

ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΛΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Σκοπός της άσκησης

- Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του υγροχρωματογράφου
- Η εξοικείωσή τους με τις έννοιες όπως: χρόνος ανάσχεσης, t_R (ταυτοποίηση ουσιών), διαχωριστική ικανότητα στήλης, R , αριθμός θεωρητικών πλακών, N και $ΥΙΘΠ$ (αποδοτικότητα στήλης)
- Η κατανόηση του διαχωρισμού αντίστροφης φάσης και σύμφωνα με την πολικότητα των ενώσεων
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνης) σε φαρμακευτικά σκευάσματα

Τι θα πρέπει να έχουμε μελετήσει πριν έρθουμε στο εργαστήριο

Η θεωρία των χρωματογραφικών διαχωρισμών βρίσκεται στο κεφάλαιο 26 του βιβλίου «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης» των Skoog – Holler – Nieman (Μτφ Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης), ενώ η αντίστοιχη θεωρία της υγροχρωματογραφίας στο κεφάλαιο 28, σελ. 844-871. Αν και τα κεφάλαια είναι ιδιαίτερα μεγάλα, θα πρέπει να μελετήσουμε τα εξής σημεία:

- Περιγραφή της χρωματογραφίας (σελ.785-787)
- Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης (σελ. 790)
- Διεύρυνση ζώνης και αποδοτικότητα στήλης (σελ. 792-796)
- Διαχωριστική ικανότητα στήλης (σελ. 801)
- Εφαρμογές χρωματογραφίας (σελ. 809-812)
- Οργανολογία υγροχρωματογραφίας (σελ. 847-854)
- Χρωματογραφία κατανομής (σελ.860-863)
- Τις σημειώσεις της 1^{ης} διάλεξης που είναι διαθέσιμες στην ιστοσελίδα του μαθήματος: (http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental2/instrumental2_yliko.htm)

ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

Το αναλυτικό όργανο που χρησιμοποιούμε για την εκτέλεση της εργαστηριακής αυτής άσκησης, είναι ο υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης ή πίεσης (High Performance/Pressure Liquid Chromatography, HPLC), όπου χρησιμοποιούνται υψηλές πιέσεις για την προώθηση των οργανικών διαλυτών και την έκλυση των δειγμάτων και για τον λόγο αυτό πρέπει να λαμβάνουμε ορισμένα μέτρα ασφάλειας και προφύλαξης για την αποφυγή πιθανών ατυχημάτων:

1. Πρέπει να φορούμε εργαστηριακή μπλούζα και προστατευτικά γυαλιά.
2. Κοντά στο χώρο του οργάνου της HPLC δεν χρησιμοποιούμε λύχνους για να αποφύγουμε ανάφλεξη των οργανικών διαλυτών.
3. Χρησιμοποιούμε τοξικούς και διαβρωτικούς διαλύτες και ουσίες μόνο μέσα στους απαγωγούς και φρόντας πλαστικά γάντια.
4. Η τροφοδοσία της υπερπίεσης λυχνίας του οργάνου (254 nm) γίνεται με ρεύμα υψηλής τάσης, 1200 V, AC. Ποτέ δεν πρέπει να αποσυνδέουμε τη λυχνία με τον ρευματολήπτη (φίς) στην παροχή ρεύματος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιούμε μια αντλία για να προωθεί μια κινητή φάση, τον διαλύτη, με σταθερή ροή και με πιέσεις που κυμαίνονται από 500 έως 5000 psi (40-400 atm). Η οφθαλμοφανής υπεροχή της HPLC ως προς την κλασική υγροχρωματογραφία στήλης (μέσω βαρύτητας) είναι το ότι τα δείγματα μπορούν να διαχωριστούν πολύ ταχύτερα. Επίσης μη πτητικά δείγματα ή δείγματα που αποσυντίθενται εύκολα θερμικά και δεν μπορούν να αναλυθούν με την αεριοχρωματογραφία, μπορούν να διαχωριστούν με HPLC γρήγορα και αποτελεσματικά.

