

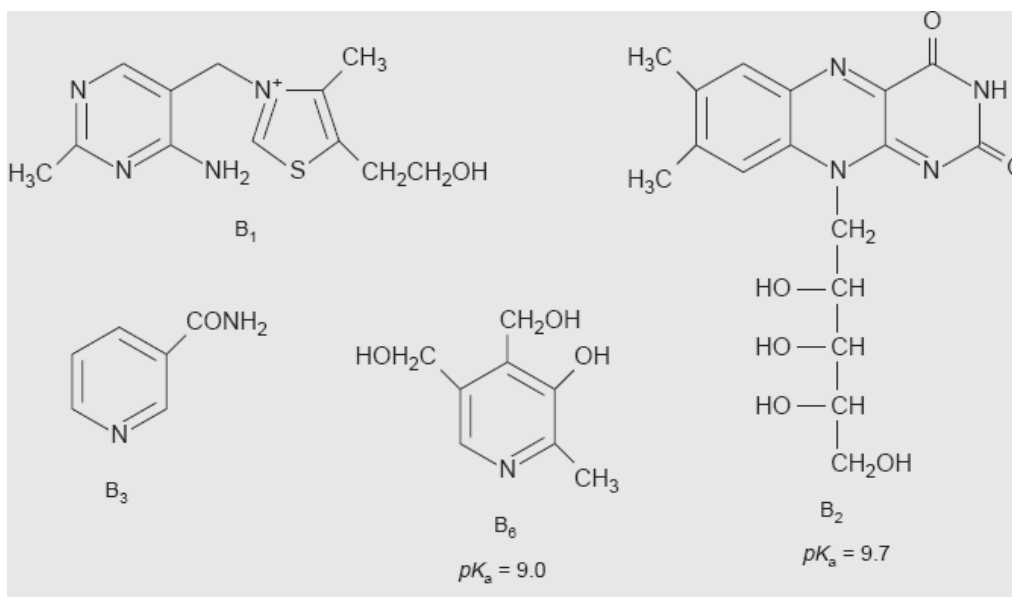
ELMÉLETI, SZÁMOLÁSI FELADATOK

1. B vitamin komplex (keverék) meghatározása CZE és MEKC módszerrel

A módszer leírása: A vízoldható B1 (tiamin hidroklorid), B2 (riboflavin), B3 (niacinamid) és B6 (piridoxin hidroklorid) meghatározható CZE vagy MEKC módszerekkel. A detektálás 200 nm-en spektrofotometriásan elvégezhető. Belső standardként o-etoxibenzamidot használtunk.

Eljárás: A B vitamin komplex tablettát elporítottuk, majd 20.00 mL (20 mM nátrium-tetraborátot és 100.0 mg/L o-ethoxybenzamidot is tartalmazó) 50%-os metanolban feloldottuk és 5.00 mL-es részletét 0.45 µm-es fecskendőszűrőn átnyomtuk (oldhatatlan részeket eltávolítva). Kb. 4 nL-t injektáltunk az 50 µm belső átmérőjű kapillárisba. CZE-nél a kapillárist 20 mM 9-es pH-jú foszfát pufferrel töltöttük fel, mely MEKC-nél 100 mM SDS-t (Na-dodecilszulfát) is tartalmaz. Az elválasztáshoz 40 kV/m térerősséget használtunk.

a, A metanol, mely töltésnélküli komponensként EOF markerként szolgál, 4.69 percnél éri el a detektort. A mintaoldat CZE elemzése során 3.41, 4.69, 6.31 és 8.31 percnél kapunk csúcsokat. A pK_a értékek ismeretében adja meg a 4 vitamin valószínű migrációs sorrendjét.



b, MEKC alkalmazásakor a migrációs sorrend B3 (5.58 perc), B6, (6.59 perc), B2 (8.81 perc) és B1 vitamin (11.21 perc). Mire tud következtetni a B vitaminok SDS micellákban való “beoldódásával” kapcsolatban?

c, A B1 vitamin kvantitatív elemzése során 100.0 mg/L B1 vitamint és 100.0 mg/L o-etoxibenzamidot (belső standard) tartalmazó miniatoldatra a B1 csúcsterülete 71%-a volt a belső standard csúcsterületének. 0.125 g B vitamin komplex tabletta elemzésekor a B1 vitamin csúcsterülete 1.82-szer nagyobb volt a belső standard területénél. Hány mg B1 vitamin volt a tablettában?

