

KAPİLER ELEKTROFOREZ

Uzm. Ecz. Emirhan NEMUTLU

- Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesidir.

Kapiler Elektroforezin Avantajları

- Kısa analiz süresi
- Küçük numune hacmi (1-10 μ l)
- Az miktarda çözelti harcaması
- Ucuz
- Yüksek etkinlik (10^5 - 10^6 teorik tabaka sayısı)
- Tekrarlanabilirlik
- Kullanım alanının geniş olması

Kapiler elektroforezde ayrımı gerçekleştirilebilen moleküller

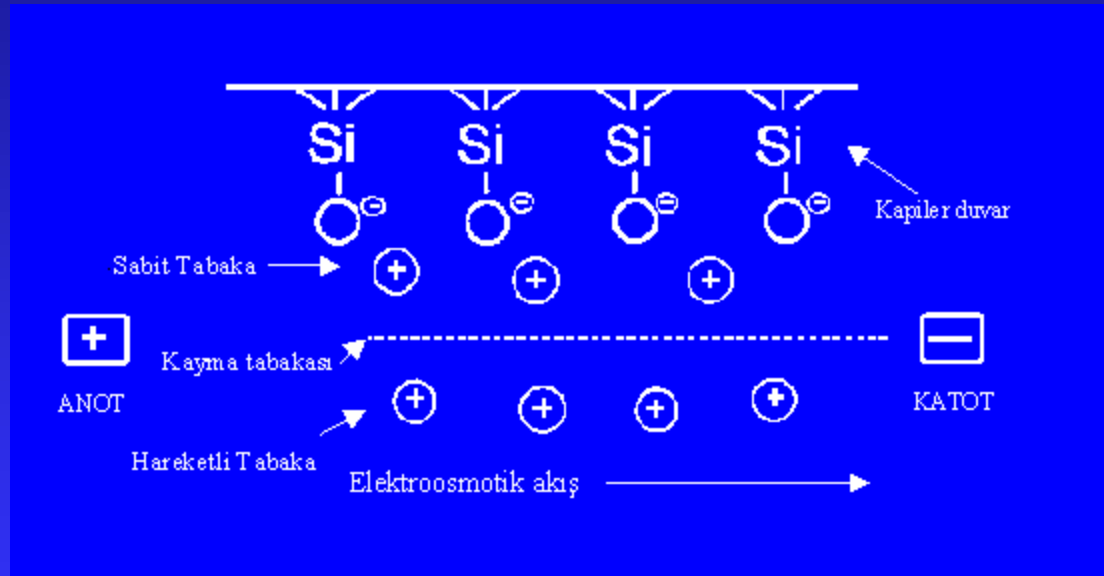
- Proteinler
- Peptidler
- Amino asitler
- Nükleik asitler
- İnorganik iyonlar
- Organik bazlar
- Organik asitler

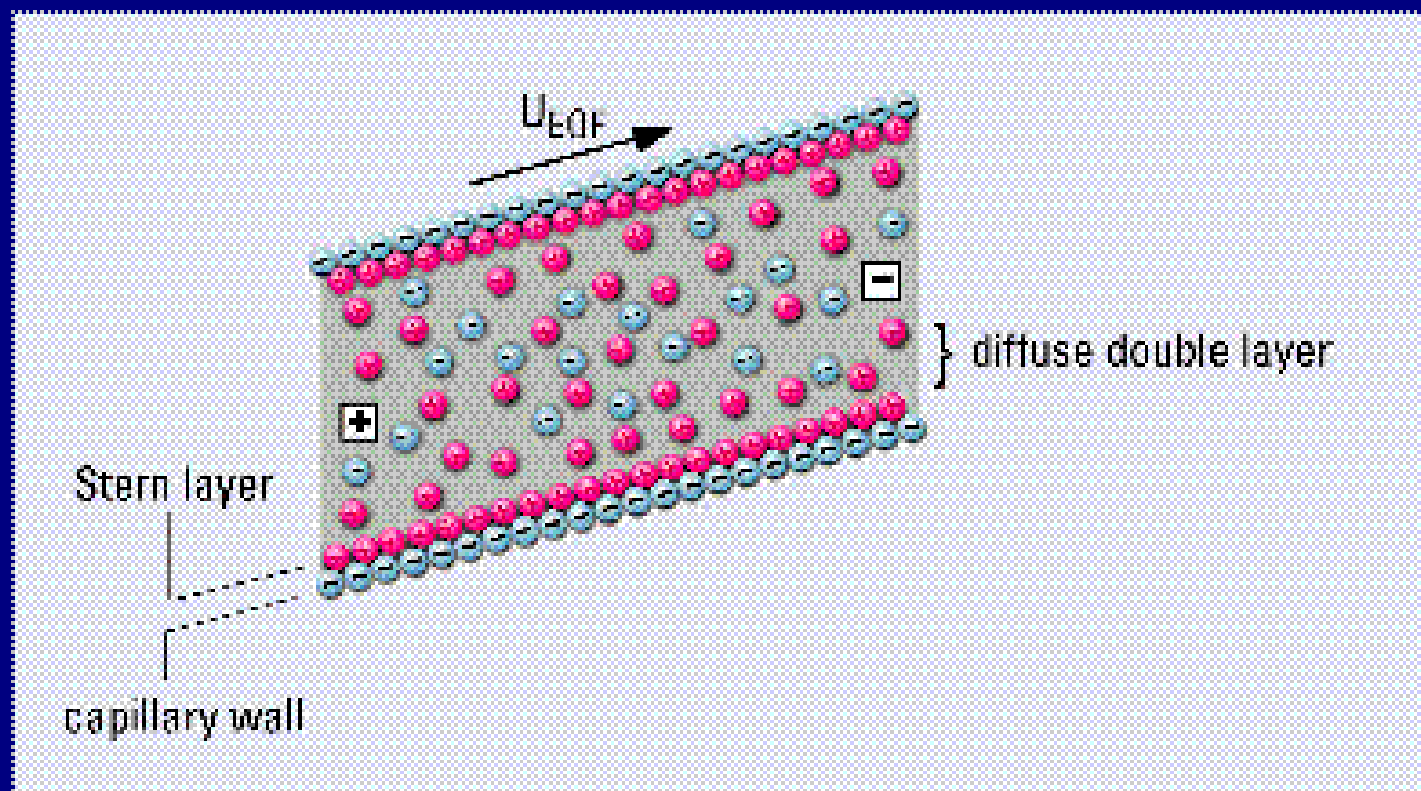
Kapiler Elektroforez Yöntemleri

- Kapiler zon elektoroforez (CZE)
- Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)
- Kapiler jel elektroforez (CGE)
- Kapiler izotakoforez (CITP)
- Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)

Kapiler Zon Elektroforez (CZE)

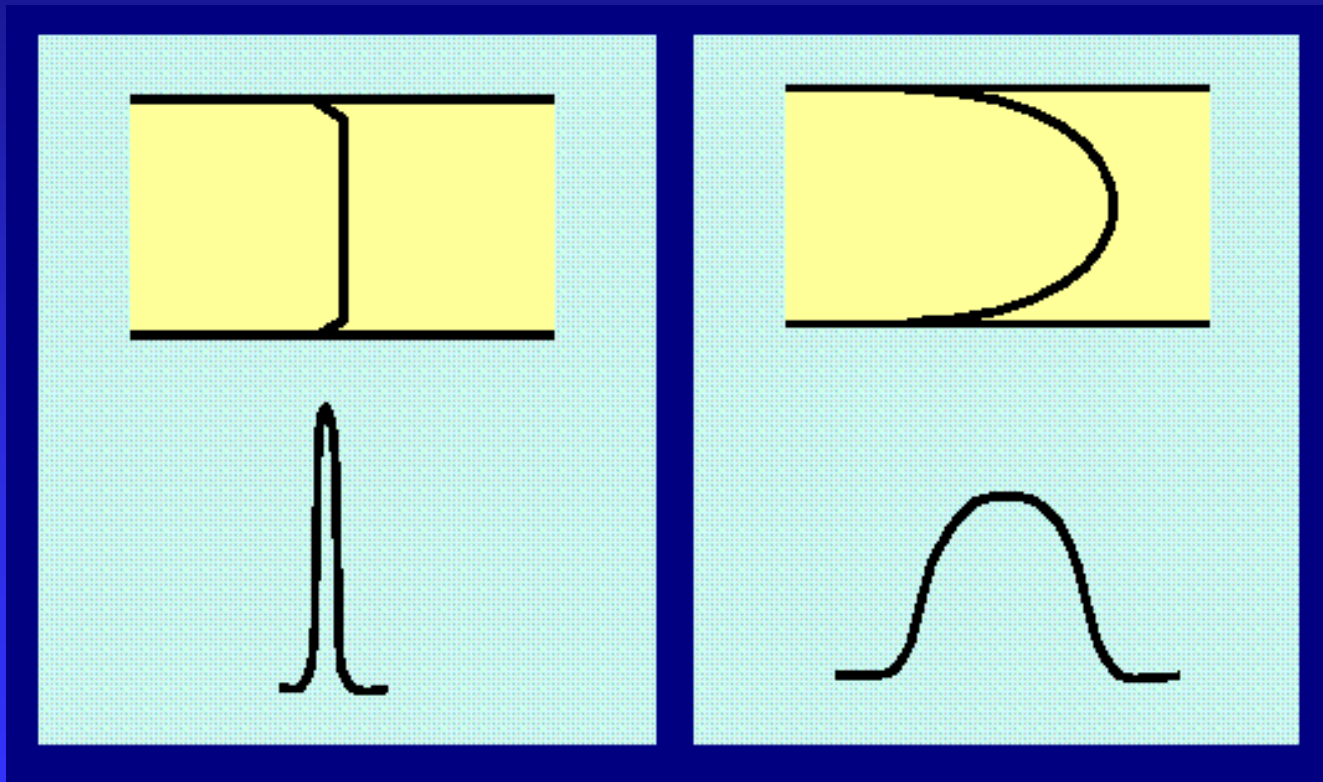
Elektroosmotik Akış (EOF)





EOF

Laminar Akış



EOF'nin belirlenmesi

Doğal işaretleyiciler (Naturel markers)

- Çalışan pH' da iyonize olmayan
- Kullanılan dedektörle tanımlanabilen
- Saf
- Kapiler ile reaksiyona girmeyen
- Çalışma elektroliti içinde çözünen

Metanol, Formaldehit, Aseton, Dimetilsülfoksit

Elektroosmotik hareketlilik (μ_{EOF})

$$\mu_{\text{EOF}} = \varepsilon \xi / 4 \pi \eta$$

- ε = Tampon dielektrik sabiti
- ξ = Zeta potansiyeli
- η = Tampon çözeltisinin viskozitesi

Zeta potansiyeli (ξ)

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon$$

- δ = Difüzyon tabakası kalınlığı
- e = Yüzey alana düşen yük
- ε = Tampon dielektrik sabiti

Elektroforetik Kuvvet

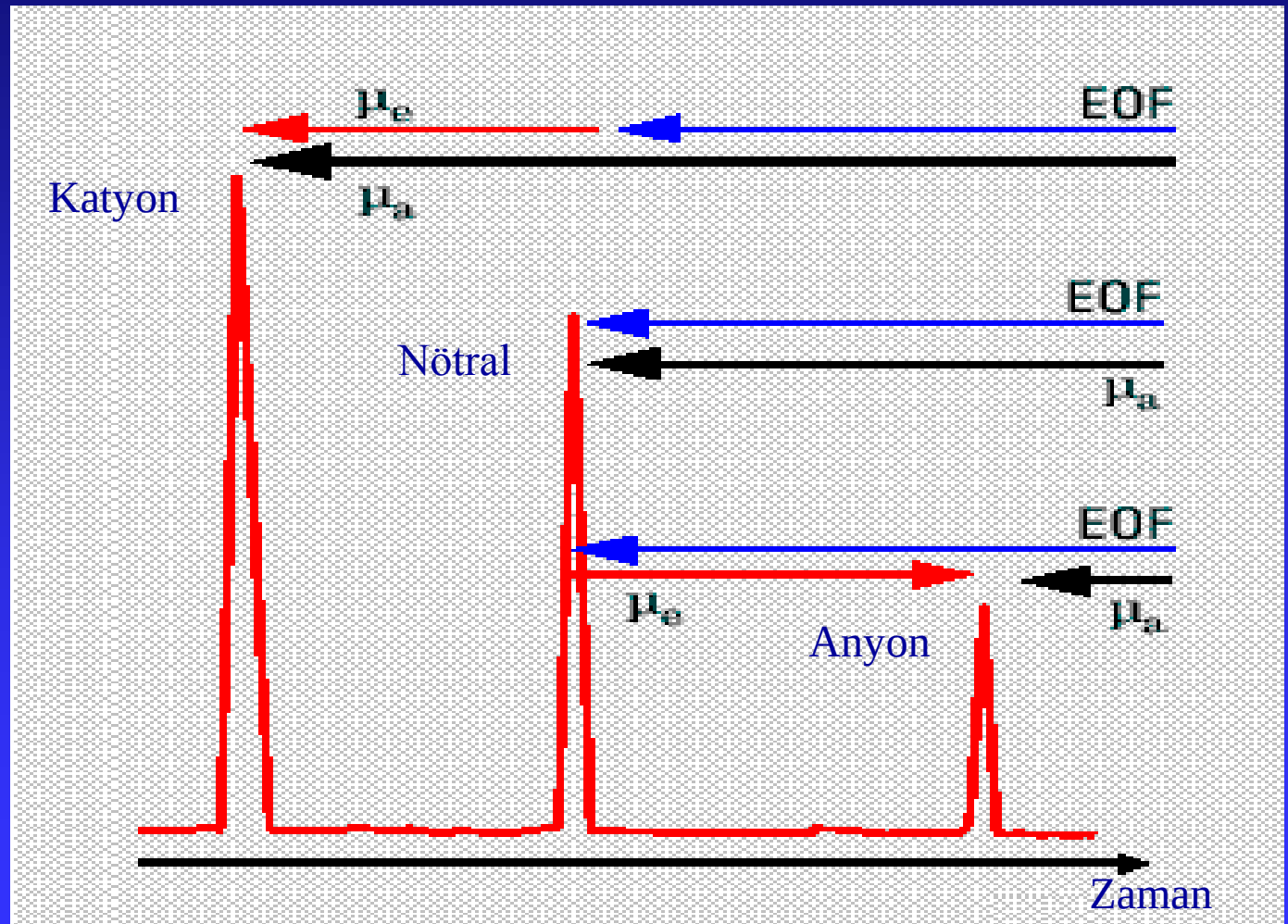
Elektroforetik kuvvet : $\text{yük} / \text{çap}$

Elektroforetik hareketlilik (μ_{EP})

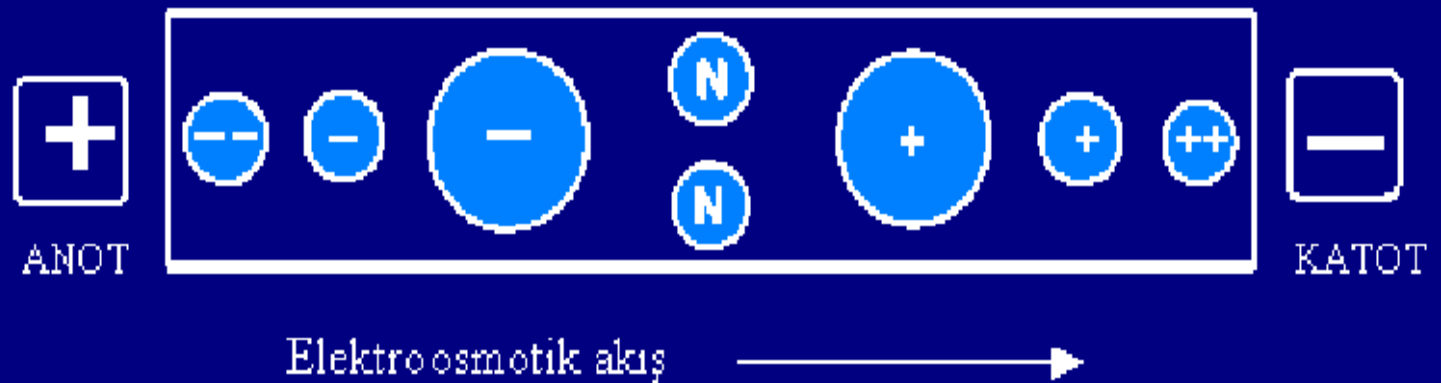
$$\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta d$$