Στην HPLC εισάγουμε το δείγμα με ένεση στην κινούμενη φάση, η οποία περνάει από μια στήλη πληρωμένη από τη στατική φάση. Όπως και στην αεριοχρωματογραφία, ο διαχωρισμός ενός μίγματος στα συστατικά του βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους ανάσχεσης (t_R) κάθε συστατικού μέσα στη στήλη. Αυτό

εξαρτάται από την κατανομή των ουσιών μεταξύ της υγρής κινητής φάσης και της υγρής στατικής φάσης. Η στατική φάση είναι υγρό, συνδεδεμένο χημικά με στερεό υπόστρωμα (συνήθως πυριτίας). Συστατικά του δείγματος, που κατανέμονται ισχυρά στη στατική υγρή φάση έχουν μεγάλο χρόνο ανάσχεσης.

Αν η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή φάση, αυτό το είδος της χρωματογραφίας **κατανομής** ονομάζεται **χρωματογραφία κανονικής φάσης** (normal phase chromatography). Αντίθετα, αν η κινητή φάση είναι πιο πολική από τη στατική, τότε η χρωματογραφία κατανομής ονομάζεται **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης** (reverse phase chromatography).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Ο σκοπός της άσκησης αυτής είναι η ποιοτική ανάλυση (ταυτοποίηση) διάφορων φαρμακευτικών ουσιών, που βρίσκονται σε αναλγητικά σκευάσματα, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενεργού συστατικού ασπιρίνης (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) σε δισκία ασπιρίνης και άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα με υδροχρωματογράφο υψηλής απόδοσης εφοδιασμένου με στήλη αντίστροφης φάσης. Με την αυτή στήλη και συσκευή είναι δυνατός ο προσδιορισμός καφεΐνης στον καφέ, τσάι, Coca-Cola και Pepsi-Cola.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός διαφόρων αναλγητικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα κατά την παραγωγική διαδικασία γίνεται με χρήση της HPLC. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνουμε ταχείς και εύκολους διαχωρισμούς και προσδιορισμούς ταυτόχρονα πολλών ουσιών με μικρή ή καθόλου προκατεργασία του δείγματος.

Με τη χρησιμοποίηση στήλης πληρωμένης με υλικά αντίστροφης φάσης πετυχαίνουμε διαχωρισμούς των πέντε (5) συνήθων δραστικών αναλγητικών ουσιών (ασπιρίνης, καφεΐνης, π-ακεταμινοφαινόλης, φαινακετίνης, σαλικυλαμίδιου), που βρίσκονται στα φαρμακευτικά σκευάσματα και με βάση τις τιμές των χρόνων ανάσχεσης των προτύπων ουσιών πετυχαίνουμε την ταυτοποίηση των ουσιών αυτών.

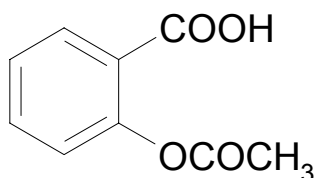
Από τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα των δειγμάτων υπολογίζουμε το ύψος των αντίστοιχων κορυφών και την ποσότητα της ουσίας στο δείγμα με βάση τον συντελεστή βαθμονόμησης της αντίστοιχης ουσίας. Ο συντελεστής βαθμονόμησης μιας ουσίας υπολογίζεται είτε ενίοντας ένα πρότυπο διάλυμα (μια συγκέντρωση) της καθαρής ουσίας ή περισσότερα διαλύματα (μέχρι πέντε συγκεντρώσεις), κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς και υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς (ύψος ή εμβαδόν κορυφών συναρτήσει της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων).

Εφόσον η ταχύτητα ροής και η πίεση της αντλίας διατηρούνται σταθερές κατά τη διάρκεια των χρωματογραφημάτων, ο χρόνος ανάσχεσης, t_R (min), αποτελεί κριτήριο ταυτοποίησης των ουσιών και το ύψος της κορυφής (ή το εμβαδόν) μέτρο του ποσοτικού προσδιορισμού της ουσίας.

