**ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΑΡΑΚΕΤΑΜΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΒΡΑΖΟΝΤΑ ΔΙΣΚΙΑ**

**Σκεύη – αντιδραστήρια - όργανα**

* Φίλτρα σύριγγας Millipore (0.22 µm)
* Σύριγγες ινσουλίνης
* Μικροσύριγγα ακριβείας Hamilton 250 μL
* Ογκομετρική φιάλη
* Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες ή eppendorfs
* Ακετονιτρίλιο HPLC grade
* Υπερκαθαρό νερό - HPLC grade
* Πρότυπη ουσία: παρακεταμόλη, 99,9 %
* Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (Ultimate 3000, Dionex) που περιλαμβάνει αντλία παλινδρόμησης τεσσάρων διαλυτών Ultimate 3000 Pump (Pump LPG-3400 A), θερμοστατούμενο χώρο Column Compartment (TCC-3100) και ανιχνευτή PhotoDiode Array UV-Vis (PDA 3000) από Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA
* Στήλη αντίστροφης φάσης Acclaim 120 C18 (Dionex), μέγεθος κόκκων 3 μm, μήκους 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm

Τα σκεύη θα πρέπει να είναι πολύ καθαρά, γεγονός που εξασφαλίζεται με τον περιοδικό καθαρισμό τους με 2% διχρωμικό κάλιο (όταν διαπιστωθεί ότι υπάρχουν προσμίξεις στα αναλυόμενα πρότυπα). Καθημερινά πλένονται με ακετονιτρίλιο ή υπερκαθαρό νερό ή μείγμα αυτών ανάλογα με το προηγούμενο περιεχόμενο τους.

**Αρχή της μεθόδου**

O χρόνος ανάσχεσης tR (min) αποτελεί το κριτήριο ταυτοποίησης των ουσιών που αναλύονται χρωματογραφικά, διότι για σταθερές παραμέτρους ανάλυσης (υλικό πλήρωσης και διαστάσεις στήλης, ταχύτητα ροής κινητής φάσης, θερμοκρασία και σύσταση του συστήματος έκλουσης) ο χρόνος ανάσχεσης είναι σταθερός και χαραχτηρίζει την εκλουόμενη ουσία. Το μέγιστο ύψος της χρωματογραφικής κορυφής της αναλυόμενης ουσίας ή το εμβαδόν αυτής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμού της, διότι αυτά είναι ανάλογα της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αναλύτη στα δείγματα γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς που παρασκευάζεται από τα πρότυπα διαλύματα της καθαρής ουσίας.

**Παράμετροι της ανάλυσης**

**Τύπος και διαστάσεις στήλης**:

Στήλη αντίστροφης φάσης Acclaim 120 C18 (Dionex), μέγεθος κόκκων 3 μm, μήκους 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm

**Παράμετροι Έκλουσης**:

* Σύστημα έκλουσης: Ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση 75% v/v ακετονιτρίλιο : 25% v/v νερό, pH 3,5 (οξίνιση με κιτρικό οξύ)
* Πίεση κινητής φάσης: 200-3000 psi
* Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,7 mL/min
* Θερμοκρασία έκλουσης: 21 °C
* Χρόνος έκλουσης: 10 min

**Ενέσιμη ποσότητα δείγματος**:

20 μL (χρησιμοποιείται βρόγχος ανάλυσης χωρητικότητας 20 μl)

**Καταγραφή απορρόφησης**:

Στα 210 nm επί 10 min

**Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων - καμπύλη αναφοράς**

Ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό, διαλύουμε στην κινητή φάση και μεταφέρουμε σε 7 ογκομετρικές φιάλες των 250 mL συμπληρώνοντας μέχρι την χαραγή, κατάλληλη ποσότητα προτύπου παρακεταμόλης ώστε να προκύψουν 7 πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0-334 μg/mL παρακεταμόλης.

Εισάγουμε με ένεση >200 μL κάθε προτύπου στη στήλη. Μετρούμε την απορρόφηση στα 210 nm επί 10 min. Εντοπίζουμε την κορυφή της παρακεταμόλης σε κάθε χρωματογράφημα, την ολοκληρώνουμε και καταγράφουμε το εμβαδόν της για κάθε συγκέντρωση προτύπου. Κατασκευάζουμε την καμπύλη αναφοράς, εμβαδού κορυφής/[παρακεταμόλης].

Προσοχή. *Χρειάζεται μεγάλη προσοχή στην καθαριότητα της μικροσύριγγας Hamilton. Η σύριγγα εκπλένεται επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό και με πρότυπο διάλυμα ή δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί. Προσοχή να αποφεύγονται οι φυσαλίδες κατά την εισαγωγή του δείγματος.*

**Κλείσιμο συστήματος**

Ξεπλένουμε το σύστημα έγχυσης εγχέοντας μέσω της βαλβίδας τουλάχιστον 5 φορές x 100 μL υπερκάθαρου νερού. Πατάμε το πλήκτρο Flow (τη σταγονίτσα επάνω στο menu) ρυθμίζοντας αρχικά τη σύσταση της κινητής φάσης σε 90% v/v ακετονιτρίλιο : 10% v/v νερό (επί 25 min τουλάχιστον) προκειμένου να πλυθεί η στήλη. Πατάμε στη συνέχεια Stop Flow (τo κόκκινο τετράγωνο επάνω στο menu), οπότε σταματάει η ροή του διαλύτη και αποσυνδέουμε όλα τα συστήματα του HPLC ενεργοποιώντας το disconnect all. ΚΛΕΙΝΟΥΜΕ ΤΟΝ ΔΙΑΚΟΠΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΠΡΙΖΟΥ ΤΟΥ HPLC. Απορρίπτουμε πριν φύγουμε όλα τα απόβλητα καταλλήλως.