- q = İyonize numunenin yükü
- d = Numune yarıçapı
- η = Tampon çözeltisinin viskozitesi

CZE ayırım sırası



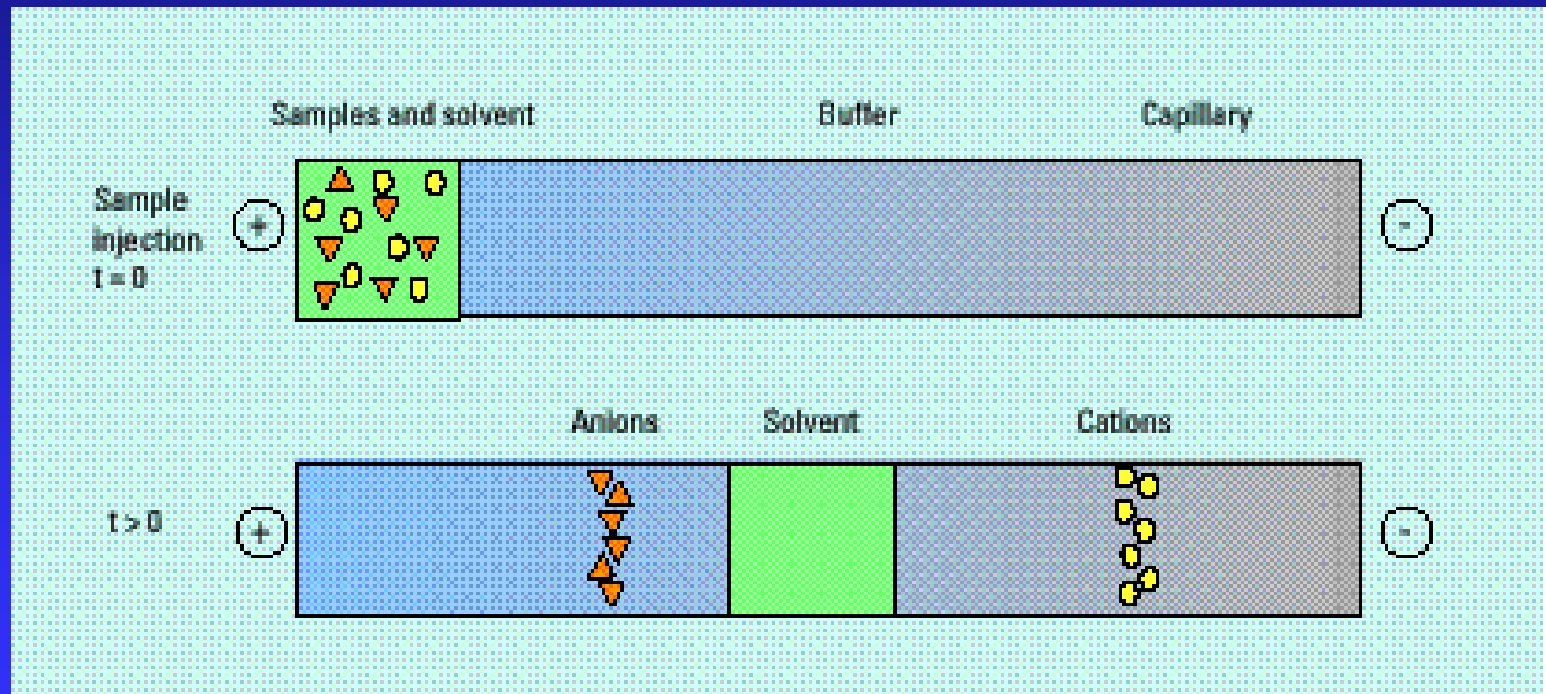
CZE ayırım sırası



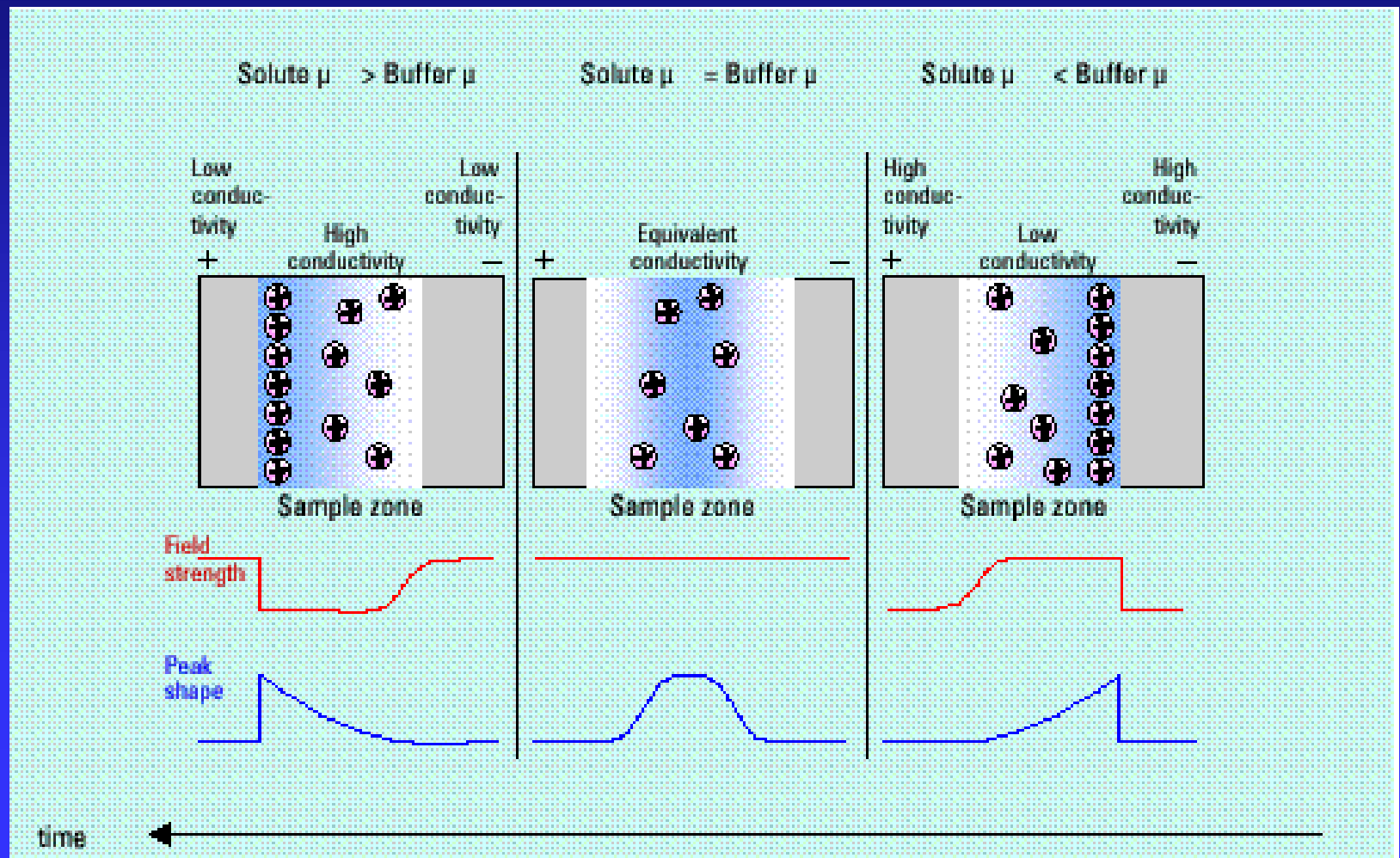
Ayırırma Etki Eden Parametreler

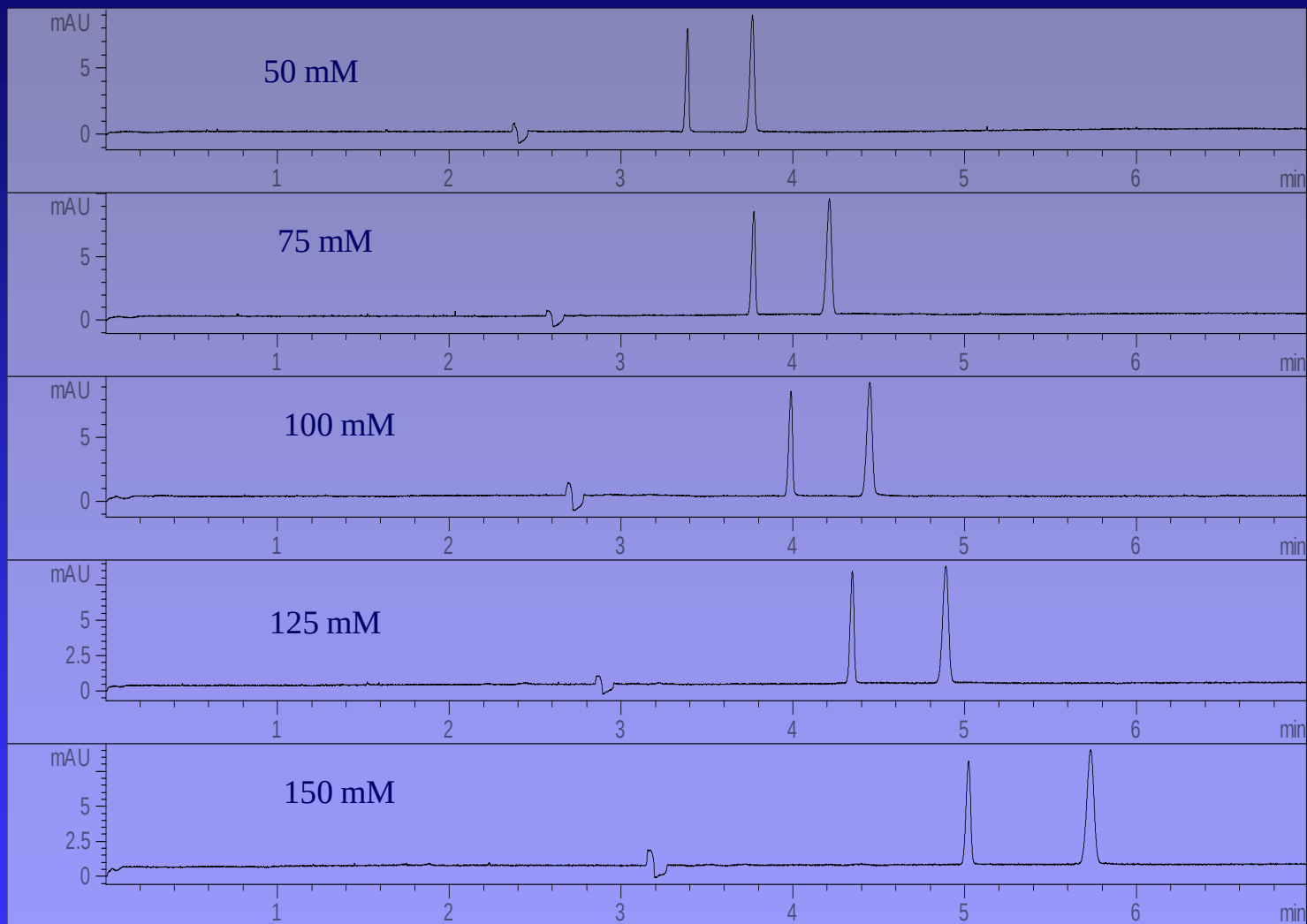
- Tampon çözeltisi
- Tampon çözeltisi derişimi
- Tampon çözeltisi pH'sı
- Organik faz içeriđi
- Sıcaklık
- Uygulama voltaj
- Enjeksiyon süresi

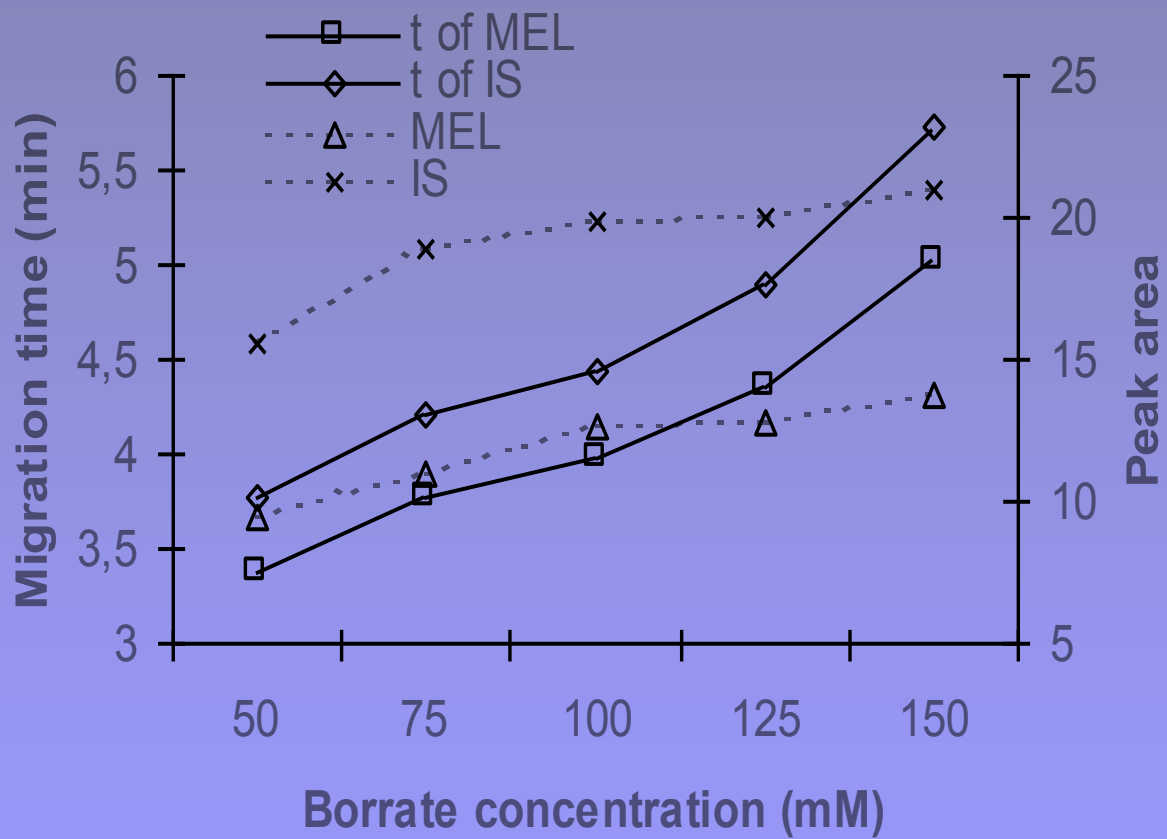
Tampon çözeltisi seçimi



Tampon çözeltisinin derişimi

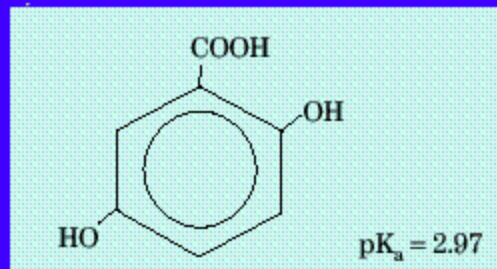




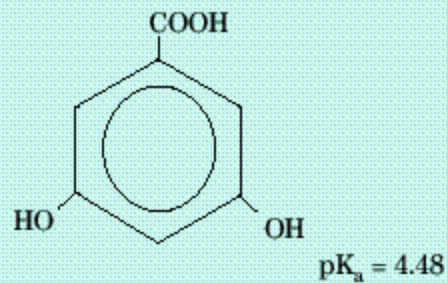
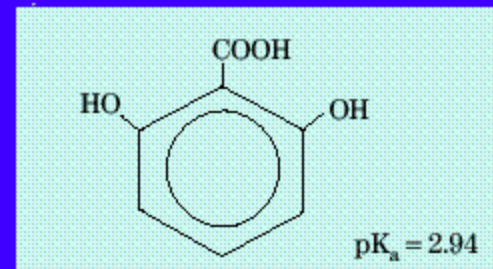