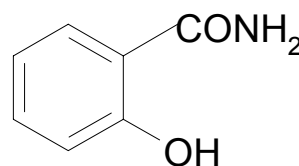
4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Πρότυπες ουσίες

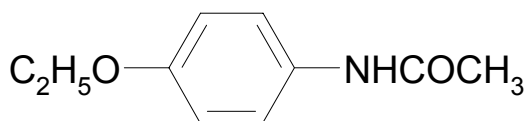
Ασπιρίνη, καφεΐνη, φαινακετίνη, ακεταμινοφαινόλη, σαλικυλαμίδιο.



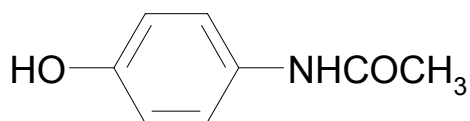
Ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ)
 $C_9H_8O_4$ - MB = 180,16



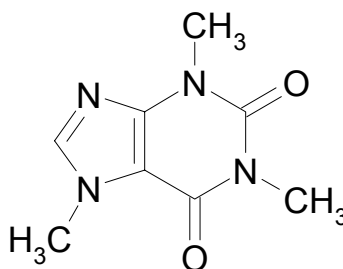
Σαλικυλαμίδιο (ο-υδροξυβενζαμίδιο)
 $C_7H_7NO_2$ - MB = 137,14



Φαινακετίνη (ακετοφαινετιδίνη)
C₁₀H₁₃NO₂ - MB = 179,22



Παρακεταμόλη (π-ακεταμινοφαινόλη)
C₈H₉NO₂ - MB = 151,16



Καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλο-2,6-διοξυπουρίνη)
C₈H₁₀N₄O₂ - MB = 194,19

Δείγματα: Αναλγητικά δισκία, όπως ασπιρίνη Bayer, BC Powder, Depon, Lonarid.

Διαλύτες

- Μεθανόλη, χρωματογραφικώς καθαρή (HPLC grade)
- Οξικό οξύ, παγόμορφο
- Απιοντισμένο και απεσταγμένο νερό

Παρατήρηση 1: Οι διαλύτες και το απεσταγμένο ύδωρ πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (βαθμού HPLC) και επιπροσθέτως πριν χρησιμοποιηθούν πρέπει να διηθηθούν και να απαερωθούν με συσκευή διήθησης κενού. Αυτή η προκατεργασία είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί απόφραξη των πόρων των κόκκων της στήλης καθώς και διακοπή της ροής του διαλύτη από φυσαλίδες.

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

5.1. Όργανα και σκεύη

1. Υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή UV (254 nm) της GOW-MAC, Model 80-652 (Σχήμα 1).
2. Στήλη αντίστροφης φάσης Thermo Hypersil BDS C18, μέγεθος κόκκων 5 μm, μήκους 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm.

Παρατήρηση 2: Υπάρχει πλήθος εμπορικών διαθέσιμων στηλών με υλικά πλήρωσης που οι κόκκοι έχουν μέγεθος 3 - 5 μm. Τα υλικά πλήρωσης αντίστροφης φάσης είναι, συνήθως, δύο τύπων: το υπόστρωμα είναι διοξείδιο του πυριτίου, SiO₂, σιλιανοποιημένο με πλευρική αλυσίδα C8 ή C18.

3. Καταγραφέας (Σχήμα 1).
4. Χρονόμετρο.
5. Σύριγγα 1 mL για την εισαγωγή του δείγματος και σύριγγα πλαστική για την εξαέρωση της αντλίας.
6. Σιφόνιο των 10 mL.
7. Κύλινδροι ογκομετρικοί των 10, 25, 100 και 500 mL.
8. Ογκομετρικές φιάλες: 2 των 100 mL, 6 των 50 mL και 1 των 500 mL.
9. Συσκευή διήθησης των διαλυμάτων και της κινητής φάσης (Millipore).