**Με βάση τα παρακάτω δεδομένα να απαντήσετε στις ερωτήσεις που τίθενται** **:**

Αναλύσαμε πρότυπη ουσία παρακεταμόλης καθαρότητας 99,9 % με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης [ισοκρατική ανάλυση σε στήλη Acclaim 120 C18 (Dionex), θερμοκρασία 21 °C, με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0,7 mL/min και με κινητή φάση 75% v/v Ακετονιτρίλιο (σχετικά άπολος διαλύτης) : 25% v/v νερό (πολικός διαλύτης), pH=3.5] και λάβαμε μία μόνο κορυφή με χρόνο έκλουσης … min. Τρέξαμε στη συνέχεια υπό τις ίδιες συνθήκες πρότυπα της ίδιας ουσίας και λήφθηκαν τα παρακάτω δεδομένα:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Αριθμός Προτύπου** | **Συγκέντρωση παρακεταμόλης (μg/mL)** | **Εμβαδόν κορυφής (mAU\*min)** |
| Πρότυπο 1 | 0 | 0 |
| Πρότυπο 2 | 41,67 | 18,37 |
| Πρότυπο 3 | 62,5 | 32,15 |
| Πρότυπο 4 | 83,33 | 48,1 |
| Πρότυπο 5 | 125 | 92,89 |
| Πρότυπο 6 | 166,7 | 137,31 |
| Πρότυπο 7 | 333,8 | 270 |

Τρέξαμε, τέλος, δείγματα (Α και Β) που προήλθαν από δύο αναβράζοντα δισκία όπου δηλώνεται ότι περιέχεται ως δραστική ουσία παρακεταμόλη [παρουσία και εκδόχων, μεταξύ αυτών και σορβιτόλης (γλυκαντικό)] προκειμένου να διαπιστώσουμε την παρουσία παρακεταμόλης στα δισκία.

**1**. Να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς της παρακεταμόλης.

**2.** Με βάση τα χρωματογραφήματα που λάβατε μπορείτε να αποφανθείτε εάν περιέχεται παρακεταμόλη στα δείγματα που αναλύθηκαν; Πώς θα μπορούσατε να βεβαιωθείτε για την παρουσία παρακεταμόλης;

**3**. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τις μετρήσεις σας να υπολογίσετε τη συγκέντρωση της παρακεταμόλης στο κάθε δείγμα. Εάν το δείγμα Α προήλθε μετά από διάλυση 250 mg του αναβράζοντος δισκίου σε τελικό όγκο 500 mL, ποια η % w/w περιεκτικότητα του δισκίου σε παρακεταμόλη;

**4.** Με βάση τα χρωματογραφήματα που λάβατε μπορείτε να αποφανθείτε εάν τα δύο δισκία είναι κατά πάσα πιθανότητα της ίδιας εταιρείας;

**5**. Tα δισκία που αναλύσαμε περιείχαν δύο κύριες ουσίες την δραστική παρακεταμόλη και το έκδοχο σορβιτόλη. Με βάση τη δομή των δύο αυτών ουσιών παρακάτω μπορείτε να προβλέψετε τη σχετική σειρά έκλουσης αυτών;



ΣΟΡΒΙΤΟΛΗ ΠAΡAKETAMOΛΗ

**6.** Εάν το ίδιο δισκίο το αναλύσετε με χρωματογραφία κανονικής φάσης, πρόκειται να αλλάξει η σχετική σειρά έκλουσης των κορυφών;

**7.** Είναι δυνατόν τα δισκία να περιέχουν περισσότερες ουσίες από τον αριθμό των κορυφών που διακρίνονται και γιατί; Πώς θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε εάν πράγματι περιέχονται επιπλέον ουσίες;

**8.** Αλλάζοντας τη σύσταση της κινητής φάσης από 75% v/v MeCN : 25% v/v H2O pH 3,5 σε 56% v/v MeCN : 44% v/v H2O pH 3,5 πως αναμένεται να μεταβληθεί ο χρόνος έκλουσης της κορυφής της παρακεταμόλης; Πως εξηγείται αυτή η μετατόπιση του χρόνου έκλουσης;

Δίνεται το UV φάσμα απορρόφησης παρακεταμόλης, παρακάτω:



**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ**

Το φύλλο εργασίας θα φτιαχτεί κανονικά όπως κάθε φορά. Στο τέλος θα προστεθούν οι παραπάνω ερωτήσεις και οι απαντήσεις τους. Οι ερωτήσεις δεν αντικαθιστούν το θεωρητικό μέρος.