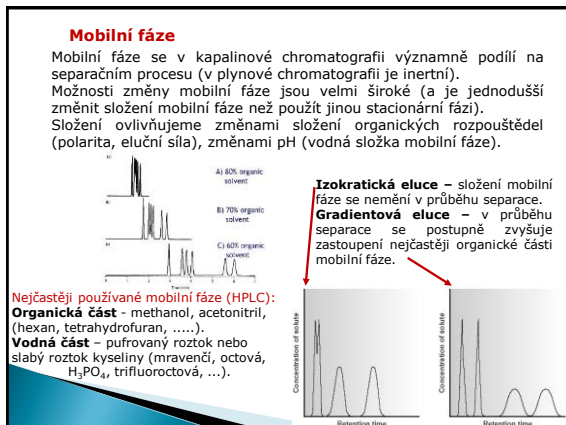
58



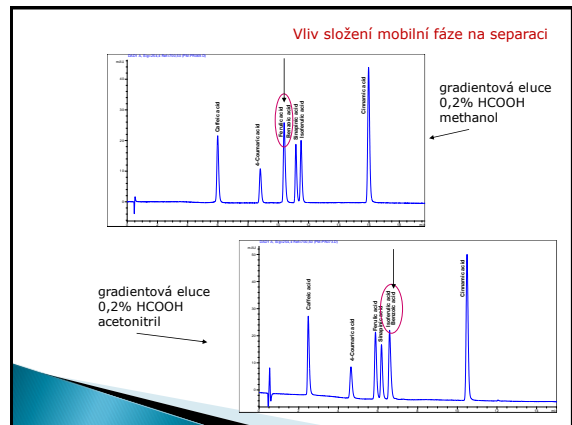
59



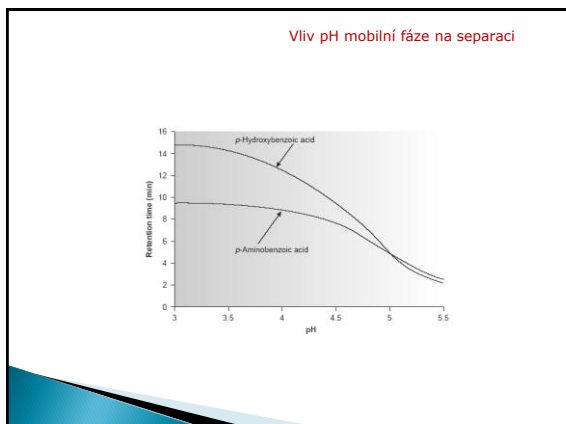
60



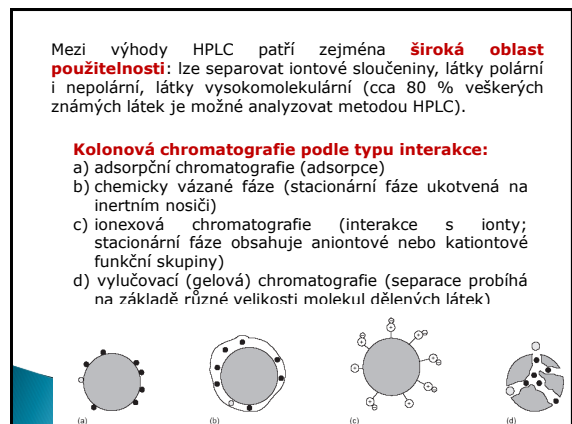
61



62

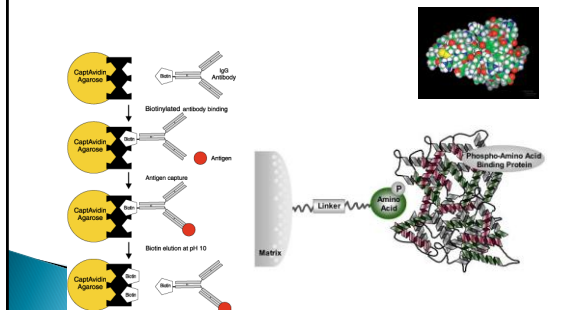


63



65

e) afinní chromatografie (biomedicína, biotechnologie) využívá specifických interakcí makromolekul s molekulami stacionární fáze (interakce enzymů s inhibitory, substráty; interakce protilátek s antigeny; ...).



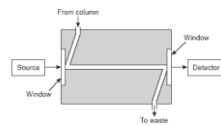
66

Detektory

Dávkuje se malá množství vzorku => jsou nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony.

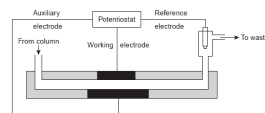
Spektrofotometrické detektory

Patří k nejpoužívanějším v HPLC (detektory s průtokovou detekční celou), lze jimi detekovat velký počet látek. Detektory s diodovým polem (DAD) - zaznamenávají celé spektrum eluované látky.