2. Hidrodinamikus injektáláskor a 75 cm hosszú, 50 μm belső átmérőjű kapillárisra 2.5 kPa nyomáskülönbséget alkalmaztunk 2 s-ig. Az elektrolit viszkozitása 0.001 kg/m·s volt, mekkora térfogatú minta injektálódott be?

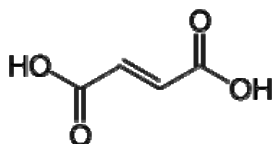
3. A benzil-alkohol gyakran használatos EOF markerként. Ábrázolja a tányérszám adatokat az alkalmazott térerősség függvényében, és értelmezze a kapott diagramot.

térerősség (kV/m)	tányérszám
6.4	38 000
12.7	78 000
19	96 000
25.5	124 000
31.7	124 000
38	96 000

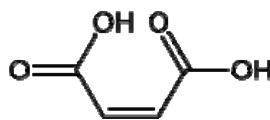
4. a, Egy bizonyos oldat elektroosmotikus mozgékonyága pH=2-nél $1.3 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ és pH=12-nél $8.1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$. Mennyi ideig tart, amíg egy töltés nélküli komponens a kapilláris injektálási végétől eléri az 52 cm-re levő detektort, ha 27 kV-ot alkalmazunk a 62 cm hosszú kapilláris végekre pH=2-nél? És pH=12-nél?

b, Egy anion elektroforetikus mozgékonyága $-1.6 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$. Mennyi idő alatt éri el a detektort pH=2-nél és pH=12-nél?

5. a, Egy hosszú, vékony molekulának nagyobb súrlódási együtthatója van, mint egy rövid, vastagabb molekulának. Vajon a fumarátnak vagy a maleinátnak nagyobb az elektroforetikus mozgékonyága?



fumársav

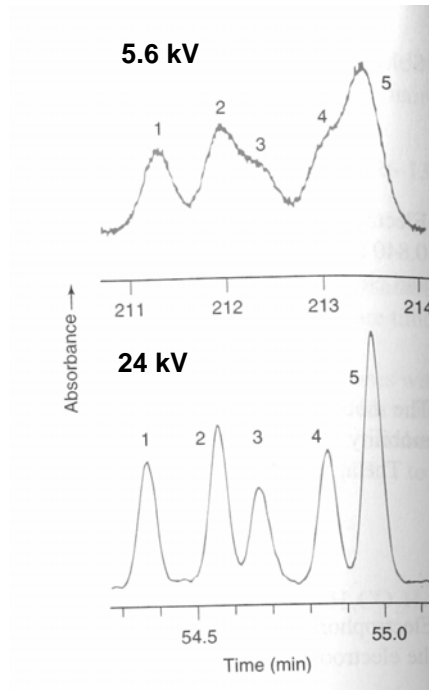


maleinsav

b, CZE elemzésnél a kapilláris anódos végénél injektálunk és a katódos véghez közelebb detektálunk. pH=8.5-nél mindkét komponens kétszeresen negatív töltésű. Az EOF negatív elektród irányú és nagyobb, mint a komponensek elektroforetikus sebessége, így a két anion a negatív töltésű elektródok felé vándorol. Az a,-ra adott válasz alapján várhatóan mi lesz a migrációs sorrendjük?