5.2. Περιγραφή του υδροχρωματογράφου

Ο υδροχρωματογράφος GOW-MAC 80-652 αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

1. Αντλία: η αντλία είναι μια δοσιμετρική αντλία (metering pump, Eldex Laboratories Inc.) σταθερής ροής και πίεσης για την άντληση και κυκλοφορία των διαλυτών, μέσω της στήλης και είναι κατάλληλη για σχετικά χαμηλές πιέσεις.
2. Αυτόματο σύστημα εισαγωγής δείγματος: βρόχος σταθερού όγκου 10 μL .
3. Στήλη: δέχεται στήλες μήκους 15-25 cm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 (ή 4,0 ή 3,2 ή 2,1) mm, κανονικής ή αντίστροφης φάσης.
4. Ανιχνευτής: αποτελείται από μια λυχνία υδραργύρου χαμηλής πίεσης που εκπέμπει στα 254 nm. Το φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής με οπτικά παράθυρα από χαλαζία υψηλής καθαρότητας, όγκου 20 μL και οπτικής διαδρομής 10 mm.

5.3. Ρύθμιση και λειτουργία του υδροχρωματογράφου

1. Συνδέουμε τον υδροχρωματογράφο και τον καταγραφέα με ρευματοδότη 220V-AC, μέσω μετασχηματιστή 220/110 V-AC.
2. Ξεβιδώνουμε την άκρη της αντλίας και προσαρμόζουμε την πλαστική σύριγγα (Σχήμα 1 και 2).
3. Θέτουμε το όργανο στη θέση "ON" και πιέζουμε τον διακόπτη "RESET". Έτσι σε περίπτωση που θα ξεπεραστεί η πίεση των 2100 psi (1 psi -pound per square inch- \equiv 0,06805 atm) θα σταματήσει αυτόματως η λειτουργία της αντλίας, ενώ συγχρόνως ο ίδιος διακόπτης θέτει σε κίνηση την αντλία.
4. Με τη σύριγγα αντλούμε λίγα mL κινητής φάσης. Απομακρύνουμε τη σύριγγα, με ξεβίδωμα και παρατηρούμε το άνοιγμα της βαλβίδας. Αν έχει φυσαλίδες, ελέγχουμε τη στάθμη στο δοχείο αποθήκευσης της κινητής φάσης.
5. Προσαρμόζουμε πάλι τον χαλύβδινο σωλήνα στην αντλία και ρυθμίζουμε την ροή με το μικρόμετρο στη θέση 20 (1 mL/min). Είναι προτιμότερο να ελέγχουμε τη ροή με ογκομετρικό κύλινδρο και χρονόμετρο, λόγω της μη ιδανικής λειτουργίας της στήλης για διάφορους λόγους (ύπαρξη φυσαλίδας κλπ.).
6. Ανοίγουμε ξανά την αντλία και μετά 3-5 min αρχίζει η αποβολή διαλύτη στο δοχείο αποβλήτων.

ΠΡΟΣΟΧΗ: ΟΠΟΤΕ ΑΝΟΙΓΟΥΜΕ ΤΟ ΟΡΓΑΝΟ, ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΝΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ, ΠΙΕΖΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΔΙΑΚΟΠΤΗ "RESET", ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΠΟΥ Η ΠΙΕΣΗ ΑΝΕΒΕΙ ΣΕ ΥΨΗΛΑ ΕΠΙΠΕΔΑ.

7. Θέτουμε σε λειτουργία τον καταγραφέα και τον αφήνουμε λίγη ώρα για θερμική και ηλεκτρική εξισορρόπηση. Δεν είναι ανάγκη η βελόνα να κινείται. Θέτουμε το κουμπί ελέγχου απορρόφησης στο "S" (Εσωτερική σύνδεση καταγραφέα).
8. Ρυθμίζουμε τη γραφίδα του καταγραφέα, ώστε η γραφίδα να φτάσει στο 0 (αρχή καταγραφικού χάρτου) ή στο 5 (διαιρέσεις) από το δεξιό άκρο του καταγραφικού χάρτου.
9. Πορεία βαθμονόμησης: η βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με ένα φίλτρο που φέρει το όργανο και έχει γνωστή απορρόφηση. Φέρνοντας το στη θέση "out" εισέρχεται στη φωτεινή δέσμη. Τότε, με διαλύτη πάντα σε ροή, γυρίζουμε τον ρυθμιστή απορρόφησης (ABSORBANCE control) στη θέση 0,64 (δηλαδή όλη η κλίμακα είναι 0,64 μονάδες απορρόφησης). Ο καταγραφέας θα πρέπει να δείξει 74 διαιρέσεις. Αν δε γίνει αυτό ρυθμίζεται το AU CAL για να ληφθούν 74 διαιρέσεις. Αυτό βρίσκεται ακριβώς κάτω από το κουμπί με την ένδειξη EVENT MARKER (για αυτή τη ρύθμιση απαιτείται ένα μικρό κατσαβίδι). Βάζοντας το φίλτρο στη θέση "IN" ο καταγραφέας πρέπει να επανέρχεται στη θέση του μηδενός της προηγούμενης ρύθμισης (τώρα όμως από το ZERO του οργάνου). Τοποθετούμε το κουμπί απορρόφησης στα 0,32 AUFS (Absorbance Units Full Scale) και αφήνουμε τον καταγραφέα να διαγράψει τη γραμμή βάσης. Αυτή πρέπει να είναι ευθεία και χωρίς θορύβους. Τώρα το όργανο είναι έτοιμο προς χρήση.

