

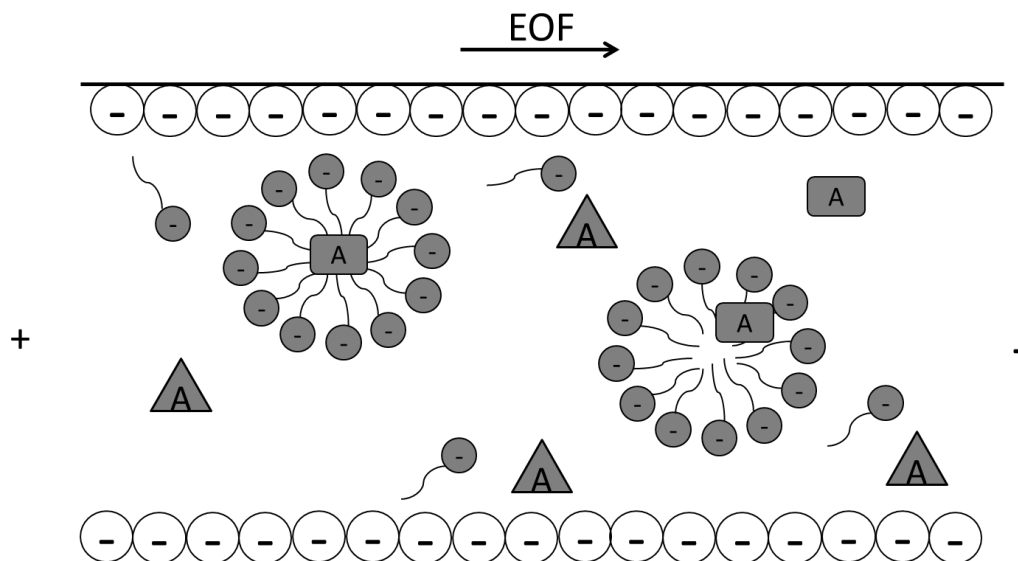
Oznaczanie kwasu askorbinowego w preparacie farmaceutycznym

Instrukcja opracowana w Katedrze Chemii Środowiska

1. Wstęp

Elektroforeza kapilarna (CE) charakteryzuje się wysoką sprawnością rozdzielania związków obdarzonych ładunkiem w bardzo małej objętości próbki, w stosunkowo krótkim czasie analizy, przy wykorzystaniu minimalnej ilości odczynników. Niestety technika ta nie znajduje zastosowania do rozdzielania cząstek obojętnych, co jest jej pewnym ograniczeniem.

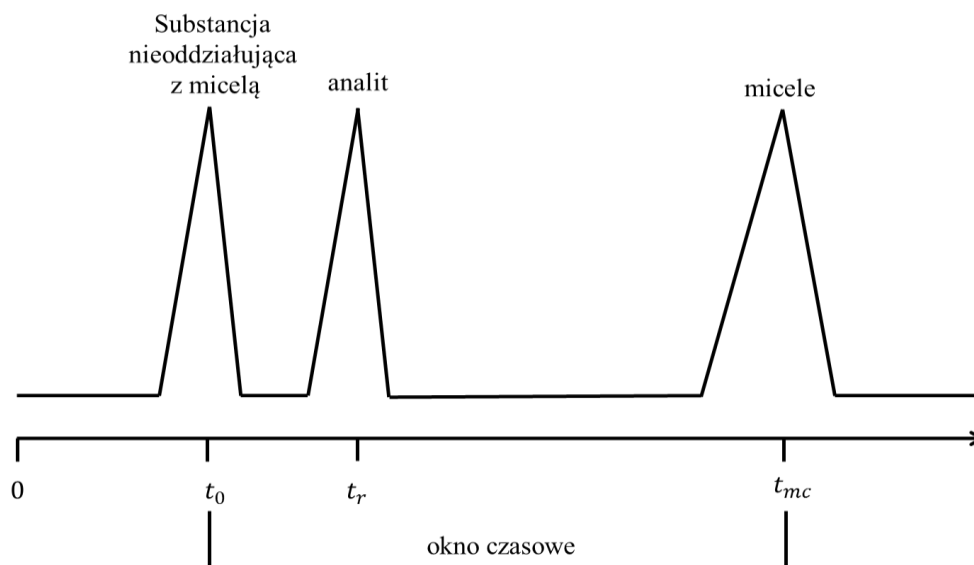
Rozwiązaniem okazała się opracowana w 1984 roku przez prof. Terabe micelarna elektrokinetyczna chromatografia (MEKC). Zasada tej techniki opiera się na zyskaniu pozornej ruchliwości elektroforetycznej przez obojętny analit w trakcie oddziaływania z micelą. Cząsteczki takie migrują w polu elektrycznym z taką samą jak micela prędkością, która jest determinowana przez współczynnik podziału analitu między fazę micelarną i otaczającą fazę wodną. W praktyce oznacza to niewielką modyfikację metody w porównaniu do kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE). Do elektrolitu podstawowego (BGE) stosowanego w CZE wystarczy dodać substancji powierzchniowo czynnej, a najpowszechniejszym związkiem stosowanym w tym celu jest dodecylosiarczan sodu (SDS). Utworzone micide można porównać do fazy stacjonarnej w chromatografii, dlatego nazywa się je fazą pseudostacjonarną. Hydrofilowe fragmenty miceli, utworzonych przez wprowadzenie do wody odpowiedniej ilości substancji powierzchniowo czynnych, zorientowane są na zewnątrz do środowiska wodnego. Micide SDS poprzez swój duży ładunek ujemny wykazują odpowiednią do posiadanego ładunku ruchliwość w kierunku przeciwnym do przepływu elektroosmotycznego (EOF), a więc do anody. Micide oddziałując z analitami hydrofobowo oraz elektrostatycznie wędrują do katody z prędkością mniejszą niż EOF, gdyż migracja miceli jest mniejsza niż EOF w alkaliczym i obojętnym środowisku. Czas migracji analitu jest tym dłuższy im silniej oddziałuje on z micelą, gdyż hamuje ona jego wędrówkę z EOF, natomiast anality nieoddziałujące z micelami migrują razem z EOF. Schemat takiej separacji składników próbki przedstawiono na poniższym rysunku.