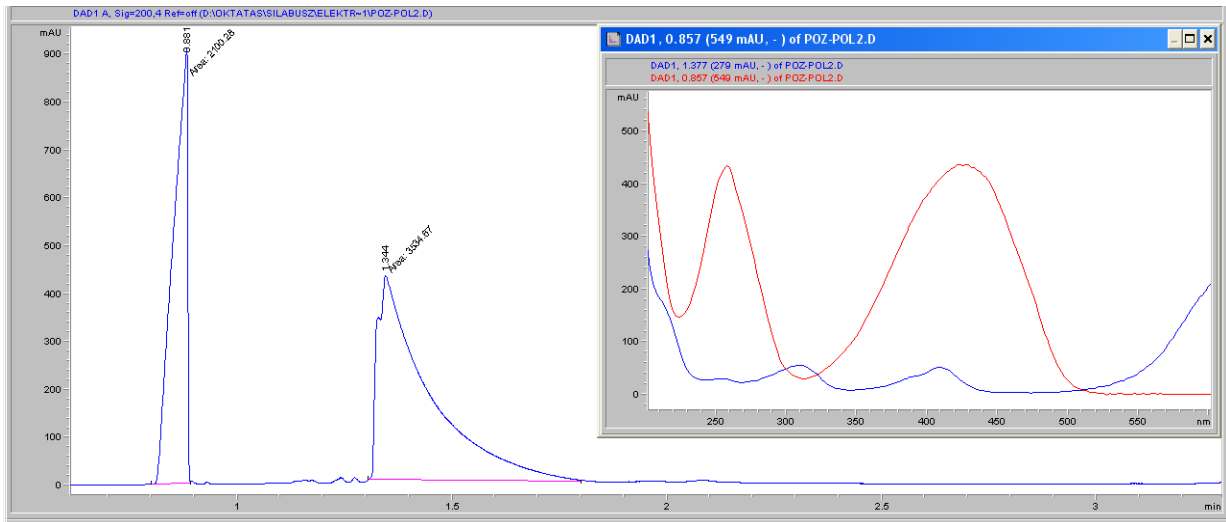
c, pH=4.0-nál a komponensek töltése -1 körüli és az EOF gyenge. Ezért a CZE-t úgy hajtjuk végre, hogy a kapilláris katódos végén injektálunk, és az anódos véghez közelebb detektálunk. Mi lesz az elúciós sorrend?

6. A feszültség növelésének hatása (5.6 kV-ról 24 kV-ra) a felbontásra illusztrálható az alábbi ábrával:



- a,** Mi az elméletileg várt aránya a két kísérletben kapott migrációs időknek ($t_{24\text{ kV}}/t_{5.6\text{ kV}}$)? Számolja ki az elektroferogramokból az első komponensre kapott migrációs idő arányt.
- b,** Mi az elméletileg várt aránya a két kísérletben kapott tányérszámoknak ($N_{24\text{ kV}}/N_{5.6\text{ kV}}$)?
- c,** Mi az elméletileg várt aránya a két kísérletben kapott csúcshélességeknek ($w_{24\text{ kV}}/w_{5.6\text{ kV}}$)?
- d,** A feszültség növelésével miért csökken a csúcshélesség és javul a felbontás?

7. Egy sárga és egy kék festék keverékét választottuk el CZE módszerrel (25 kV, kapilláris hossz: 38 cm, effektív hossza: 30 cm, detektálás a katódos végnél, puffer: 25 mM foszfát, pH 6). Az abszorpciós spektrumok alapján döntse el, melyik komponens éri el hamarabb a detektort. Az EOF frontja 0.751 percnél jön. Számítsa ki a két komponens látszólagos és effektív mozgékonyágait. Milyen töltéssel rendelkezhetnek a komponensek?



8. Precizitás vizsgálat:

Hívja be a DATA könyvtárban lévő 10 db elektroferogramot: 011-0401.D – 011-0410.D egymás alá! Az elektroferogramokon a temozolomid (TMZ) gyógyszer és négy belső standard elemzése látható. Az 1. csúcs: DMSO, 2. csúcs: dimetilformamid, 3. csúcs: TMZ, 4. csúcs: paracetamol, 5. csúcs: benzilalkohol.

Integrálja le mind a tíz elektroferogram esetében az öt csúcst! Számolja ki az öt komponensre a migrációs idők és a jelterületek szórását és az RSD%-ot Excelben! Korrigálja a TMZ migrációs időit és csúcsterületeit az összes belső standard migrációs időivel, jelterületeivel ($t_{\text{korrig}} = t_{\text{TMZ}}/t_{\text{belső st.}}$, $A_{\text{korrig}} = A_{\text{TMZ}}/A_{\text{belső st.}}$), és számolja ki mindegyik esetben a szórásokat, RSD%-okat!

Értékelje a kapott eredményeket! Javított-e a belső standardok használata a TMZ migrációs idejének és jelterületének RSD%-án, melyik belső standard bizonyul a legjobbnak, mivel indokolja ezt?