pH etkisi

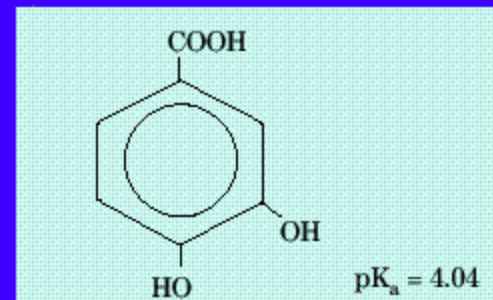
2,5 DHBA



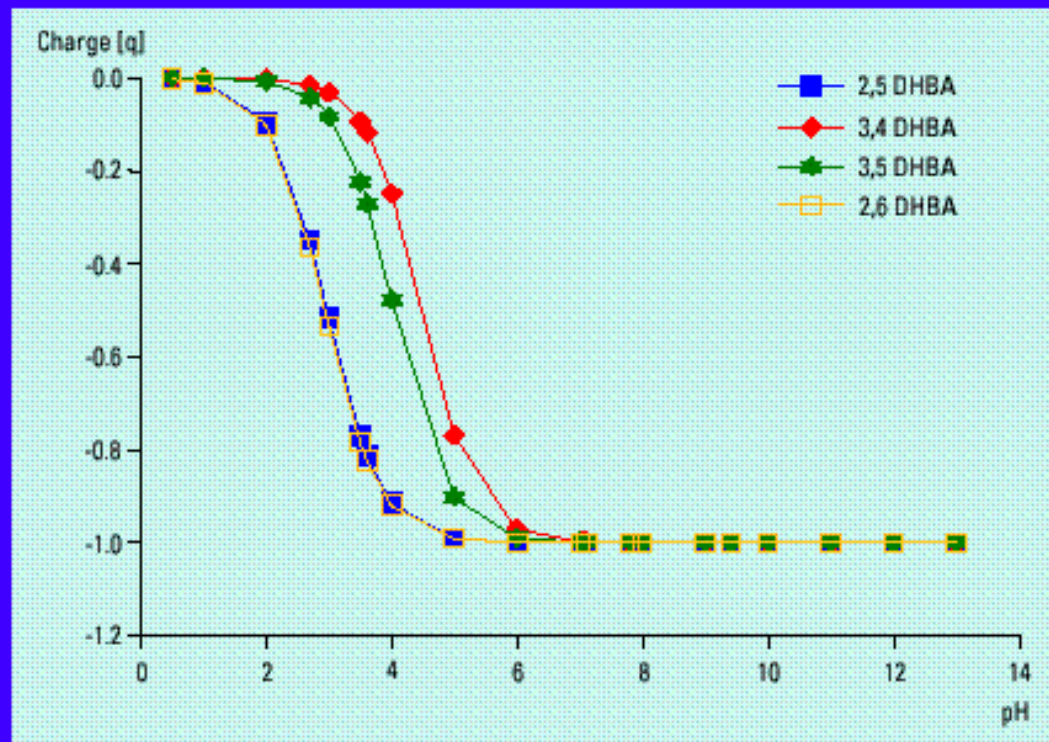
2,6 DHBA

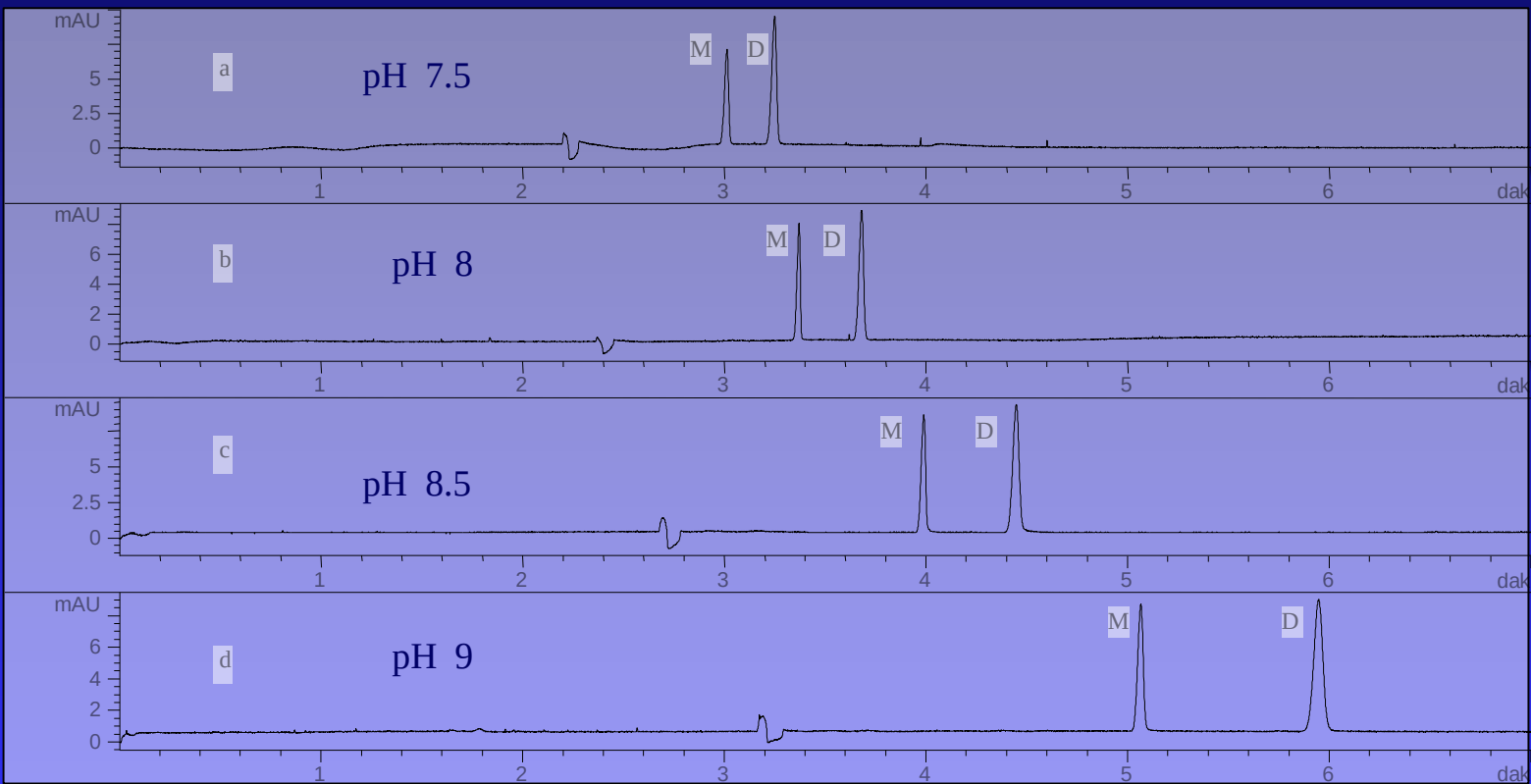


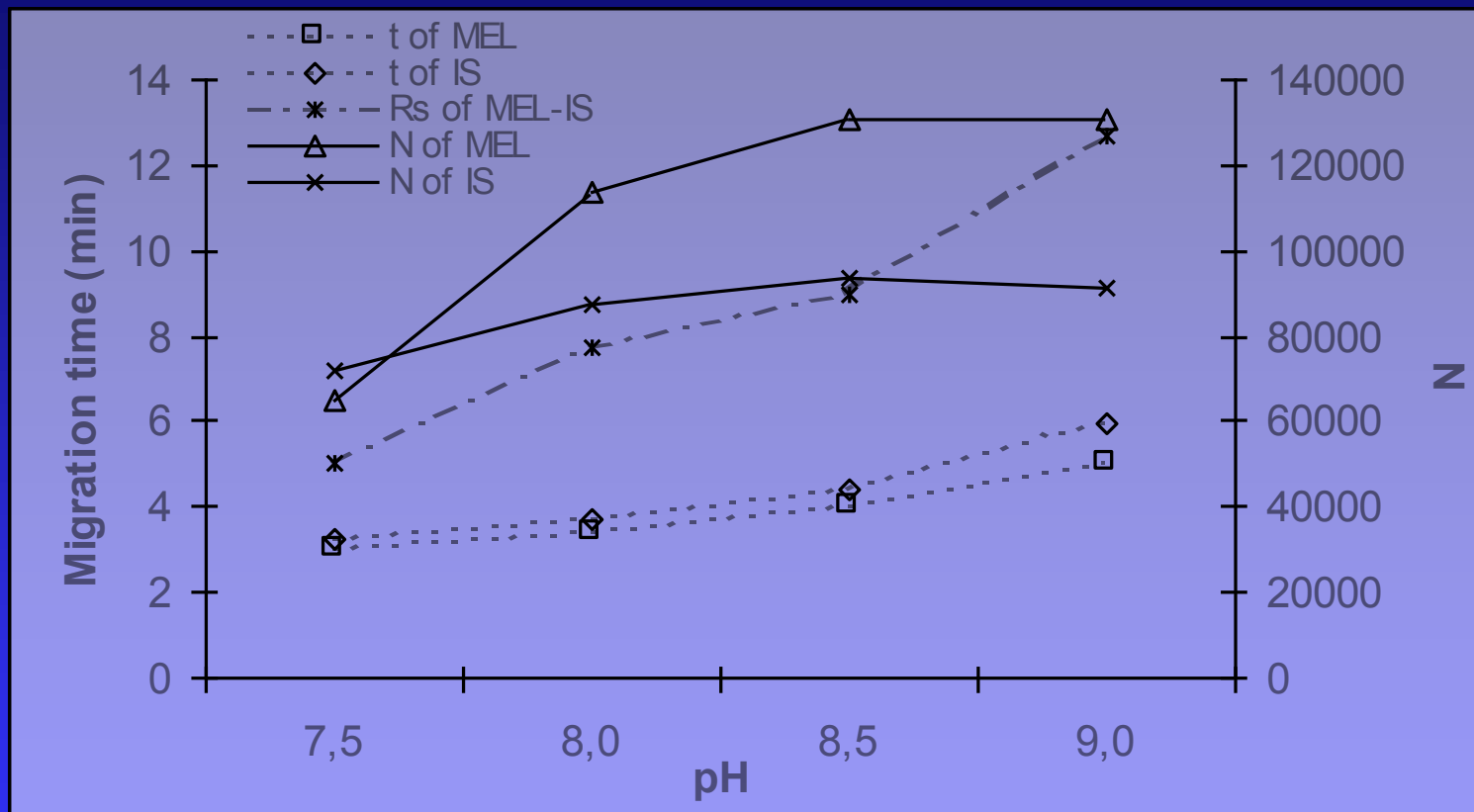
3,5 DHBA



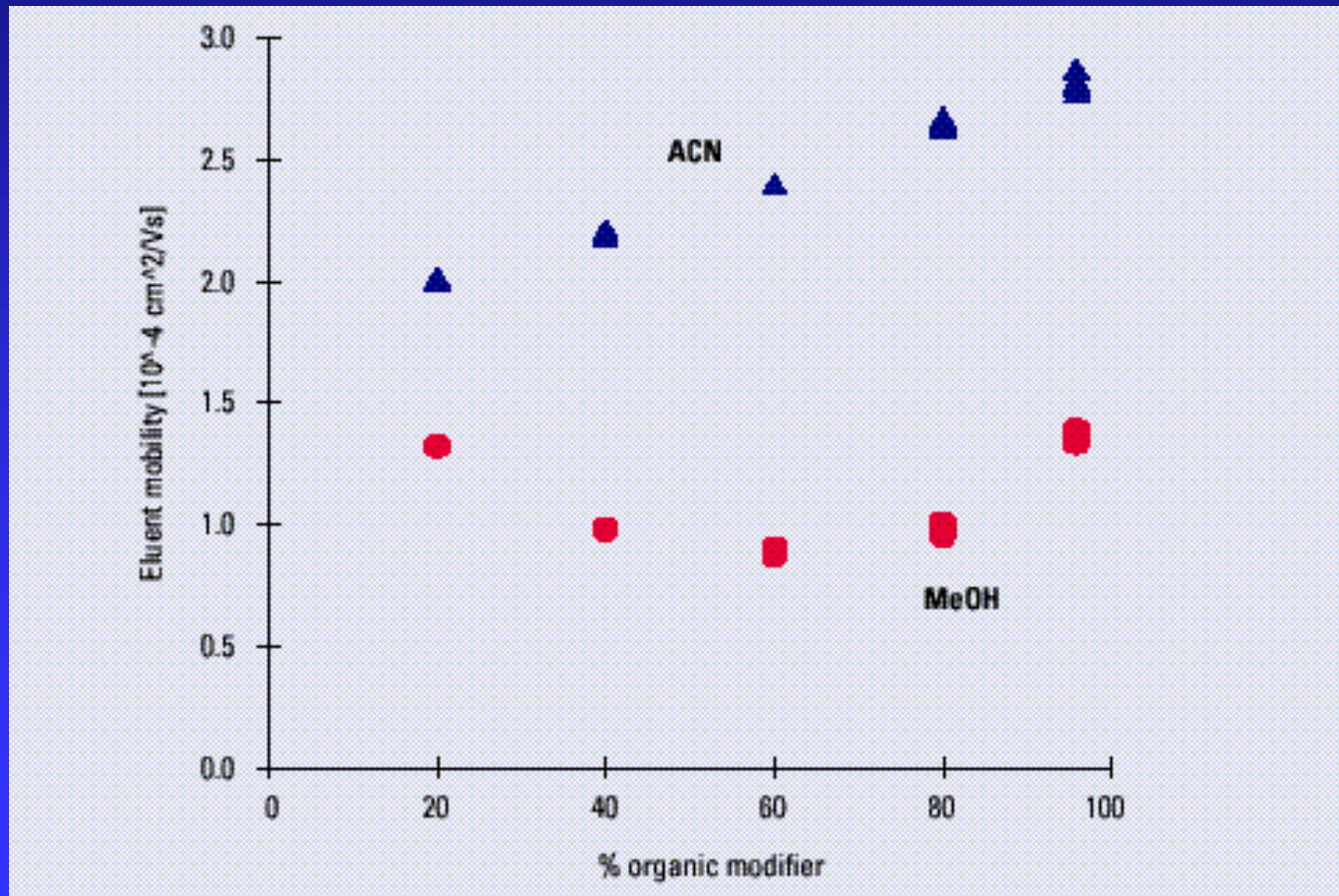
3,4 DHBA

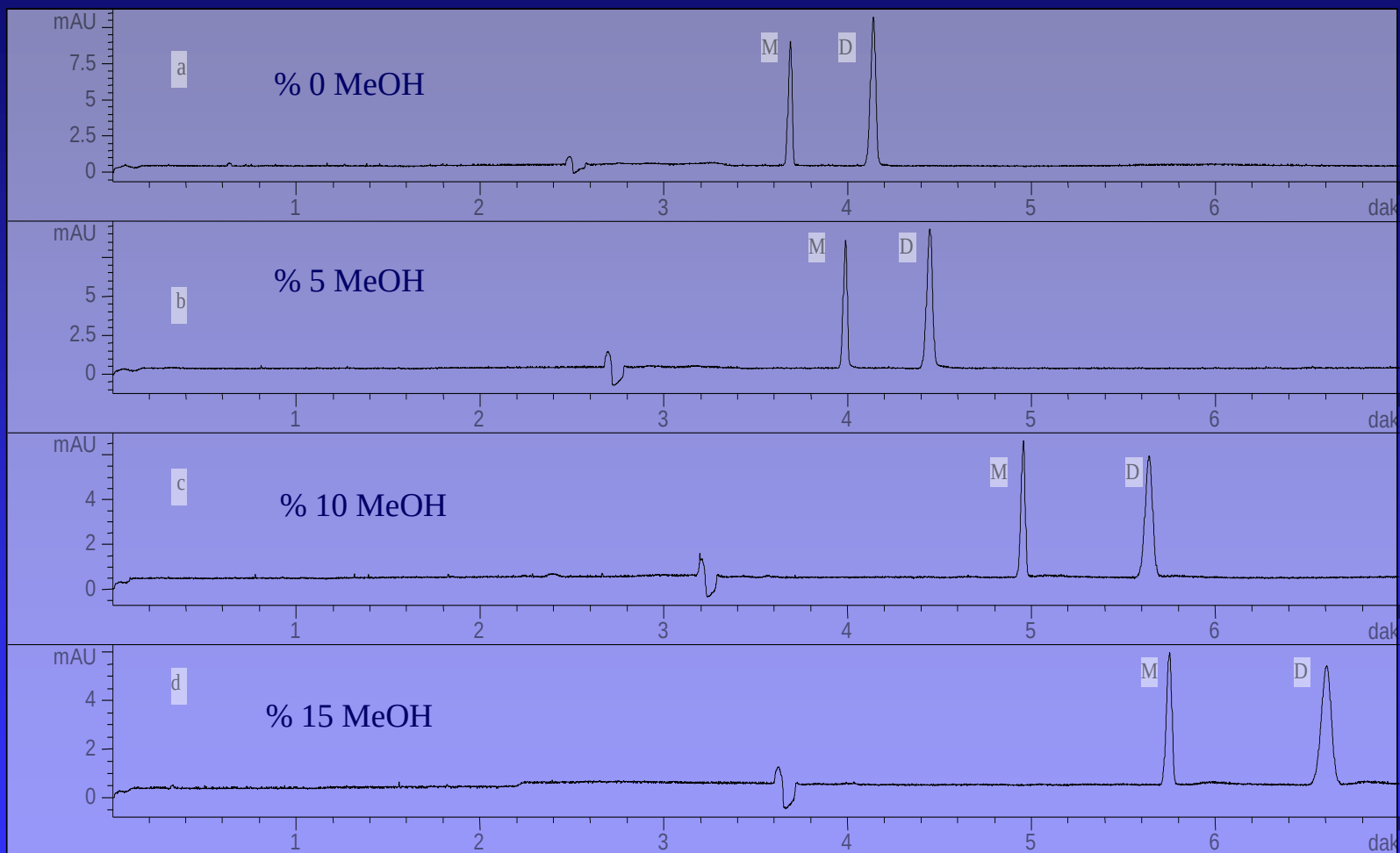


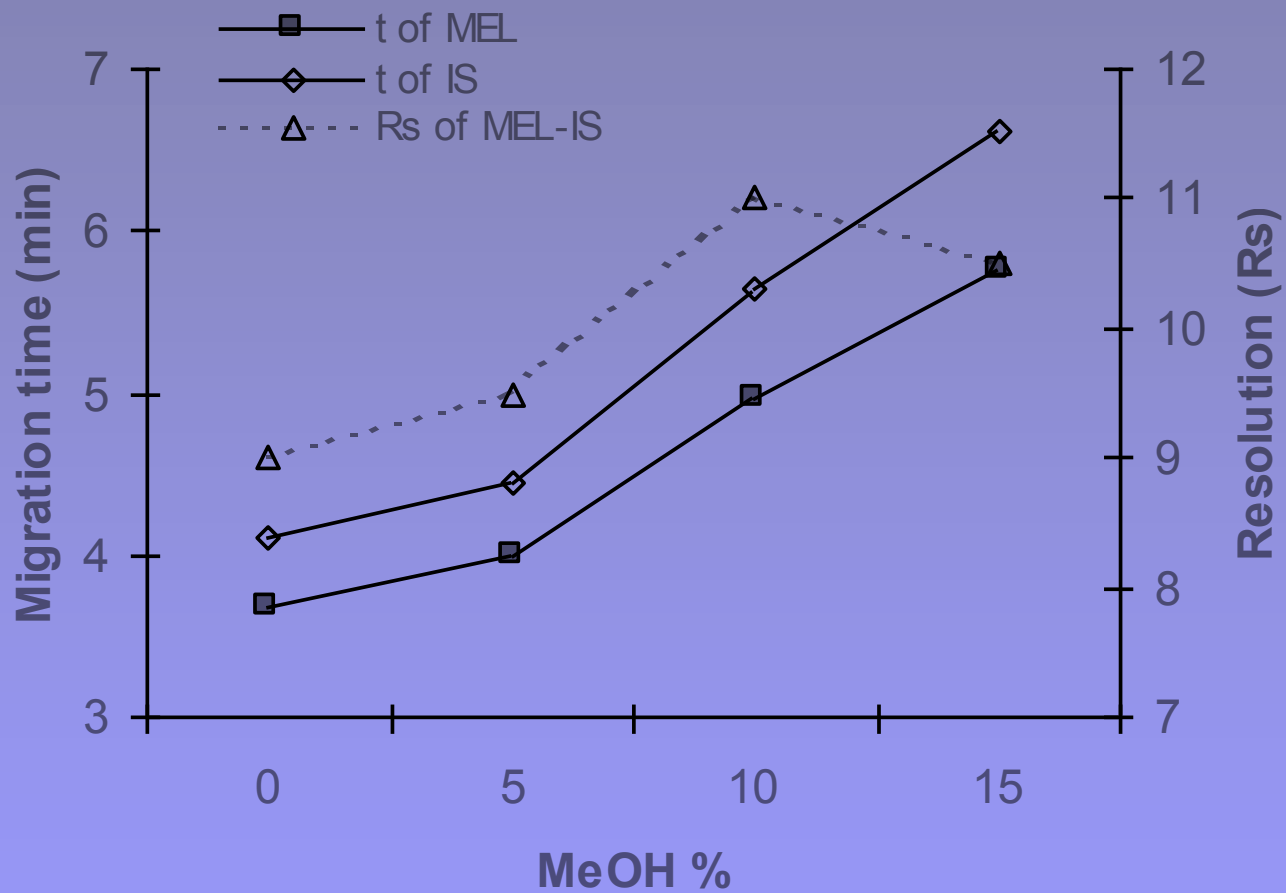