Elektrochemické detektory

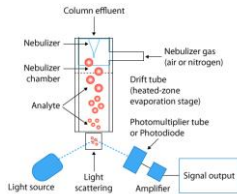
Jsou založeny buď na měření vodivosti (pro látky iontové) nebo elektrického proudu odpovídajícího oxidaci či redukcí analytů.



68

Detektory rozptýlu světla

Princip detekce je založen na zmlnění a následném odpaření mobilní fáze a převedení detekovaných látek na pevné částice. Tyto částice procházejí skrz laserový paprsek detektoru, čímž dochází k rozptýlení jeho záření. Rozptýlené záření je měřeno pomocí vhodné fotodiody.



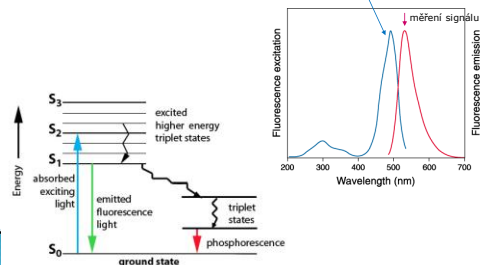
Refraktometrické detektory

Jsou to univerzální detektory. Měří změnu indexu lomu v analytické cele detektoru. Tyto změny jsou malé, a proto je refraktometrický detektor málo citlivý. Další jeho nevýhodou je nemožnost použít gradientovou eluci. Využívají se zejména v případech, kdy ostatní detektory neposkytují dostatečnou odezvu (např. neabsorbují v UV/Vis oblasti - analýza cukrů).

69

Fluorimetrické detektory

Selektivní pro látky, které mají přirozenou fluorescenci. Vzorek je ozařován zářením o určité vlnové délce (excitující záření) a produkuje záření o větší vlnové délce (emitované záření). Derivatizaci, lze převést látky bez fluorescence na látky vykazující fluorescenci.



70

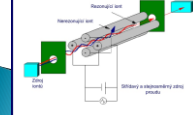
Hmotnostní detektory

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotností molekul a jejich částí po převedení na kladné a záporné ionty. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami umožňuje kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. **Iontový zdroj** - slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu.

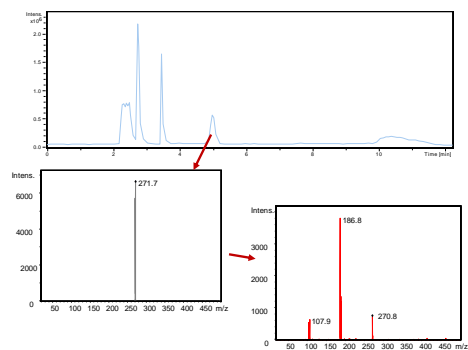
Hmotnostní analyzátor - umožňuje rozdělit směs iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji (m/z), produkovanou v iontovém zdroji.

Detektor - proud iontů z hmotnostního analyzátoru (o daném m/z) je směřován na detektor, který poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů.

kvadrupol



71



72

Vyhodnocování dat

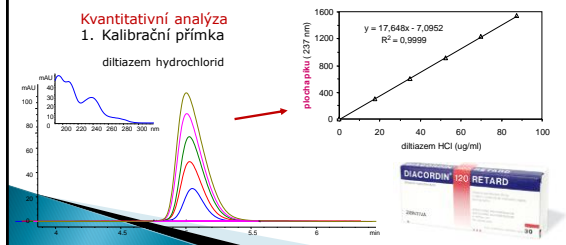
Kvalitativní analýza

1. Porovnání retenčního času se standardem
2. Vyhodnocení dat z detektoru – např. porovnání UV/VIS spektra neznámé látky a standardu, porovnání MS spektra neznámé látky a standardu.

Kvantitativní analýza

1. Kalibrační přímka

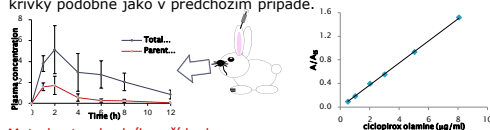
diltiazem hydrochlorid



73

2. Vnitřní standardizace

Ke vzorku se přidá vnitřní standard (roztok látky, která není obsažena ve vzorku). Po nástřiku se vyhodnotí plochy píku analytu (A) a standardu (A_{IS}). Tato metoda se používá v případech, kdy analýze předchází úprava vzorku, např. při derivatizaci nebo extrakci analytu. Při sériových analýzách se využívá kalibrační křivky podobně jako v předchozím případě.



3. Metoda standardního přidavku

Nejprve se provede nástřik vzorku a vyhodnotí se plocha. Poté se k definovanému objemu vzorku přidá objem standardního roztoku analytu o známé koncentraci. Provede se druhý nástřik a vyhodnotí se příslušná plocha. Tato metoda se používá pokud chceme stanovit analyt v komplikované matici.

74