9. Gyógyszervegyület koncentrációjának meghatározása szérumban standard addíciós módszerrel:

Hívja be a DATA könyvtárban lévő 3 db elektroferogramot: Gadol 287, 288, 289 egymás alá! Az első elektroferogramon egy gyógyszeres kezelésben részesült beteg szérumban a gyógyszer csúcsa 7,4 percnél található. Integrálja le mindhárom elektroferogramon ezt a csúcst! A 2. elektroferogram egy olyan minta elemzése, ahol 30 µl szérumban 0,25 µl 20 mM koncentrációjú gyógyszer vegyületet tettünk, míg a 3. elektroferogram esetében 30 µl szérumban 0,5 µl 20 mM gyógyszer vegyületet adtunk.

Számolja ki a 2. és 3. elektroferogram esetében a **hozzáadott** gyógyszer koncentrációit! Ábrázolja a standard addíciós kalibráló egyenest, és ez alapján számolja ki a gyógyszer koncentrációját a szérumban!

10. Érzékenység, LOD, LOQ meghatározása:

Hívja be a DATA könyvtárban lévő 5 db elektroferogramot: cal01-05 egymás alá! Integrálja le a 20,5 percnél lévő csúcsot! A komponens koncentrációi: 1,7 mg/l, 3,5 mg/l, 7,1 mg/l, 14,2 mg/l, 28,4 mg/l.

Készítse el a kalibrációs egyenest, adja meg az egyenes egyenletét, R^2 értékét! Számolja ki az érzékenységet, kimutatási határt és meghatározási határt!

Számításhoz szükséges adatok: 10-szer injektálva a vakoldatot (puffer) a kapott jelek nagyságai: 0.1535, 0.1611, 0.1399, 0.1212, 0.1892, 0.1794, 0.1025, 0.1269, 0.1218, 0.1244.

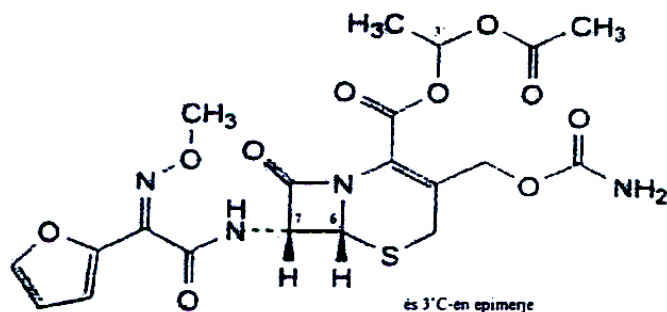
11.

Az elektroferogramokon a cefuroxim axetil elemzése látható két különböző elektroforetikus technikával.

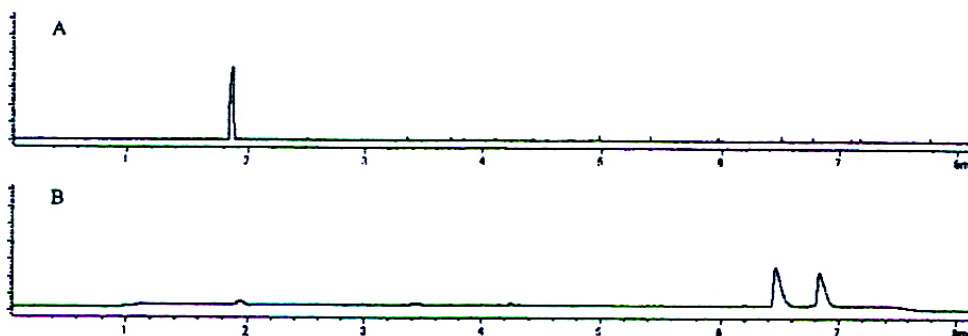
„A” elektroferogram: kapilláris zónaelektroforézis (CZE)

„B” elektroferogram: micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)

A cefuroxim axetilnek három kiralitáscentruma van (C6, C7, C3'), a két diasztereomer a 3' szénatom konfigurációjában különbözik egymástól, a hatodik, hetedik szénatom konfigurációjában pedig megegyeznek. Értelmezd és magyarázd a két elektroferogramot!