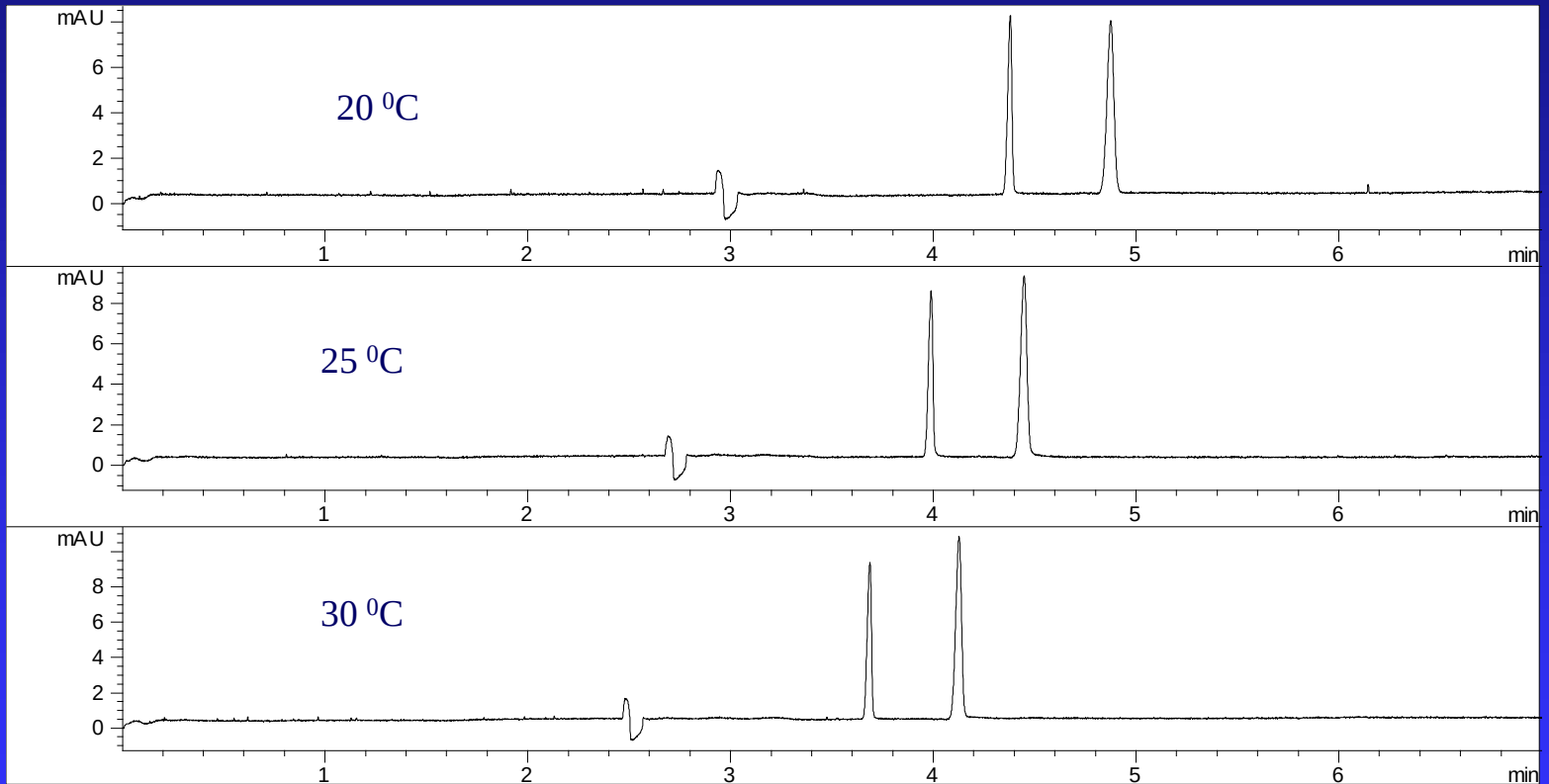
Organik faz etkisi



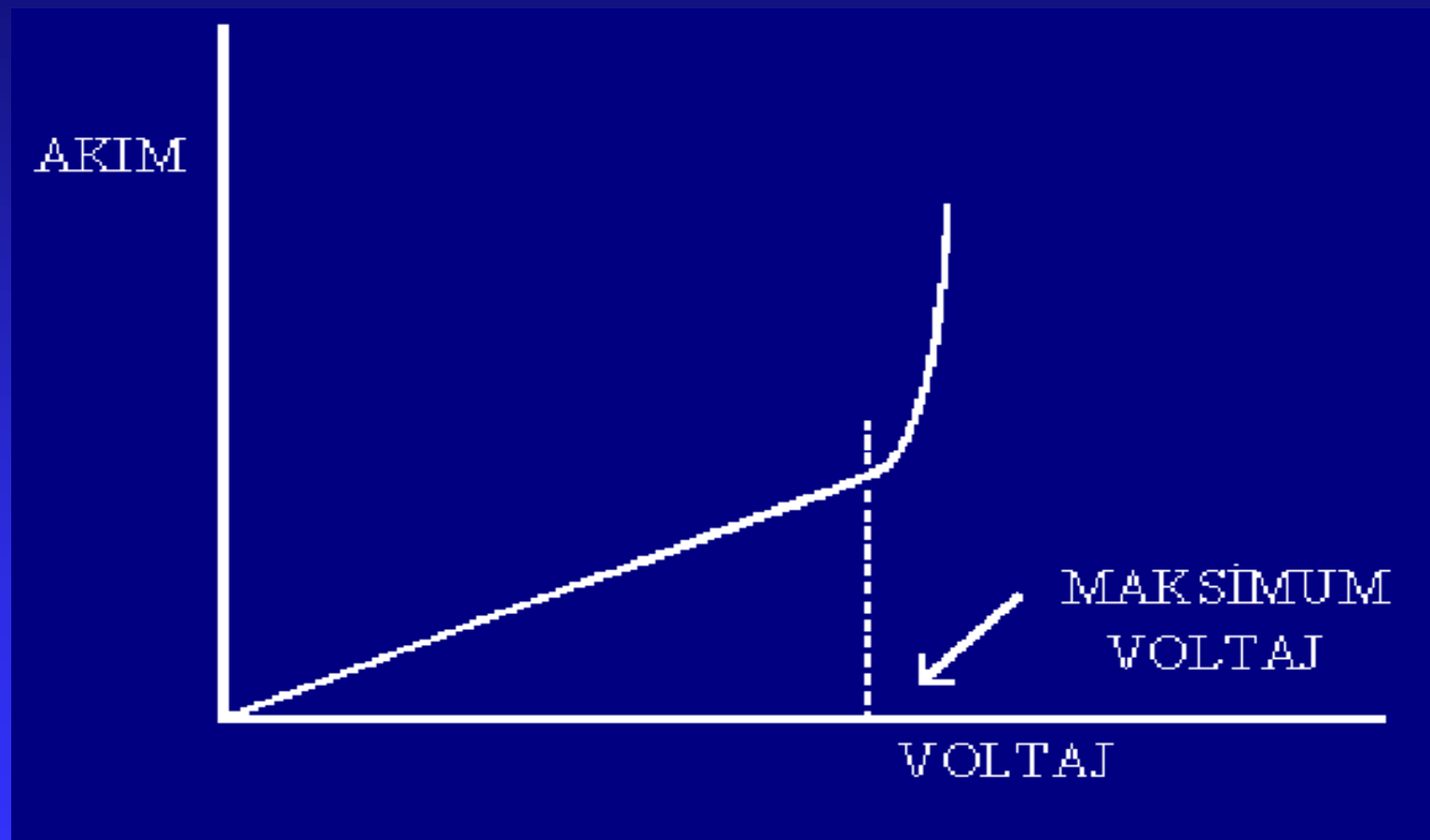




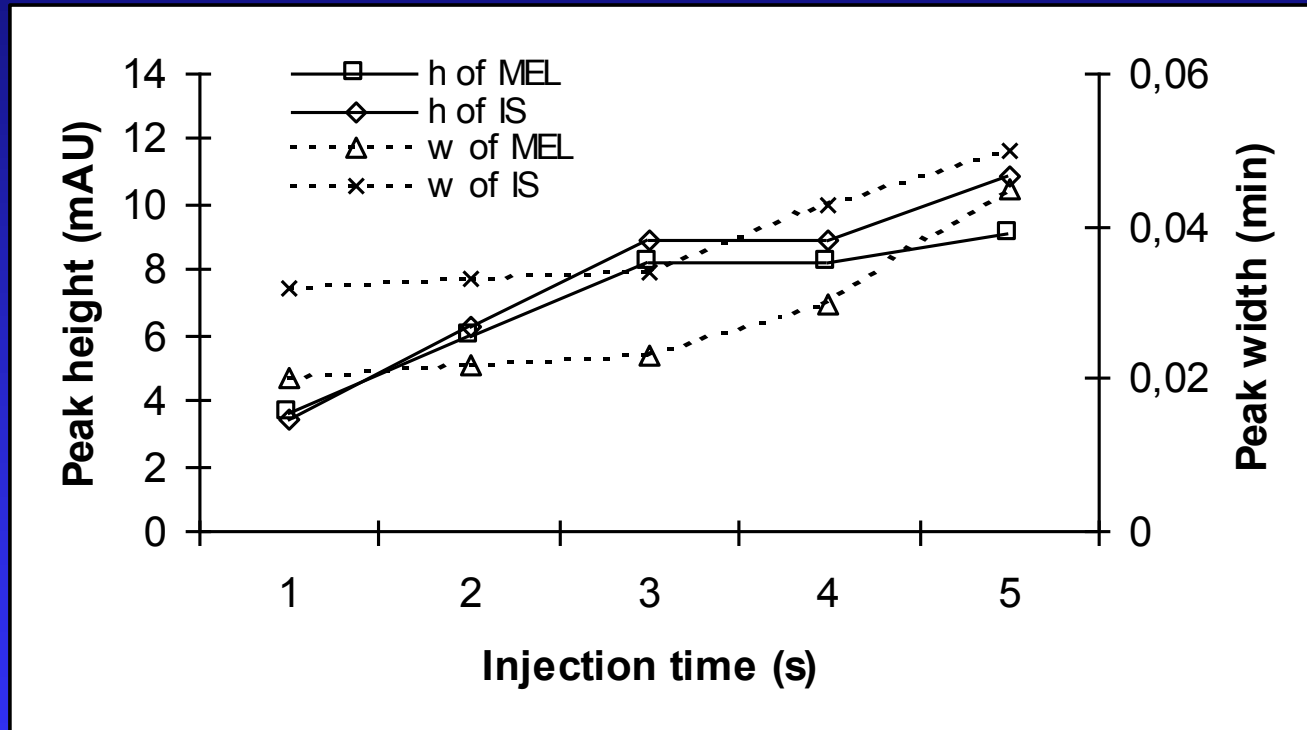
Sıcaklık etkisi



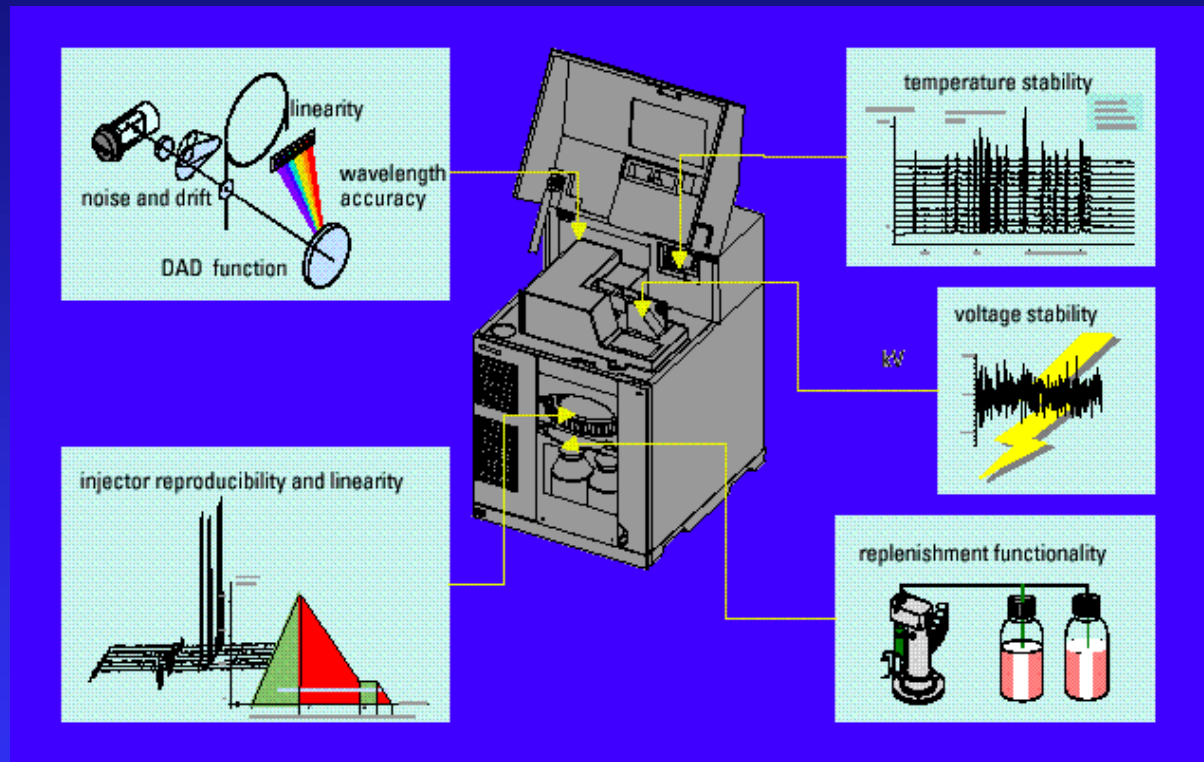
Uygulama voltajı

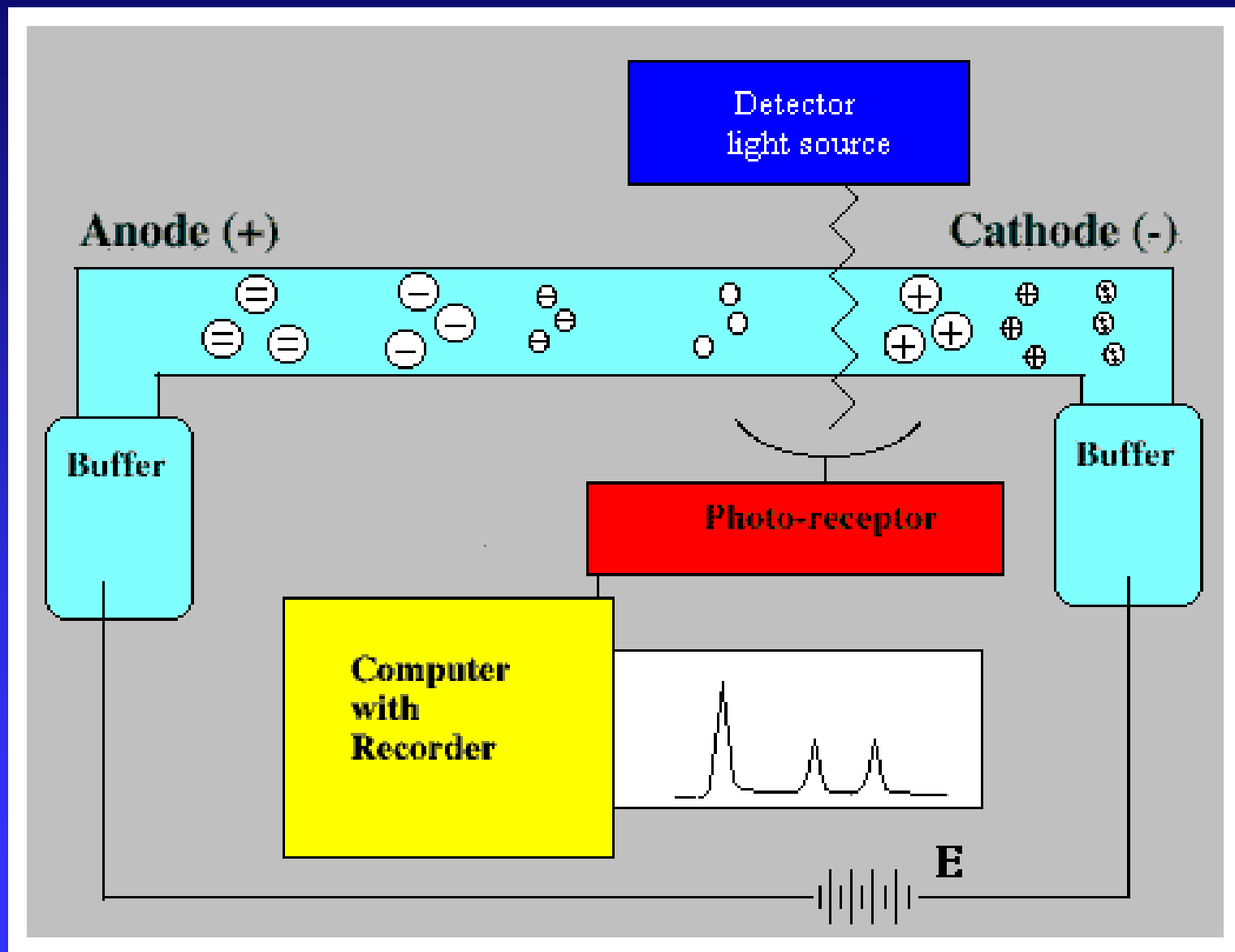


Enjeksiyon süresi



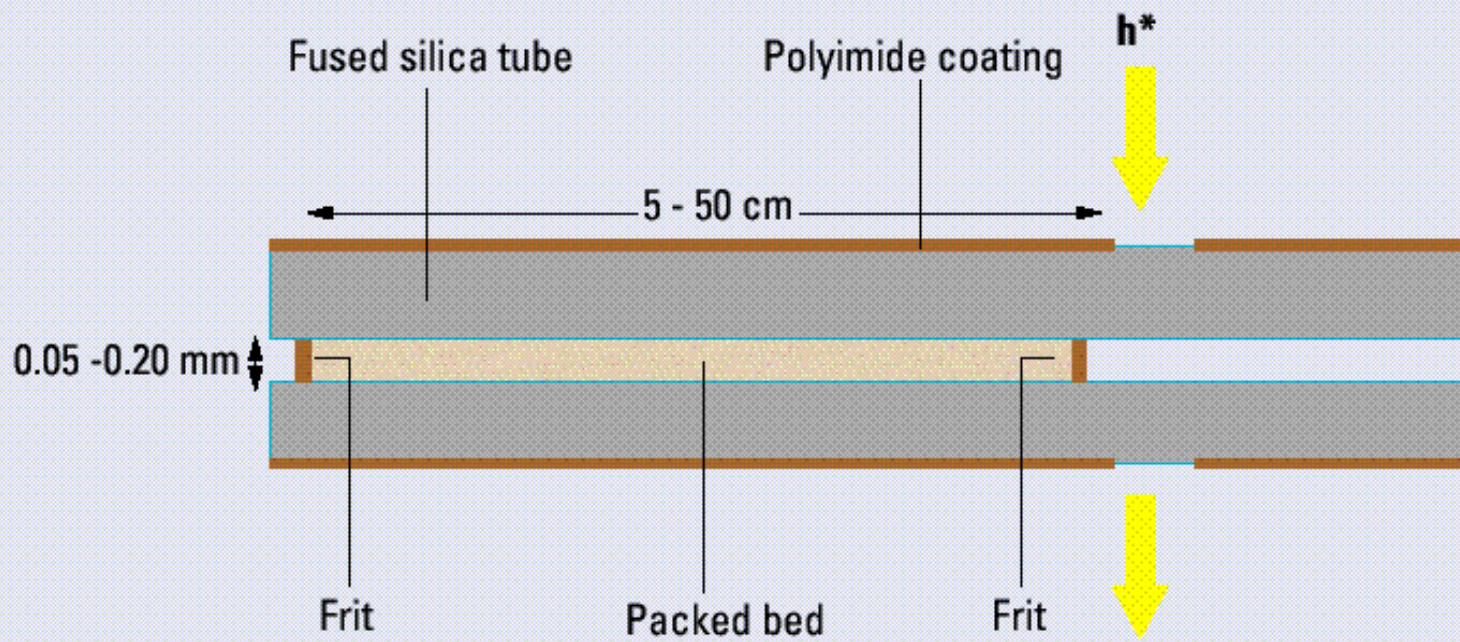
Kapiler elektroforez cihazı