Separacja składników próbki za pomocą MEKC z wykorzystaniem anionowych środków powierzchniowo czynnych [1]

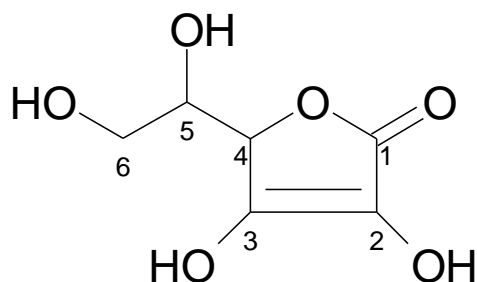
Powyższe rozważania wskazują na fakt, iż MEKC jest techniką pozwalającą na rozdzielanie obojętnych składników próbki, jednak umożliwia ona też selektywną separację związków jonowych. Na migrację w MEKC wpływ ma głównie hydrofobowość, ale na rozdzielanie analitów w tej technice wpływ mają także stosunek ładunku do masy oraz oddziaływania między ładunkami.

Ważnym terminem, który nie pojawia się w CZE, jest tak zwane okno czasowe ($t_0 - t_{mc}$). Czas migracji oddziałującego z micelą analitu (t_r) znajduje się pomiędzy czasem migracji związku, który nie oddziałuje z micelą lub oddziałuje w bardzo nieznaczny sposób (na przykład metanol) a czasem migracji związku, który oddziałuje z micelą całkowicie (t_{mc}) (może być to Sudan III, Sudan IV lub siarczan chininy). Opisane okno czasowe przedstawia elektroforegram na rysunku poniżej.



Elektroforegram przedstawiający okno czasowe w MEKC [1]

MEKC jest narzędziem analitycznym pozwalającym na oznaczanie witaminy C rozpuszczonej w wodzie. Głównym biologicznie aktywnym związkiem witaminy C jest kwas askorbinowy (AA), którego nazwa pochodzi od jego właściwości zapobiegania skorbutowi, który w historii był bardzo powszechnie spotykaną chorobą u osób z niedoborem witaminy C. Obecnie nie notuje się częstych przypadków zachorowania na tą przypadłość ze względu na szeroki dostęp do świeżych owoców i warzyw. AA jest związanym z glukozą sześciowęglowym związkiem. W stanie suchym jest bezwonnym, krystalicznym ciałem stałym w postaci płytek lub igieł, o kwaśnym smaku i barwie od białej do bladożółtej (ciemniej stopniowo pod wpływem światła). Jego cząsteczka jest hydrofilowa, ze względu na występujące w strukturze ugrupowania hydroksylowe, przez co dobrze rozpuszcza się w wodzie, jak i rozcieńczonych alkoholach. Wartość pH 2% roztworu wodnego AA mieści się w przedziale od 2,4 do 2,8. Na kwasowy charakter tego związku ma wpływ obecność ugrupowania endiolowego pomiędzy atomami węgla C-2 i C-3, co można zauważyć we wzorze tego związku przedstawionym na poniższym rysunku.



Kwas L-askorbinowy- wzór strukturalny

Wśród funkcji biologicznych witaminy C można wyróżnić potencjał w zapobieganiu zachorowań na nowotwory i leczeniu ich, korzystny wpływ na układ odpornościowy i oddechowy, wspomaganie procesu uczenia i pamięci oraz pozytywny wpływ na stan psychiczny. AA uczestniczy także w syntezie kolagenu, czy pomaga podczas zabiegów kardiologicznych. Witamina C bierze też udział w przemianach niektórych leków, na przykład związków aromatycznych, steroidów, tłuszczów, między innymi wspomaga powstawanie kwasów żółciowych z cholesterolu, wspomaga również gojenie się ran, utrzymanie ciśnienia tętniczego na prawidłowym poziomie i higienę dziąseł. Bardzo ważną funkcją witaminy C jest też obniżenie poziomu cukru w stanach hiperglikemii, czy na czczo u osób chorych na cukrzycę.