A (Z)-cefuroxim-axetil szerkezeti képlete

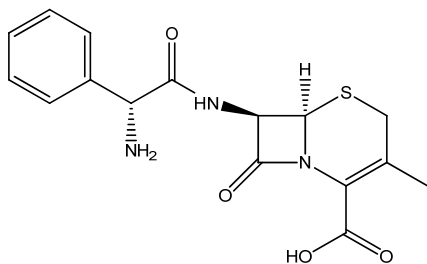


12.

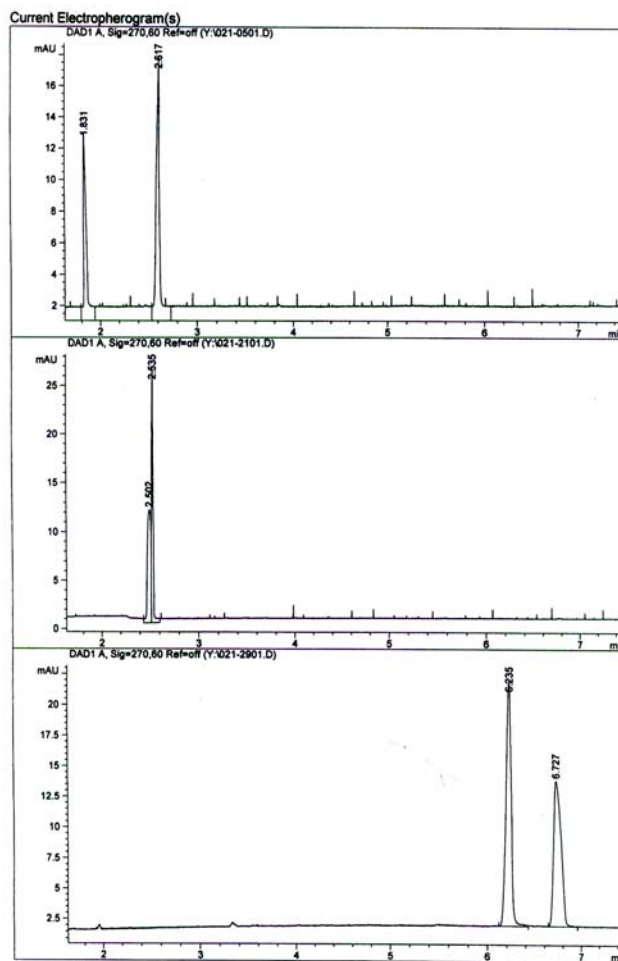
A három elektroferogramon a cefalexin különböző pH-kon készült kapilláris zónaelektroforetikus elemzése látható. A felső elektroferogramon a pH=8,7, a középsőn pH=5,4, az alsón pH=3,7. A töltés nélküli marker, a benzil alkohol 8,7-es és 5,4-es pH-n az első csúcs, míg pH 3,7-nél a második csúcs. Számold ki a cefalexin effektív elektroforetikus mozgékonyági adatait a megadott képlet és adatok segítségével! Figyelj a mértékegység helyes megadására is! Milyen töltésű a cefalexin a három különböző pH-n, és minek köszönhető ez? Értelmezd cefalexin különböző pH-kon mutatott elektroforetikus tulajdonságát (töltését) a szerkezeti képlet és a kiszámolt mozgékonyág segítségével! Miért kerül közel egymáshoz a benzil alkohol és a cefalexin csúcsa 5,4-es pH-n?

$$\mu_e = \frac{L_t L_{eff}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right)$$

μ_e : effektív elektroforetikus mozgékonyág, L_t : kapilláris teljes hossza [cm]= 48,5 cm
 L_{eff} : kapilláris effektív hossza [cm]= 40 cm, U : alkalmazott feszültség [V]= 25kV
 t_m : komponens migrációs ideje [s] t_0 : töltés nélküli molekula (EOF marker) migrációs ideje [s]