Kapiler

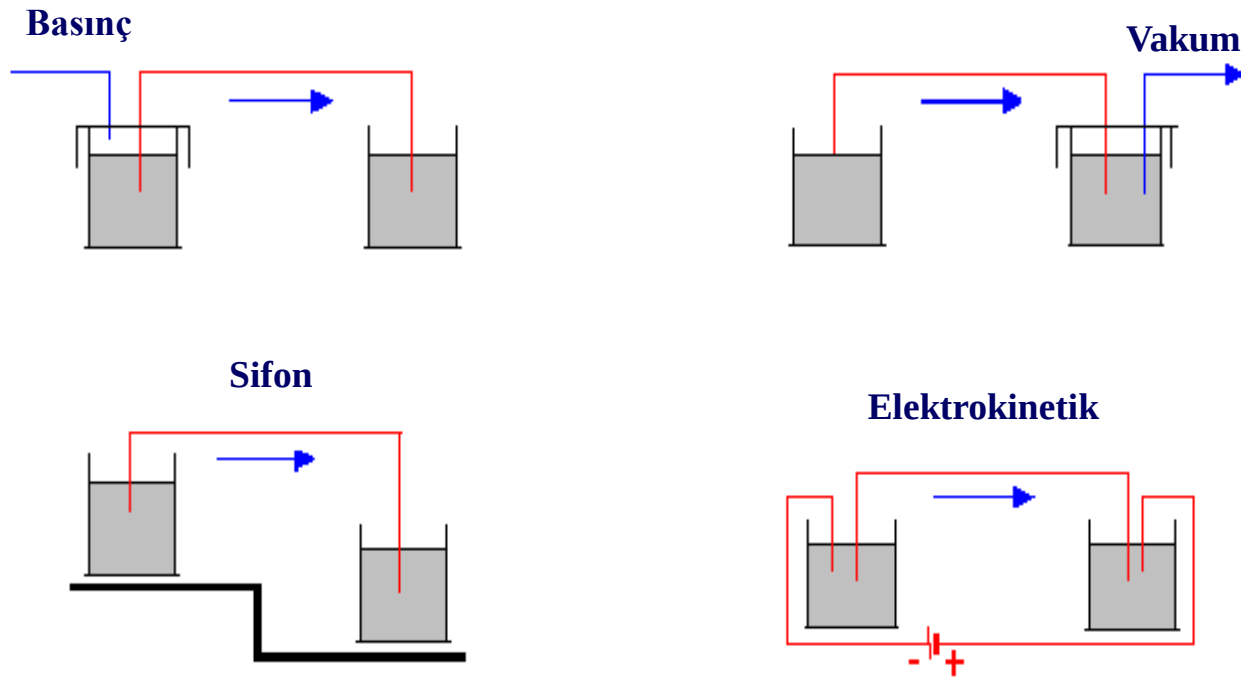
- Teflon kapiler
- Pyreks kapiler
- Fused silika kapiler
 - ◆ PVA kaplı kapiler
 - ◆ CEP kaplı kapiler
 - ◆ Kapiler elektrokromatografi kapileri



Kapilerin yıkanması

- Fused silika kapiler için
 - ◆ 1 N NaOH
 - ◆ 0.1 N NaOH
 - ◆ Distile su
 - ◆ Çalışma elektroliti
- Organik çözücü ve kuvvetli asit