Εισαγωγή του δείγματος στη στήλη

10. Στρέφουμε τον μοχλό του συστήματος εισαγωγής του δείγματος (βαλβίδα) κατά φορά αντίθετη των δεικτών του ρολογιού μέχρι το τέλος της διαδρομής (θέση **FILL**).
ΠΡΟΣΟΧΗ : ο μοχλός δεν πρέπει να είναι μισογυρισμένος.
11. Ξεβιδώνουμε την είσοδο της βαλβίδας στρέφοντας τον πάνω κοχλία.

12. Γεμίζουμε τη γυάλινη σύριγγα με πρότυπο διάλυμα ή δείγμα (πάνω από 100 μL), την τοποθετούμε στην είσοδο της βαλβίδας και σφίγγουμε τον κοχλία της εισόδου.
13. Πιέζουμε το έμβολο της σύριγγας μέχρις ότου φανεί υγρό από το σωλήνα αποβλήτων της βαλβίδας, πράγμα που σημαίνει ότι γέμισε ο βρόχος με δείγμα (10 μL).
14. Στρέφουμε τον μοχλό της βαλβίδας πλήρως κατά τη φορά του ρολογιού (θέση **INJECT**) και εισάγουμε αυτομάτως το δείγμα στη στήλη.
15. Καθώς εισάγουμε το δείγμα, πιέζουμε το κομβίο EVENT MARKER για να σημειωθεί ο χρόνος ένεσης πάνω στο χαρτί του καταγραφέα.
16. **Κατά την αποχώρηση:** κλείνουμε τον διακόπτη “POWER” που κλείνει επίσης και την αντλία.
17. Κλείνουμε τον καταγραφέα και σκεπάζουμε τη γραφίδα με το καπάκι της.
18. Τέλος συλλέγουμε και απορρίπτουμε καταλλήλως τα απόβλητα, σύμφωνα με τις οδηγίες του υπεύθυνου της άσκησης.



Σχήμα 1. Εργαστηριακή διάταξη υγροχρωματογράφου υψηλής απόδοσης (Gow-Mac 80-650) με την αντλία (αριστερά) και τον καταγραφέα (δεξιά).



Σχήμα 2. Αντλία χρησιμοποιούμενη στην άσκηση και ο υγροχρωματογράφος με τη στήλη και το σύστημα εισαγωγής δείγματος.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1^ο μέρος της άσκησης: Ποιοτική Ανάλυση

Παρασκευή κινητής φάσης: Σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 mL προσθέτουμε 3 mL παγόμορφου οξικού οξέος, 150 mL μεθανόλης και 147 mL απεσταγμένου ύδατος. Αναμιγνύουμε καλά και κατόπιν διηθούμε με συσκευή διήθησης-απαερισμού (Millipore).