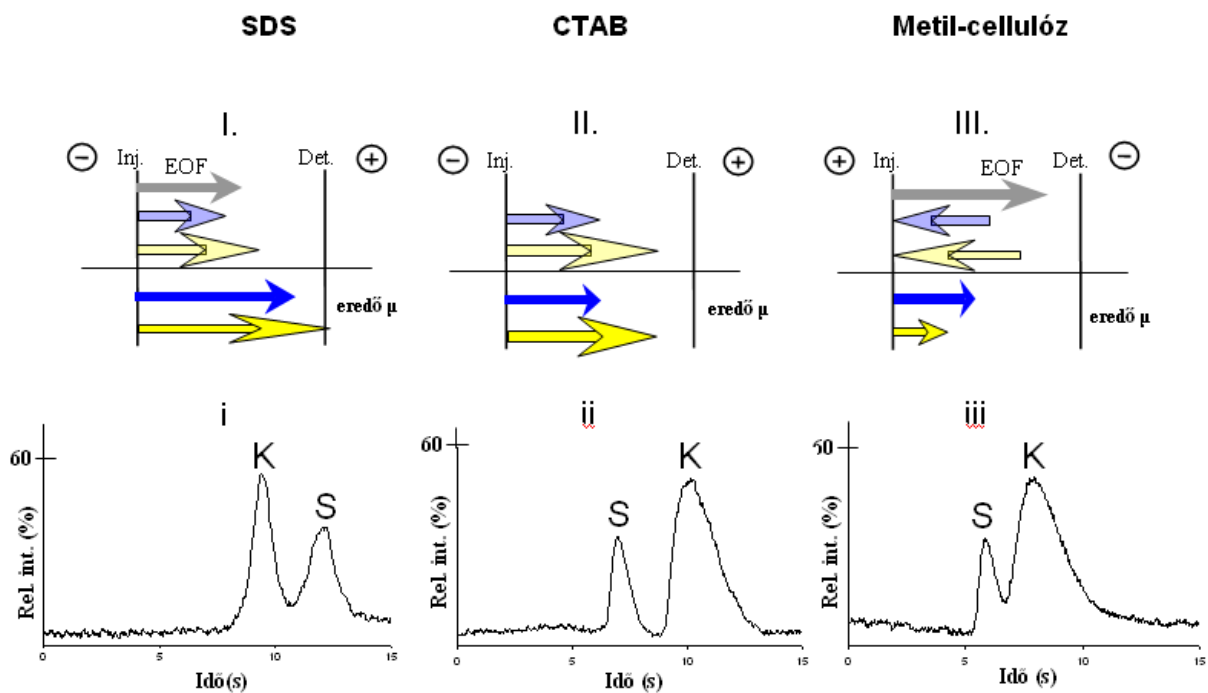


A cefalexin szerkezeti képlete



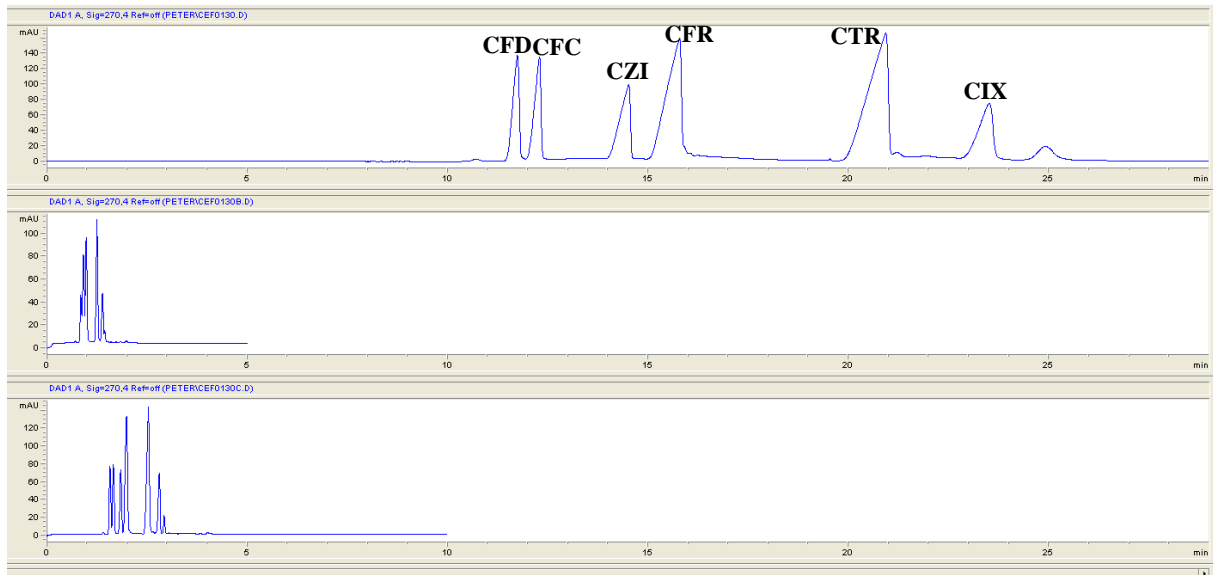
13.