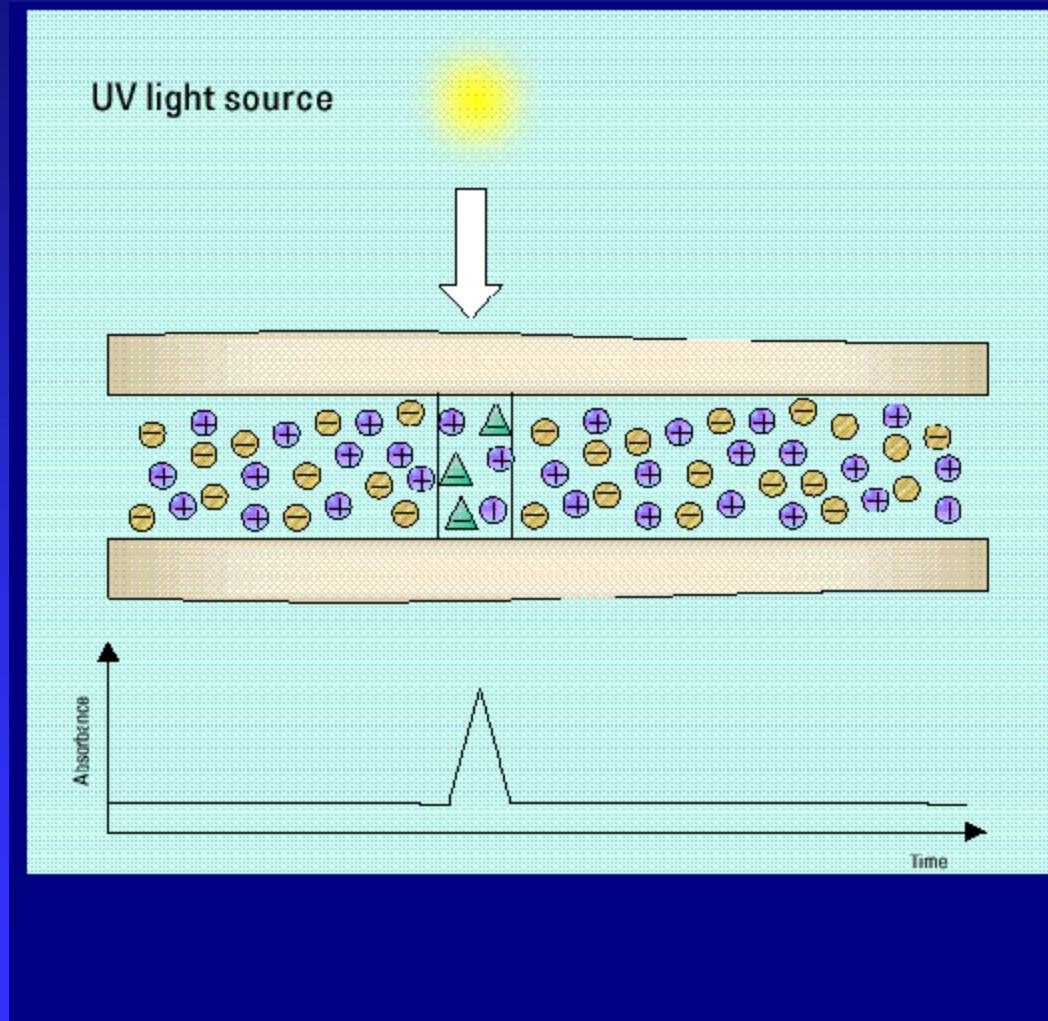
Enjeksiyon yöntemleri



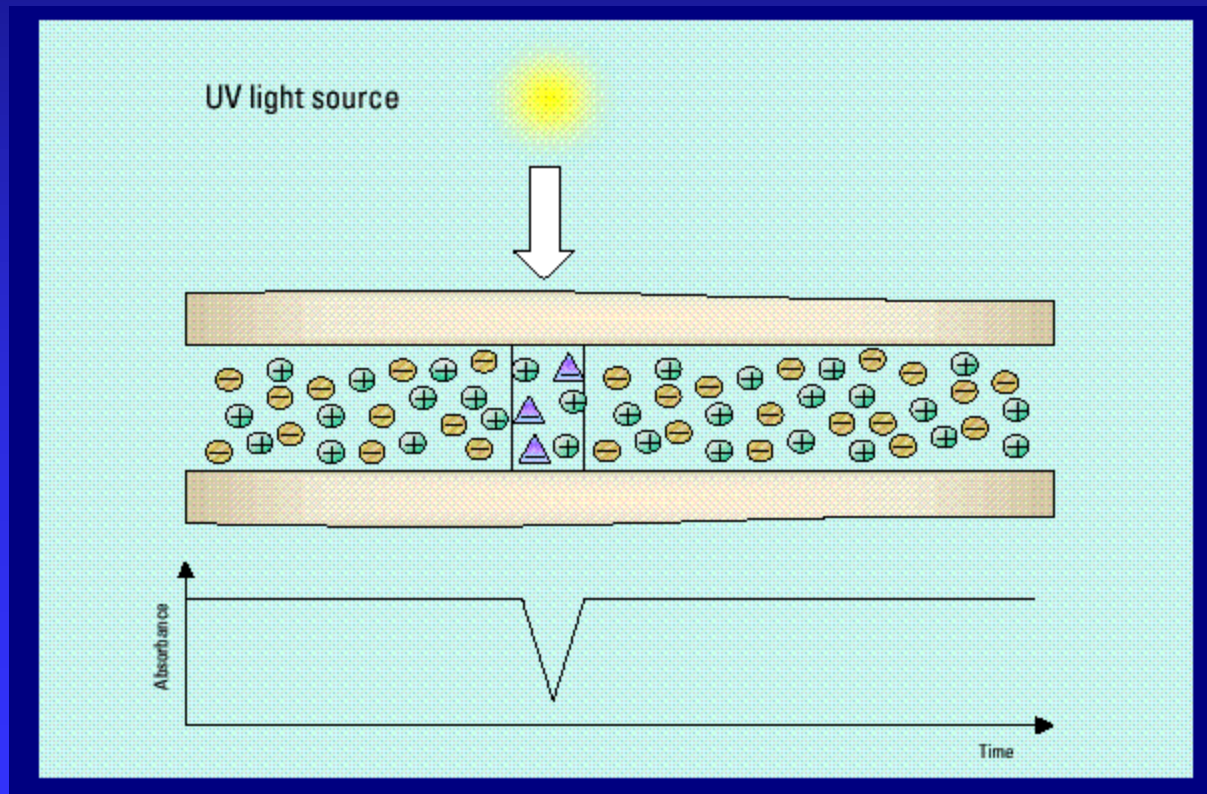
Dedektor

- UV/ VIS
- DAD
- Fluorescence
- Laser induced fluorescence
- Conductivity
- Indirect detection *

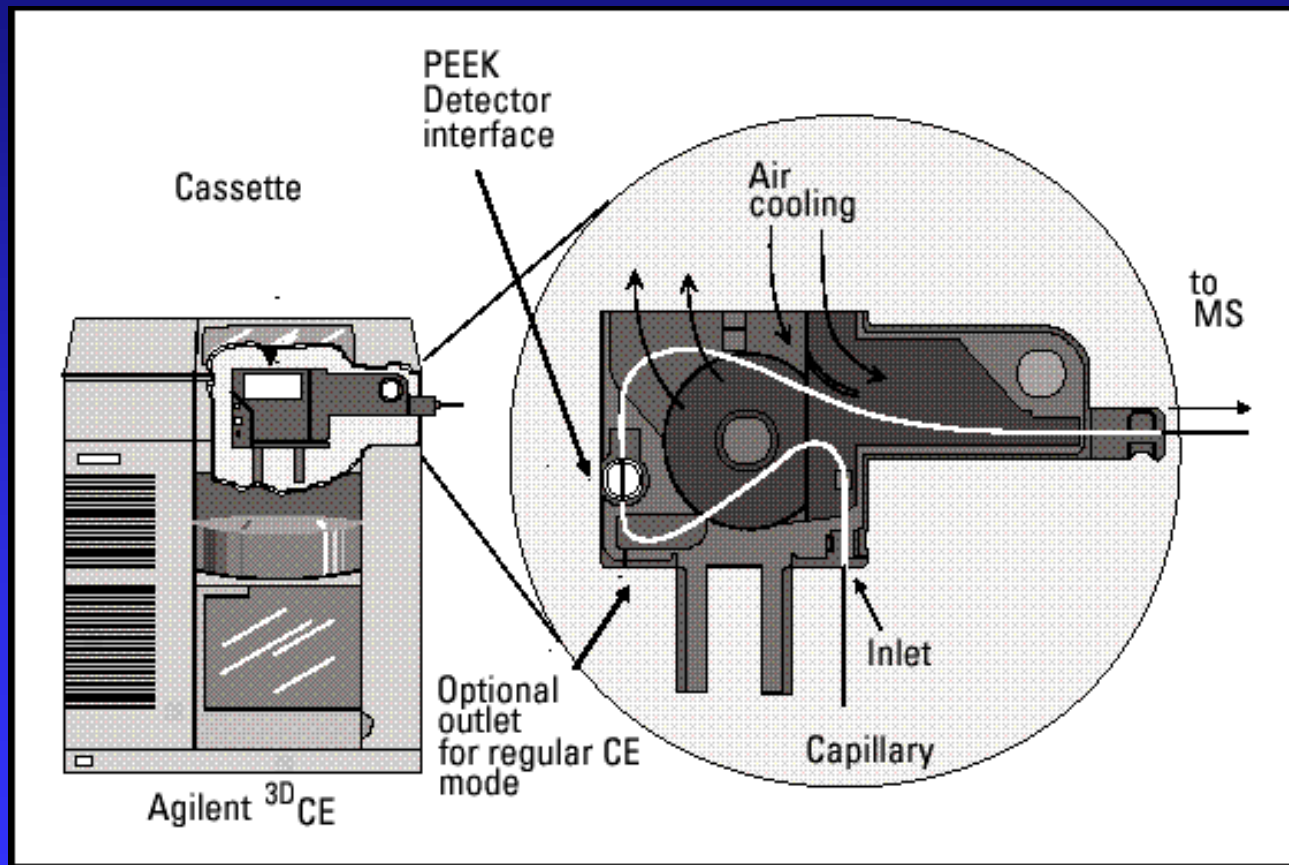
UV/VIS



İndirekt UV dedeksiyon



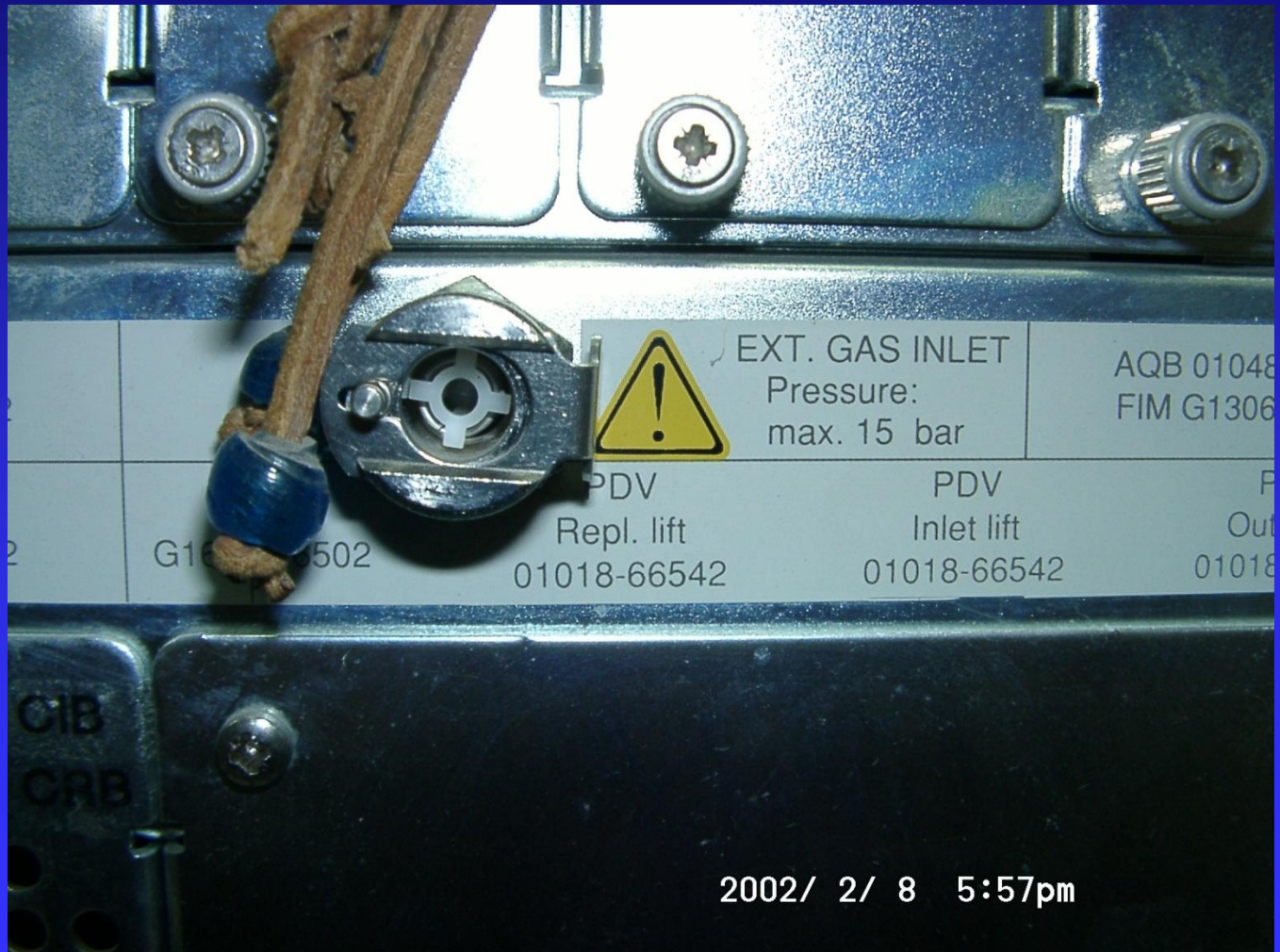
CE-MS



Vial

- Cam vial
- Renkli cam vial
- Mikro vial
- Polietilen vial

Dış basınç uygulanması



Kapiler termostat

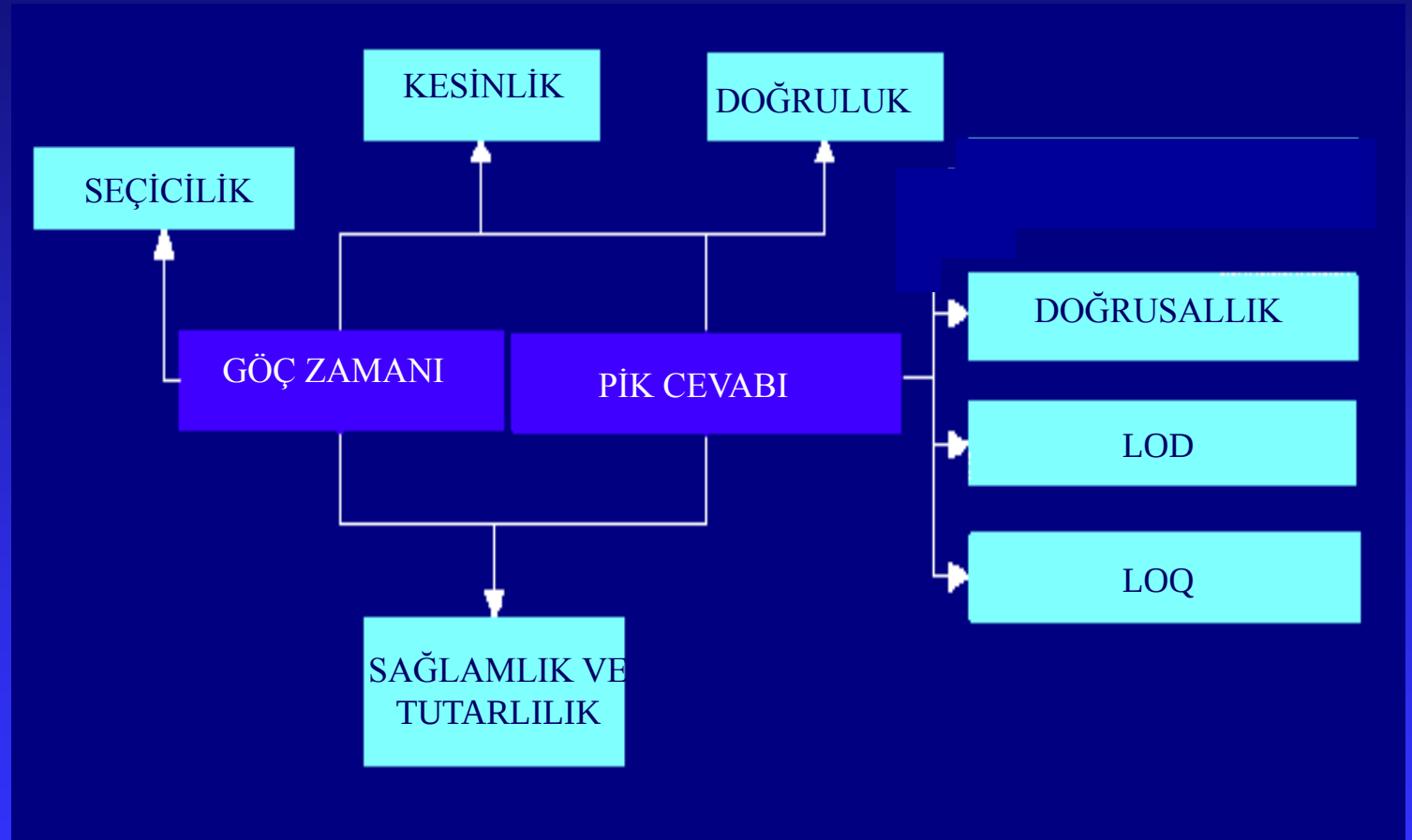
- Hava
- Su

Güç kaynağı

- 30 kV ile – 30 kV

Validasyon

- Doğrusallık (Linearity)
- Tekrarlanabilirlik (Repeability)
- Tayin sınırı (LOQ)
- Gözlenebilme sınırı (LOD)
- Sağlamlık (Robustness)
- Tutarlılık (Ruggedness)
- Kesinlik (Precision)
- Doğruluk (Accuracy)