Προετοιμασία των προτύπων διαλυμάτων:

Ζυγίζουμε με αναλυτικό ζυγό και μεταφέρουμε σε πέντε ογκομετρικές φιάλες των 50 mL, αντιστοίχως:

- 50 mg ασπιρίνης,
- 25 mg σαλικυλαμίδιο,
- 20 mg καφεΐνης,
- 20 mg ακετοφαινετιδίνης, και
- 10 mg π-ακεταμινοφαινόλης

Προσθέτουμε σε κάθε φιάλη 25 mL μεθανόλης και συμπληρώνουμε με απεσταγμένο ύδωρ.

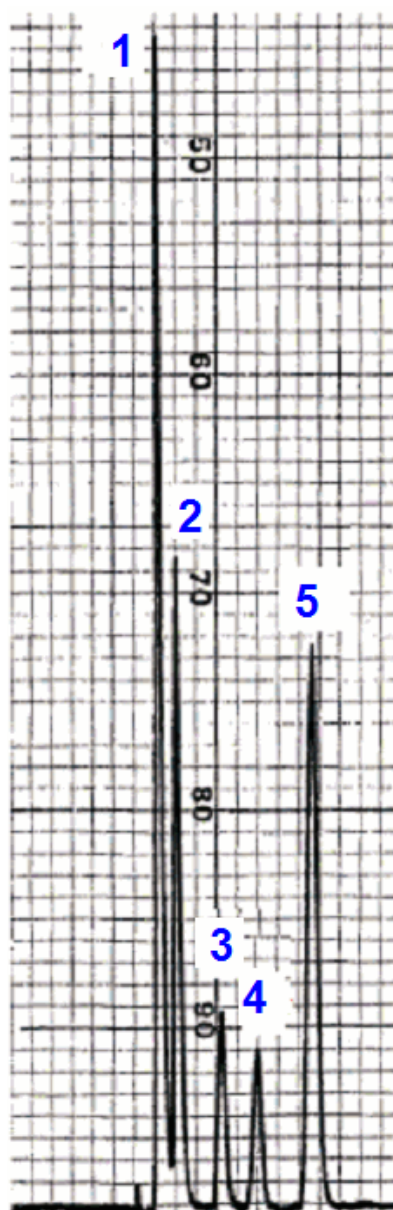
Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL μεταφέρουμε με σιφόνιο 10 mL από τα παραπάνω διαλύματα (**μίγμα πέντε προτύπων ουσιών**).

Εισάγουμε με ένεση 10 μ L κάθε πρότυπου καθώς και του μίγματος των προτύπων στη στήλη. Η θέση της κλίμακας απορρόφησης τίθεται στα:

- 1,28 AUFS (για την ασπιρίνη και το σαλικυλαμίδιο),
- 2,56 AUFS (για τις καφεΐνη, π-ακεταμινοφαινόλη και ακετοφαινετιδίνη) και
- 0,64 AUFS (μίγμα πέντε προτύπων ουσιών)

Κάθε πρότυπο, όπως και το μίγμα, εισάγεται μία φορά με τη σύριγγα του 1 mL.

Παρατήρηση 3: Χρειάζεται μεγάλη προσοχή στην καθαριότητα της σύριγγας του 1 mL. Η σύριγγα εκπλένεται επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό και με πρότυπο διάλυμα ή δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί.



1. π-Ακεταμινοφαινόλη
2. Καφεΐνη
3. Σαλικυλαμίδιο
4. Ασπιρίνη
5. Φαινακετίνη

Σχήμα 3. Τυπικό χρωματογράφημα του μίγματος των πρότυπων ουσιών

Επεξεργασία των χρωματογραφημάτων – Υπολογισμοί:

Χρωματογράφημα είναι το κάθε καταγράφημα, που λαμβάνεται μετά από κάθε ένεση προτύπου διαλύματος ή δείγματος (σχήμα 3). Στον άξονα x είναι ο χρόνος σε min και στον άξονα y είναι το σήμα (απορρόφηση).

Αποκόπτουμε κάθε χρωματογράφημα από το ρολό του καταγραφικού χάρτου, την αριθμούμε και καταγράφουμε όλα τα στοιχεία και τις παραμέτρους της ανάλυσης: είδος στήλης, κινητή φάση (1% CH₃COOH και 50% CH₃OH σε απεσταγμένο νερό), πίεση (1000-1200 psi), ταχύτητα ροής (0,7-1,0 mL/min), ταχύτητα καταγραφέα (1 cm/min), μέγεθος δείγματος (10 μL), κλίμακα απορρόφησης (AUFS), ουσία και συγκέντρωσή της.