Powszechnie wiadomo, że witamina C występuje w owocach, warzywach oraz ziołach, jednak można ją też znaleźć w mięsie oraz nabiale. Zawartość AA może różnić się w tych produktach w zależności od gatunku, pochodzenia, pory roku, warunków meteorologicznych, sposobu przygotowania, czy nawet warunków przechowywania. AA charakteryzuje się niską trwałością w podwyższonej temperaturze, stąd należy zwrócić szczególną uwagę na sposób przygotowania potraw, aby uniknąć strat witaminy C podczas obróbki termicznej.

2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest sporządzenie krzywej kalibracyjnej dla kwasu askorbinowego oraz analiza ilościowa próbki preparatu farmaceutycznego za pomocą MEKC z detekcją UV-Vis oraz porównanie otrzymanej zawartości witaminy C z wartością deklarowaną przez producenta.

3. Odczynniki i aparatura

- aparat do elektroforezy kapilarnej HP^{3D}CE z detektorem DAD,
- pipety automatyczne,
- probówki polipropylenowe o pojemności 1,5 ml,
- SDS o stężeniu 0,2 mol/l w buforze boranowym o stężeniu 0,03 mol/l oraz pH 8,25,
- roztwór standardowy kwasu L-askorbinowego o stężeniu 3 mg/ml,
- preparat farmaceutyczny zawierający witaminę C,
- woda dejonizowana.

4. Wymagane środki ostrożności:

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):

Dodecylosiarczan sodu: - F Produkt wysoce łatwopalny R11, Xi Produkt drażniący; R37/38/41, Xn Produkt szkodliwy; R22.

- ✓ Pierwsza pomoc:
 - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
 - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
 - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
- w przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wypłukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

5. Wykonanie ćwiczenia:

1. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej:

W probówkach polipropylenowych przygotować roztwory kwasu L-askorbinowego o stężeniach 0,035, 0,12, 0,18, 0,25 oraz 0,35 mg/ml w objętości 1 ml, wykonując odpowiednie rozcieńczenia roztworu standardowego kwasu L-askorbinowego o stężeniu 3 mg/ml.

Poddać analizie elektroforetycznej roztwory krzywej kalibracyjnej wykorzystując zoptymalizowane warunki elektroforetyczne:

- kapilara krzemionkowa o wymiarach 64,5 cm × 75 μm,
- 0,03 mol/l bufor boranowy o pH 8,25 z dodatkiem 0,2 mol/l SDS,
- hydrodynamiczne wprowadzenie próbki poprzez przyłożenie ciśnienia 16 mbar przez 10 sekund,
- przykładane napięcie w celu rozdzielania 25 kV,
- temperatura kapilary 22°C,
- analityczna długość fali podczas detekcji 266 nm.

Z otrzymanych elektroforegramów odczytać wysokości i pola powierzchni sygnałów analitycznych (pików).

2. Przygotowanie próbki preparatu farmaceutycznego:

Zważyć 3 tabletki preparatu z witaminą C, każdą z nich rozetrzeć w moździerzu, a następnie odważyć trzykrotnie po 1 mg powstałego proszku. Proszek rozpuścić w 1 ml wody dejonizowanej oraz odwirować przy 11000 obrotów/min, pobrać ciecz z nad osadu i przenieść do probówki polipropylenowej. Tak przygotowane próbki rozcieńczyć trzykrotnie.

Próbki suplementu poddać analizie elektroforetycznej w wyżej opisanych warunkach. Odczytać wysokości i pola powierzchni otrzymanych pików.

6. Opracowanie wyników

- a) Metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji R^2 .
- b) Wyliczyć dokładność (wyrażoną odzyskiem) dla poszczególnych stężeń krzywej kalibracyjnej.
- c) Oznaczyć zawartość kwasu L-askorbinowego w próbce preparatu farmaceutycznego oraz po przeliczeniu na zawartość w 1 tabletkę porównać z wartością deklarowaną przez producenta.
- d) Skomentować uzyskane wyniki.

Literatura:

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. K. Janda, M. Kasprzak, J. Wolska, *Witamina C- budowa, właściwości, funkcje i występowanie*, Pomeranian Journal of Life Sciences 61 (2015) 419-425.
3. K. Maćkowiak, L. Trolński, *Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka*, Nowiny Lekarskie, 76 (2007) 349-356.
4. J. Du, J.J. Cullen, G.R. Buettner, *Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer*, Biochimica et Biophysica Acta, 1826 (2012) 443-457.