İç Standart Seçimi

Avantajı

- Göç zamanındaki farklılıkları
- Enjeksiyondan gelebilecek farklılıkları

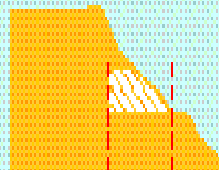
Doğrusallık

- Pik alanı
- Pik yüksekliği
- Pik alan oranları
- Pik normalizasyonu
(Pik alanı / Göç zamanı)
- Pik normalizasyon oranları

Pik Genişlemesi / Kuyruklanmasının Nedenleri

- Çalışma elektrolitinin derişimi
- Sıcaklık kontrolü ve Joule ısınması
- Enjeksiyon süresi
- Enjeksiyon ile numune taşınması
- Kapiler yüzeyine adsorpsiyon
- Kapiler yüzeyinin şartlandırılması
- Kapilerin düzgün kesilmemesi veya zamanla zarar görmesi
- Numune derişimi

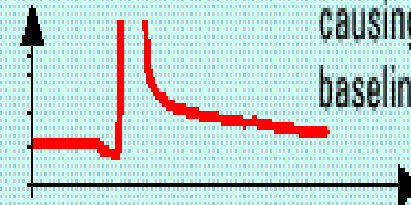
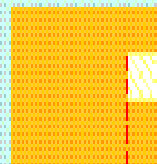
Capillary



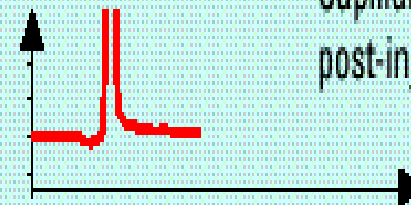
Sample plug



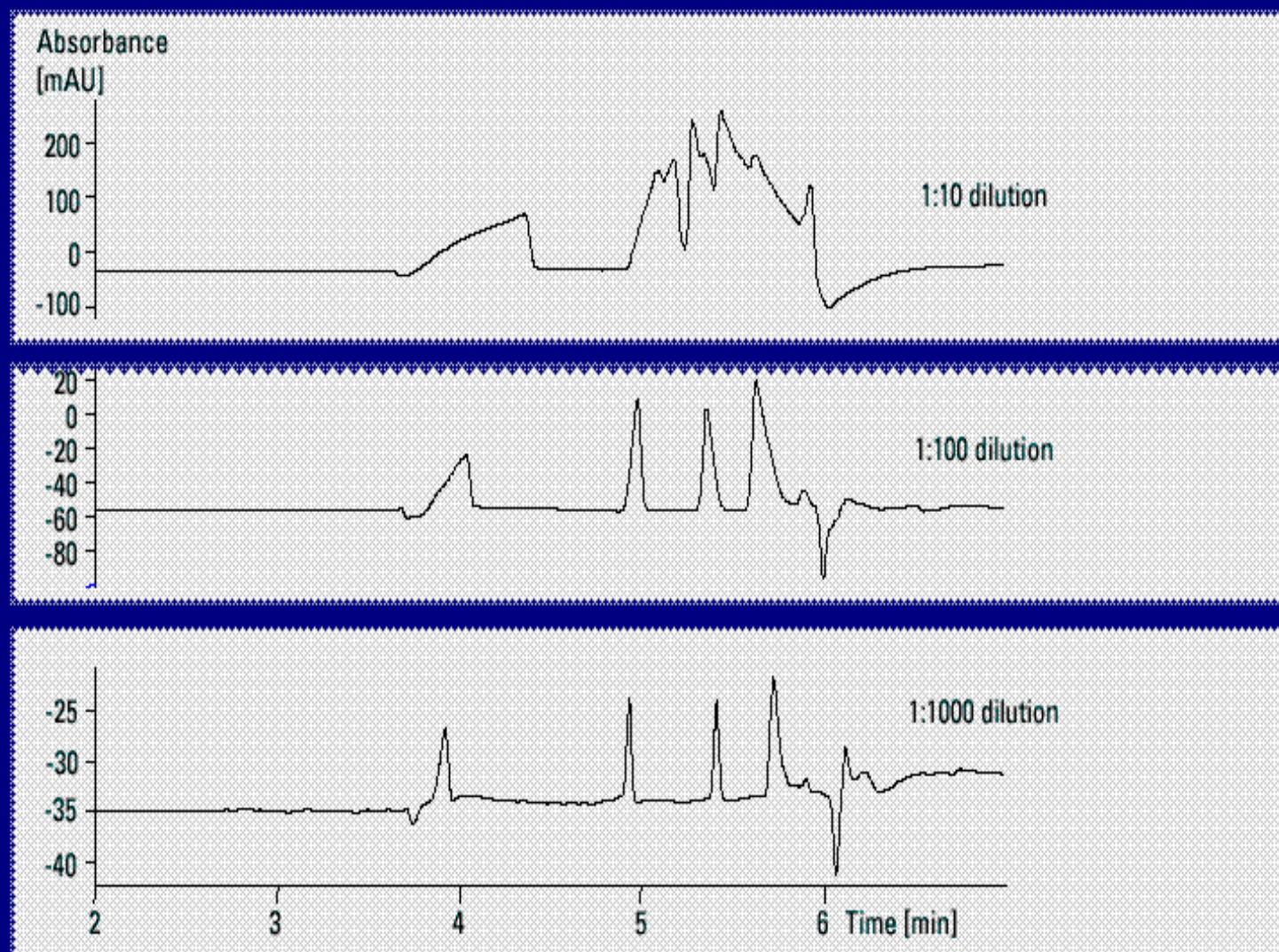
Peak shape



Capillary end damaged
causing tailing and
baseline rise

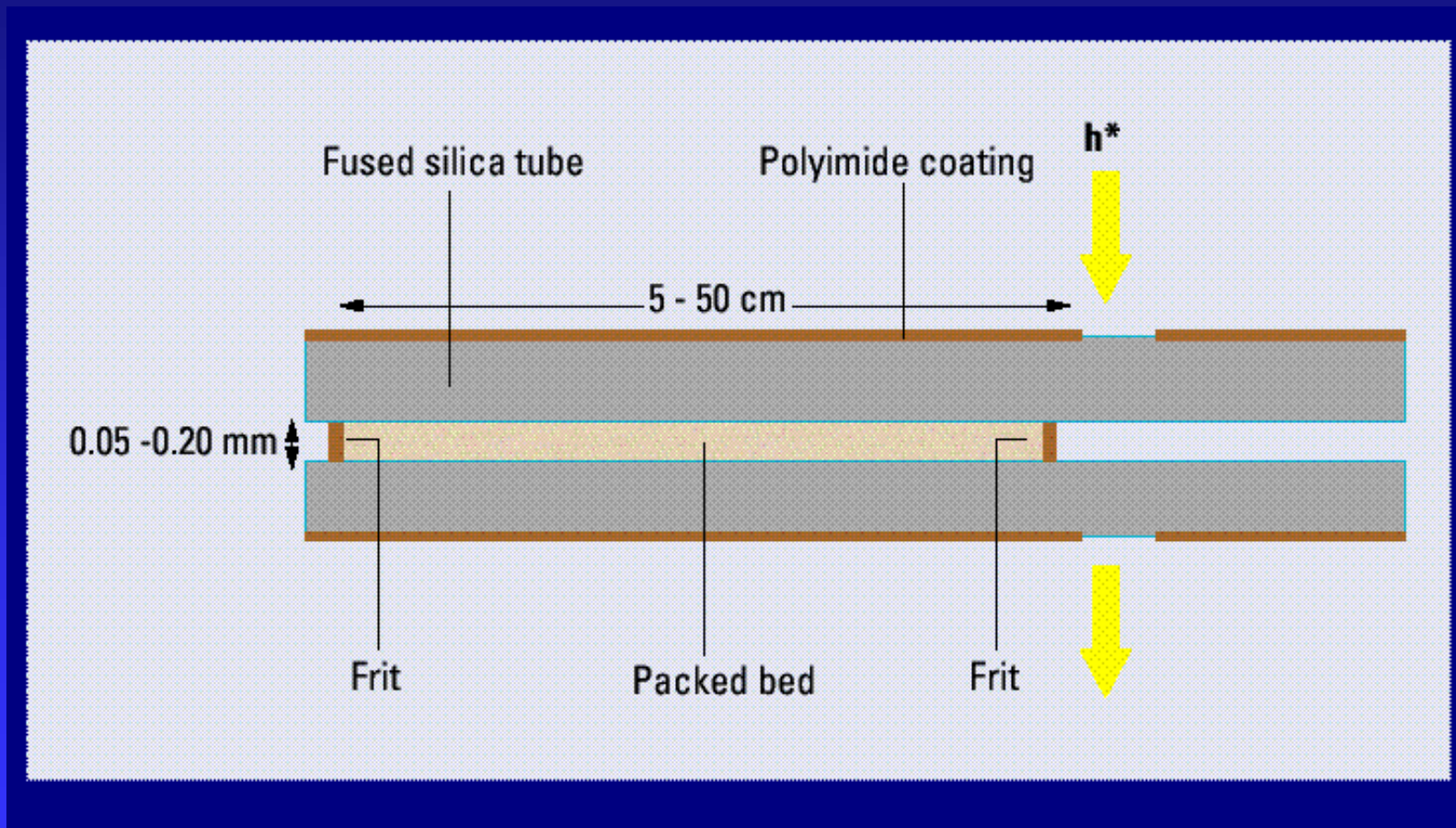


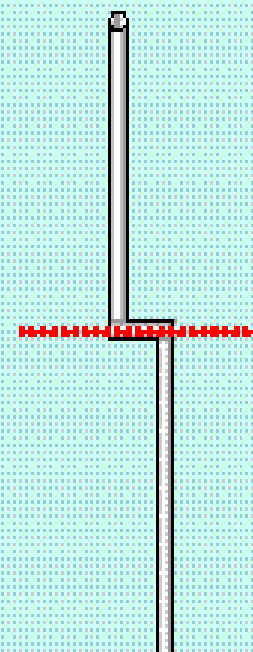
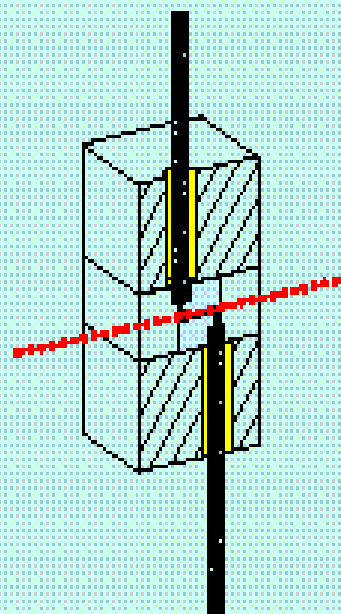
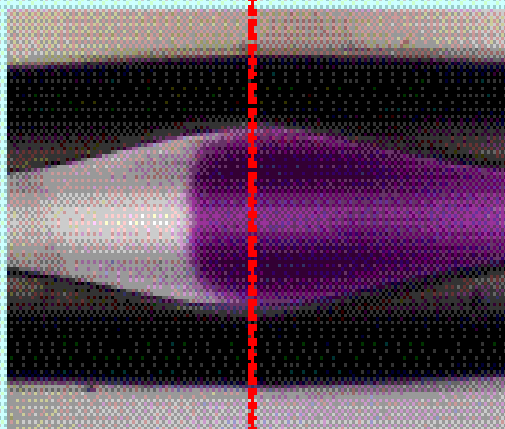
Capillary end recut +
post-injection wash



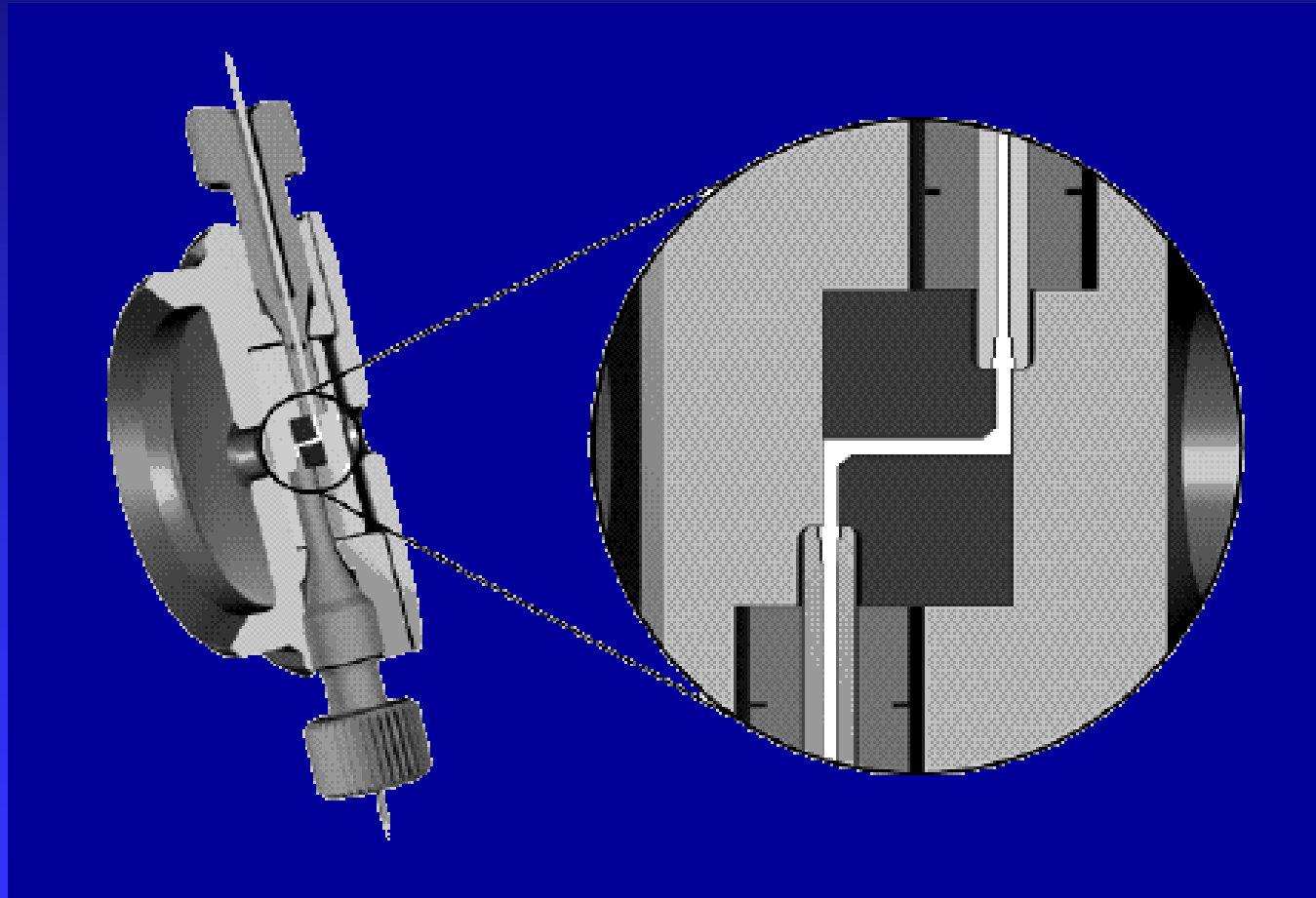
Duyarlılığın artırılması

- Dedektör hücresi
- Numune yüklemesi (Sample stacking)





High sensitivity cell



Kesinlik

- İç standart kullanımı
- Sıcaklık kontrolü
- Enjeksiyon zon genişliği
- Kapilerin şartlandırılması
- Buharlaşma
- Çalışma elektrolitinin hazırlanması