Υπολογίζουμε τους χρόνους ανάσχεσης, t_R (min), για κάθε πρότυπη ουσία από το σημείο εισαγωγής (ένεσης) του δείγματος:

$$t_R = \frac{x}{U_{\text{καταγραφέα}}}$$

Όπου, x : η διανυθείσα απόσταση σε cm, και

$U_{\text{καταγραφέα}}$: η ταχύτητα καταγραφέα (1 cm / min)

Ταυτοποιούμε τις ουσίες στο μίγμα των πρότυπων ουσιών και στα φαρμακευτικά σκευάσματα συγκρίνοντας τους χρόνους ανάλυσης των απλών προτύπων με τους χρόνους ανάλυσης στο μίγμα των ουσιών. Ετοιμάζουμε πίνακα με τους χρόνους ανάλυσης που μετρήσαμε για όλα τα χρωματογραφήματα και εξάγουμε τα σχετικά συμπεράσματα. Υπολογίζουμε τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης, R, της μιας ένωσης ως προς την επόμενη, ελέγχοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού:

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{(W_A + W_B)}$$

2^ο μέρος της άσκησης: Ποσοτικός προσδιορισμός ασπιρίνης σε αναλγητικά φάρμακα

Χρωματογραφικές συνθήκες: όπως στην ποιοτική ανάλυση.

Προετοιμασία προτύπου:

Ζυγίζουμε 350,0 mg προτύπου ασπιρίνης μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθενται 50 mL μεθανόλης, αναμιγνύεται το διάλυμα μέχρι διαλυτοποίησης και συμπληρώνεται η φιάλη με απεσταγμένο ύδωρ.

Παρασκευή των δειγμάτων:

Μεταφέρουμε ένα δισκίο του φαρμάκου (ασπιρίνη) σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προσθέτουμε 50 mL μεθανόλης και ανακινούμε μέχρι πλήρους διάλυσης. Συμπληρώνουμε τη φιάλη με απεσταγμένο ύδωρ μέχρι τη χαραγή και αφήνουμε να κατακαθίσει το διάλυμα για 10 min. Όγκος περίπου 10 mL από το υπερκείμενο υγρό διηθείται με πλαστική σύριγγα και κατάλληλο φίλτρο σύριγγας (Millipore) σε δοκιμαστικό σωλήνα.

Παρατήρηση 4: Η ασπιρίνη αποσυντίθεται στο διάλυμά της (υδρολύεται σε σαλικυλικό και οξικό οξύ). Έτσι όλα τα διαλύματά της πρέπει να χρωματογραφηθούν όσο το δυνατόν γρηγορότερα μετά την παρασκευή τους.

Κάνουμε δύο ενέσεις από 10 μL κάθε φορά από το πρότυπο διάλυμα και το δείγμα. Ταυτοποιούμε την ουσία στο άγνωστο διάλυμα (στο διάλυμα του φαρμακευτικού σκευάματος) συγκρίνοντας τον χρόνο ανάλυσης της κορυφής του χρωματογραφήματος του προτύπου με τον χρόνο ανάλυσης στο χρωματογράφημα του αγνώστου. Υπολογίζουμε τον μέσο όρο των υψών των χρωματογραφικών κορυφών.

Παρατήρηση 5: Ο υπολογισμός της ποσότητας της ασπιρίνης στο δείγμα με βάση το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής πρέπει να γίνεται μόνο εφόσον οι κορυφές είναι πολύ οξείες και δεν είναι ακριβής ο τρόπος υπολογισμού της επιφάνειας της κορυφής.