Mikrocsip elektroforézissel zöld ételfestéket választottunk szét, ami egy sárga (**S**, E102, tartrazin) és egy kék (**K**, E133, Brilliant Blue FCF) komponensből tevődik össze. Azt vizsgáltuk, hogy milyen hatással van az elválasztásra, ha különböző felületmódosítókkal kezeljük a hidrofób, töltésnélküli (PDMS) mikrocsip falát az elektroforézis előtt. A kísérletekhez használt felületmódosítók: nátrium-dodecil-szulfát (anionos), cetil-trimetil-ammónium-bromid (kationos) és metil-cellulóz (neutrális). Rendelje egymáshoz a detergenseket, a komponensek és az EOF elektroforetikus mozgékonyaságát bemutató sematikus ábrákat, valamint a kapott elektroferogramokat! Válaszát röviden indokolja is meg!

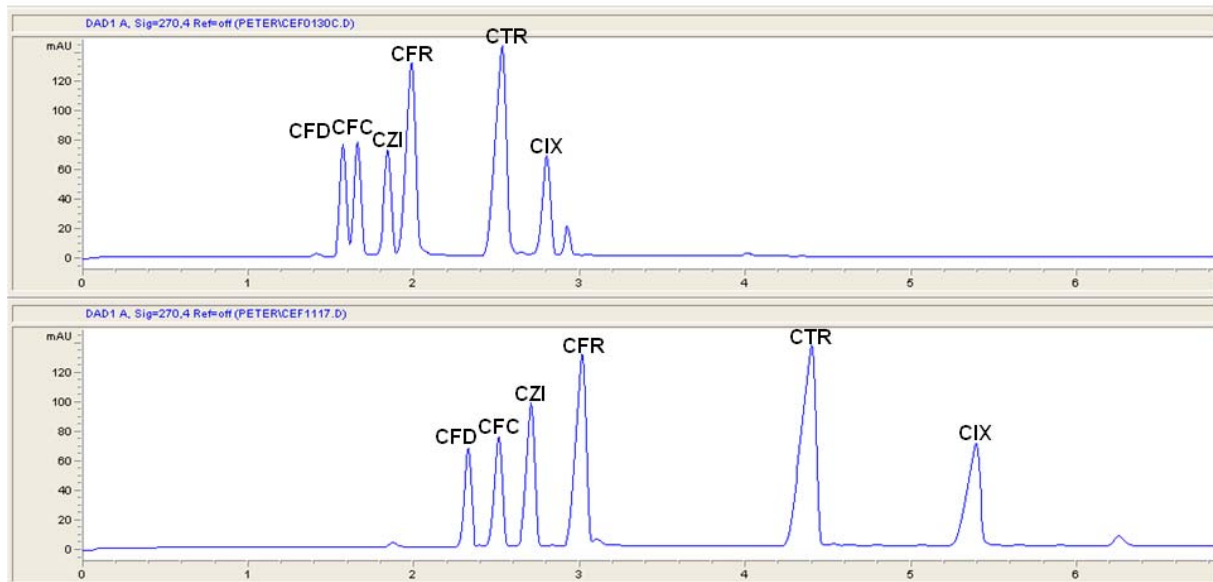


14.

Hat kefalosporin antibiotikum (anionos komponensek) elektroforetikus elválasztását végeztük el különböző körülmények között. Rendelje a kérdéses paramétereket az egyes elektroferogramokhoz! Választát indokolja is!



a: feszültség hatása az elválasztásokra: **+15 kV; 2,5 kV; 25 kV**



b: a puffer koncentrációjának hatása az elválasztásra: **100 mM foszfát, 50 mM foszfát**
Körülmények: foszfát, pH 7, $L_{eff}=22\text{cm}$, **+15kV**, 50 mbar*2s