Kapiler elektroforezde yöntem geliştirme

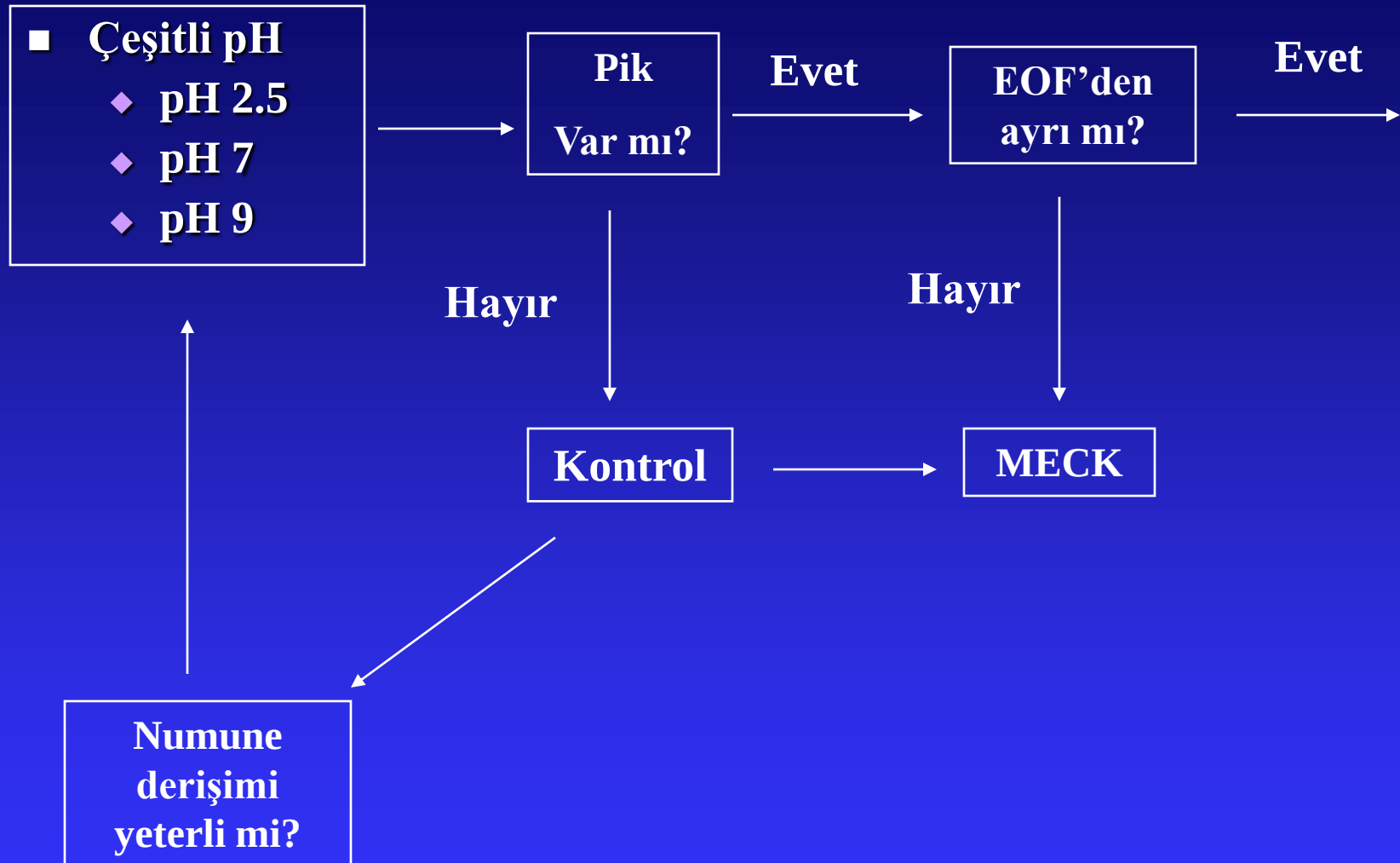


■ Literatür tarama

- ◆ Çözünürlüğü

- ◆ pKa

- ◆ Tanımlanabilmesi (Direkt & indirekt)



Optimizasyon

Ayırım

- pH
- Kapiler uzunluğu
- Enjeksiyon hacmi
- Voltaj
- Kapiler iç çapı

Pik şekli

- Tampon derişimi
- Tampon içerięi
- Organik faz

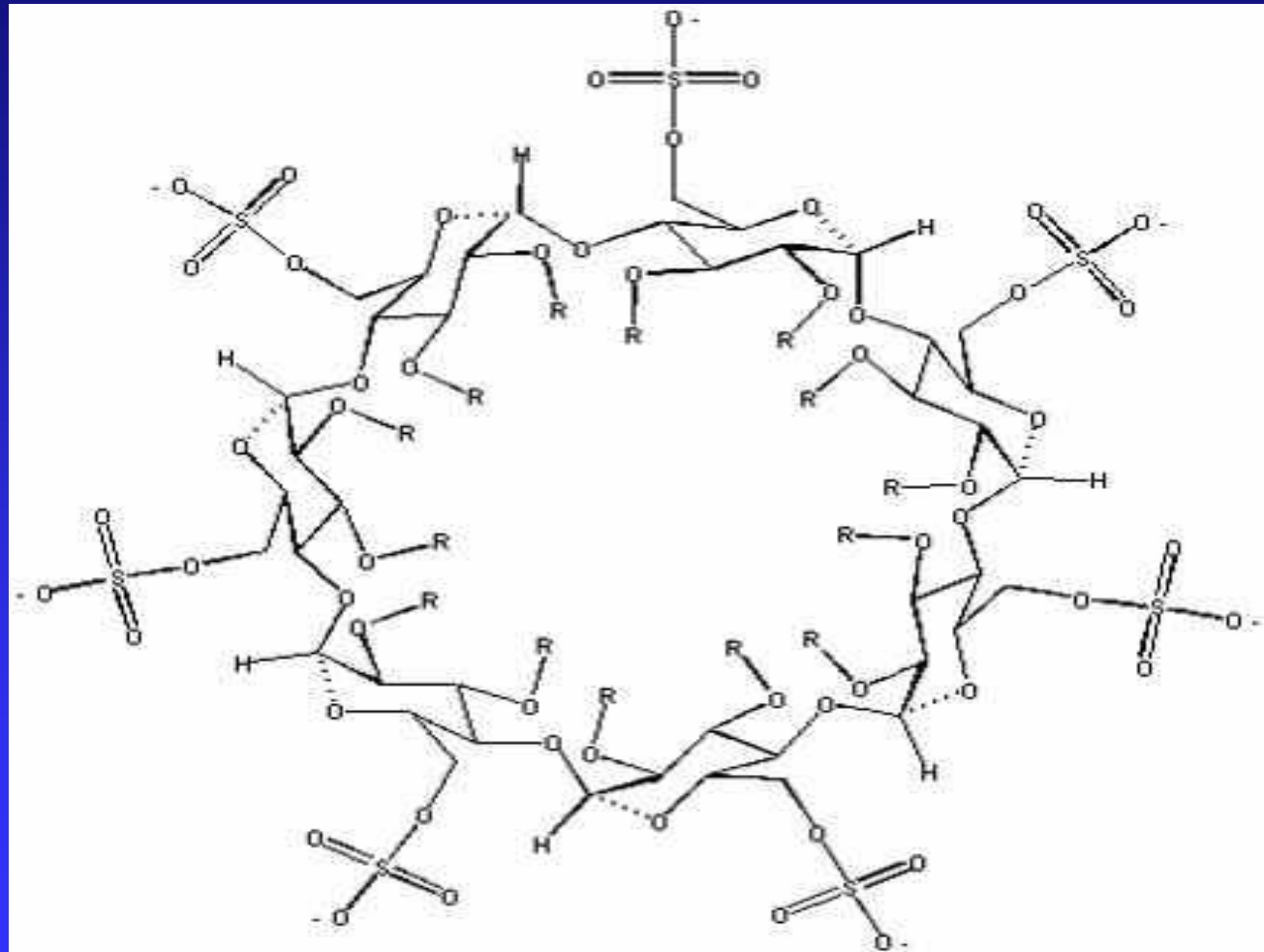
Göç zamanı

- pH
- Kapiler uzunluğu
- Voltaj
- Sıcaklık

Optik izomerlerin ayırımı

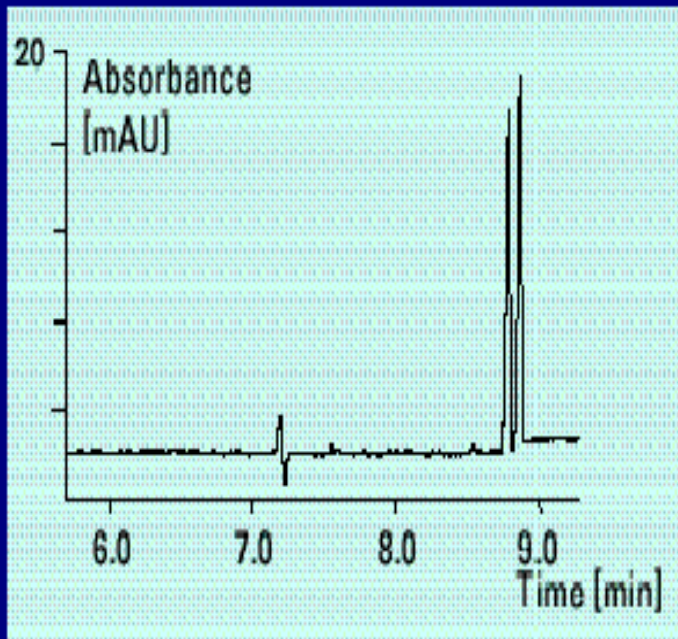
- D ve L isomerleri siklodekstran ilavesi ile ayrılabilirler.

Sülfat β siklodekstrin

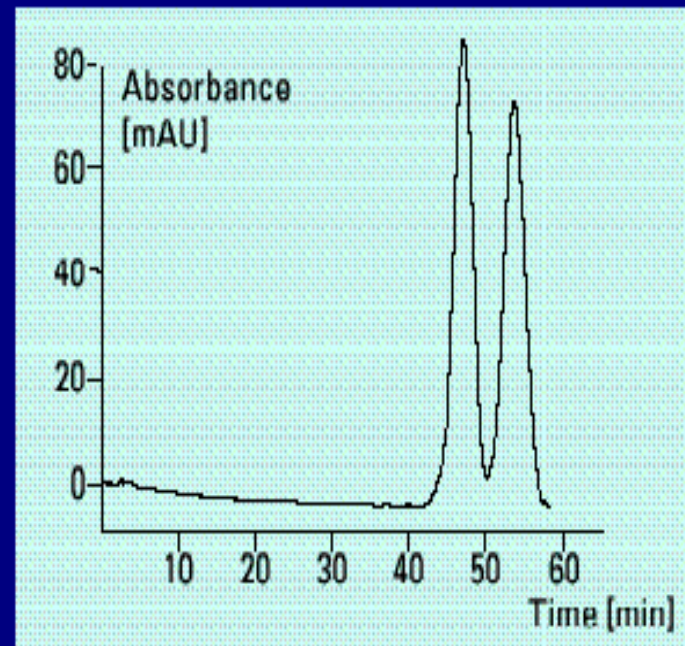


Hekzabarbital

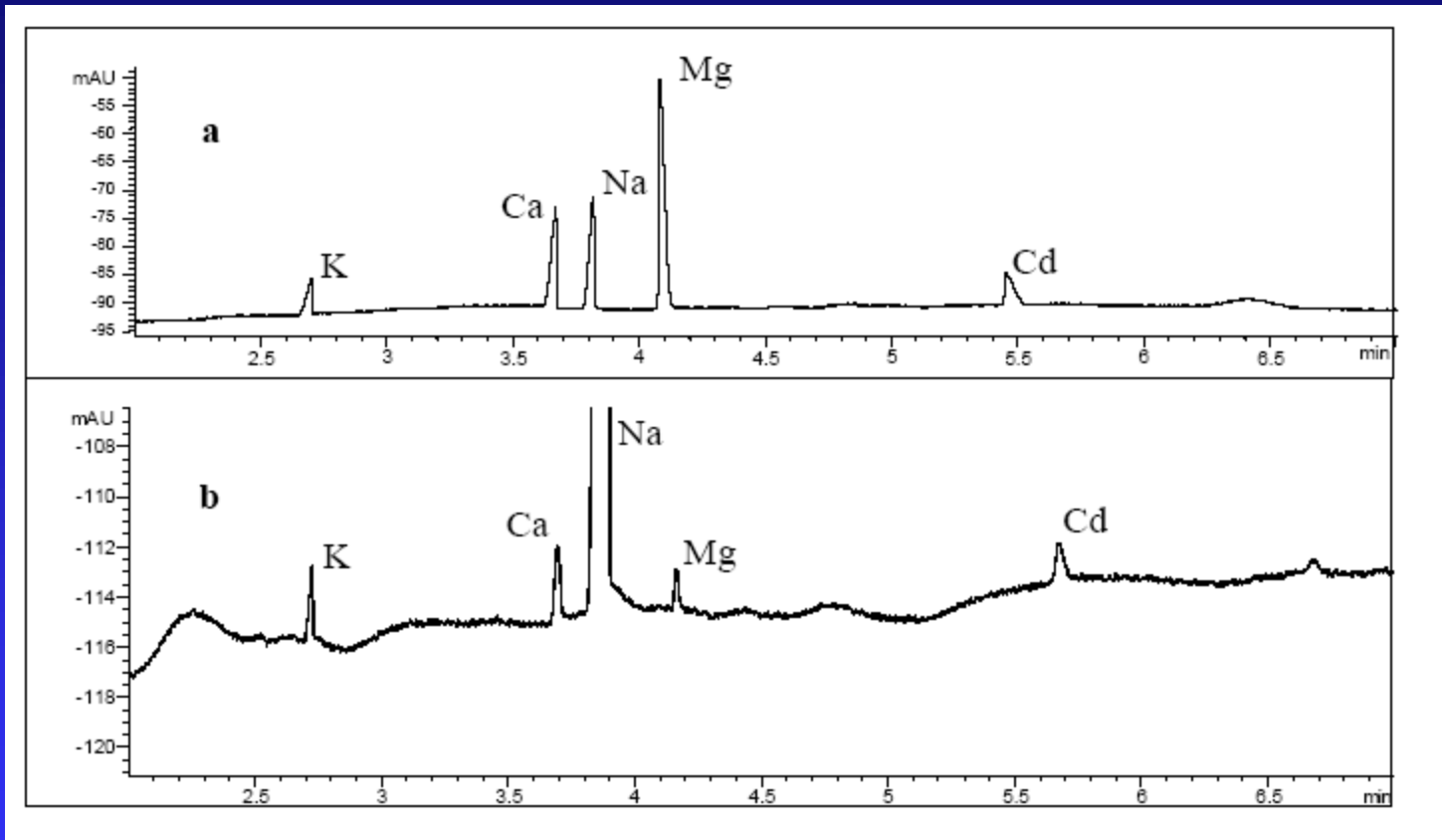
CZE



HPLC



Kanda katyon tayini



E. Nemutlu, N. Özaltın, “Determination of magnesium, calcium, sodium and potassium in blood plasma sample by capillary zone electrophoresis *Anal. Bioanal. Chem.* 383 833–838, 2005.

Kaynaklar:

- Emirhan Nemutlu, Meloksikamın Farmasötik Preparatlardan UV Spektrofotometrisi ve Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Analizi, Bilim Uzmanlığı Tezi, ANKARA, 2002
- E. Nemutlu, N. Özaltın, “Determination of magnesium, calcium, sodium and potassium in blood plasma sample by capillary zone electrophoresis Anal. Bioanal. Chem. 383 833–838, 2005.
- N. Özaltın, E. Nemutlu, C. Yardımcı, İ. Süslü, “Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of nifedipine and its degradation product in pharmaceutical preparations”, Anal.Lett., 36 (2), 369-385, 2003.
- E. Nemutlu, N. Özaltın, S. Altınöz, “Determination of rofecoxib, in the presence of its photodegradation product, in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography”, J. Anal. Bioanal. Chem., 378 (2) 504-509, 2004.
- E. Nemutlu, C. Yardımcı, N. Özaltın, “Determination of sertaconazole in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis”, Anal. Chim. Acta, 547 83-88, 2005.
- Capillary Electrophoresis, Agilent