Υπολογισμός:

Ο υπολογισμός της ποσότητας της ασπιρίνης σε κάθε δισκίο (σε mg) γίνεται με σύγκριση προς το ύψος της κορυφής του πρότυπου διαλύματος της ασπιρίνης:

$$m_{\Delta} (mg) = \frac{[h_{\Delta} (cm)] \times [M_{\pi\rho} (mg)]}{[h_{\pi\rho} (cm)]}$$

Όπου:

h_{Δ} : το ύψος της κορυφής του άγνωστου δείγματος, σε cm

$h_{\pi\rho}$: το ύψος της κορυφής του προτύπου διαλύματος, σε cm

$M_{\pi\rho}$: η μάζα της πρότυπης ασπιρίνης που ζυγίσατε, σε mg

Παρατήρηση 6: Δεν είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς (συγκέντρωση ασπιρίνης συναρτήσει του ύψους (ή του εμβαδού) των κορυφών), επειδή συνήθως η ποσότητα της ασπιρίνης σε αναλγητικά σκευάσματα είναι περίπου της ίδιας τάξης (300-400 mg ανά δισκίο).

Πριν φύγουμε από το εργαστήριο

1. Καθαρίζουμε τα σκεύη που χρησιμοποιήσαμε.
2. Ζητούμε από τον επιβλέποντα τυχόν διευκρινήσεις για τη συγγραφή της έκθεσης και τις ερωτήσεις αυτοαξιολόγησης.

Οδηγίες για τη συγγραφή της έκθεσης

1. Θα περιγράψουμε συνοπτικά την αρχή του υδροχρωματογραφικού διαχωρισμού με χρωματογραφία κατανομής. Θα ορίσουμε τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Θα περιγράψουμε συνοπτικά την οργανολογία που χρησιμοποιήσαμε.
2. Θα παραθέσουμε τα χρωματογραφήματα σε κάθε τμήμα της άσκησης, στα οποία θα δίνονται οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος. Ειδικά θα αναφέρονται σε κάθε χρωματογράφημα: η ένωση που προσδιορίζεται, η μάζα (και συγκέντρωση της), η κλίμακα απορρόφησης (AUFS).
3. Οι υπολογισμοί θα γίνονται με ευκρίνεια. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στα σημαντικά ψηφία.
4. Κατά τη συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων, ποιοτικών και ποσοτικών, θα πρέπει να αναφέρουμε συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά στοιχεία του δείγματος, την ημερομηνία, τον χρόνο εκτέλεσης, τις μονάδες αποτελεσμάτων και τυχόν πειραματικές δυσκολίες και ασυνήθιστα ή απρόβλεπτα προβλήματα που παρουσιάστηκαν κατά την εκτέλεση της ανάλυσης.

7. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Περιγράψτε την αρχή της υδροχρωματογραφίας κατανομής. Ποιες είναι οι διαφορές της υδροχρωματογραφίας κανονικής φάσης με την υδροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης;
2. Εξηγήστε τους λόγους για τους οποίους χρησιμοποιείται στήλη αντίστροφης φάσης C_{18} για το διαχωρισμό των παραπάνω πέντε ουσιών που βρίσκονται στα αναλγητικά φάρμακα.
3. Σε ποια περίπτωση είναι προτιμότερη η προετοιμασία καμπύλης αναφοράς που να βασίζεται στη μέτρηση της επιφάνειας (αντί του ύψους) των χρωματογραφικών κορυφών για τον προσδιορισμό της ασπιρίνης στο παραπάνω πείραμα;
4. Η καφεΐνη βρίσκεται σε διάφορα αναψυκτικά, στον καφέ και στο τσάι. Μπορείτε να προτείνετε μια μέθοδο προσδιορισμού της καφεΐνης στα παραπάνω είδη;
5. Για ποια ουσία από τις παραπάνω πέντε είναι περισσότερο ευαίσθητος ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής;
6. Γιατί απαιτείται απαέρωση των διαλυμάτων στην υδροχρωματογραφία;
7. Γιατί απαιτείται έλεγχος της πίεσης στην υδροχρωματογραφία;
8. Τι είδους σφάλμα (θετικό, αρνητικό ή κανένα) θα προκληθεί κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ασπιρίνης με HPLC, αν το άγνωστο δείγμα μετρήθηκε στη θέση κλίμακας απορρόφησης 1,28 AUFS, ενώ το πρότυπο διάλυμα στη θέση 0,64 AUFS;